

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

***NURTURING CARE*, FATORES AMBIENTAIS, DE CONTEXTO E O ESTADO
NUTRICIONAL DE MICRONUTRIENTES E O DESENVOLVIMENTO NA
PRIMEIRA INFÂNCIA: RESULTADOS DO ESTUDO NACIONAL DE
ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO INFANTIL (ENANI-2019)**

NATHALIA CRISTINA DE FREITAS COSTA

RIO DE JANEIRO
FEVEREIRO, 2024

Nathalia Cristina de Freitas Costa

***NURTURING CARE, FATORES AMBIENTAIS, DE CONTEXTO E O ESTADO
NUTRICIONAL DE MICRONUTRIENTES E O DESENVOLVIMENTO NA
PRIMEIRA INFÂNCIA: RESULTADOS DO ESTUDO NACIONAL DE
ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO INFANTIL (ENANI-2019)***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Nutricionais.

Orientador: Professor Dr. Gilberto Kac

Rio de Janeiro
Fevereiro, 2024

CIP - Catalogação na Publicação

d866n de Freitas Costa, Nathalia Cristina
NURTURING CARE, FATORES AMBIENTAIS, DE CONTEXTO
E O ESTADO NUTRICIONAL DE MICRONUTRIENTES E O
DESENVOLVIMENTO NA PRIMEIRA INFÂNCIA: RESULTADOS DO
ESTUDO NACIONAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO INFANTIL
(ENANI-2019) / Nathalia Cristina de Freitas Costa.
- Rio de Janeiro, 2024.
171 f.

Orientador: Gilberto Kac.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro,
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2024.

1. Nutrição. I. Kac, Gilberto, orient. II. Título.

Nathalia Cristina de Freitas Costa

***NURTURING CARE, FATORES AMBIENTAIS, DE CONTEXTO E O ESTADO
NUTRICIONAL DE MICRONUTRIENTES E O DESENVOLVIMENTO NA
PRIMEIRA INFÂNCIA: RESULTADOS DO ESTUDO NACIONAL DE
ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO INFANTIL (ENANI-2019)***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Nutricionais.

Aprovada em 06/02/2024

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Gilberto Kac
Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro
Orientador

Professora Dra. Iná da Silva dos Santos
Faculdade de Medicina/ Universidade Federal de Pelotas

Professora Dra. Claudia Regina Lindgren Alves
Faculdade de Medicina/ Universidade Federal de Minas Gerais

Professora Dra. Simone de Menezes Karam
Faculdade de Medicina/ Universidade Federal do Rio Grande

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

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

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus pais, Claudia e Antônio, pelo amor, educação e apoio e a minhas avós, Sandra (em memória) e Aparecida, pelo cuidado e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me sustentar em todo longo e árduo processo do doutorado.

A minha família que sempre me apoiou nessa jornada da pós-graduação, mesmo sem muitas vezes entender o que e como fazemos pesquisa. Por compreenderem as ausências, os momentos de ansiedade e stress que muitas vezes estavam alinhados ao processo do doutorado.

A todos os integrantes do Observatório de Epidemiologia Nutricional, que para mim é mais que um grupo de pesquisa, é o ‘lugar’ onde me tornei profissional, pesquisadora, professora, onde tive imensuráveis oportunidades pessoais e profissionais.

Aos amigos que durante esses quatro anos estiveram pacientes para conciliar agendas e que eram o respiro em meio ao processo que por vezes se torna pesado.

A todos os colegas de pós-graduação, pesquisadores, professores, analistas de dados, técnicos e cia que fizeram parte de reuniões, bancas, aulas, e contribuíram para o amadurecimento do trabalho.

A todos os pesquisadores envolvidos no planejamento e execução, e aos cuidadores e às crianças que participaram do ENANI-2019.

EPIGRAFE

“Os sonhos precisam de persistência e coragem para serem realizados. Nós os regamos com nossos erros, fragilidades e dificuldades. Quando lutamos por eles, nem sempre as pessoas que nos rodeiam nos apoiam e nos compreendem. Às vezes somos obrigados a tomar atitudes solitárias, tendo como companheiros apenas nossos próprios sonhos.”

Augusto Cury

RESUMO

COSTA, Nathalia Cristina de Freitas. *Nurturing care, fatores ambientais, de contexto e o estado nutricional de micronutrientes e o desenvolvimento na primeira infância: resultados do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019)*. Rio de Janeiro, 2024. Tese (Doutorado em Ciências Nutricionais) – Programa de Pós-graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Objetivo: Estimar a associação entre variáveis de *Nurturing care*, ambientais e de contexto e do estado nutricional de vitamina B6, B12 e folato com o desenvolvimento na primeira infância (DPI) em crianças brasileiras <5 anos. **Método:** Foram utilizados dados de 14.558 crianças <5 anos pesquisadas pelo Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil de 2019 (ENANI-2019), um estudo transversal, de base populacional. O DPI foi avaliado usando o questionário Marcos do desenvolvimento infantil do *Survey of Well-being of Young Children* versão brasileira (SWYC-BR). As variáveis de contexto, ambientais e de *Nurturing care* foram obtidas por meio de questionário estruturado. O estado nutricional de B6, B12 e folato foram avaliados por meio da cromatografia líquida de alta performance com detecção de fluorescência e ensaios imunozimáticos de quimiluminescência. Valores de B6 <20 nmol/L foram considerados como insuficiência. Os tercis da distribuição de B6 também foram avaliados. O excesso e a deficiência de folato foram classificados como valores > 45,3 nmol/L e <10 nmol/L, respectivamente. Valores <150 pmol/L foram considerados como deficiência de vitamina B12. O modelo de resposta gradual foi utilizado para estimar a idade de desenvolvimento. O quociente de desenvolvimento (QD) foi calculado pela divisão da idade cronológica pela idade de desenvolvimento. A análise estatística compreendeu a descrição da amostra por meio da média do QD e intervalo de confiança (IC) de 95%. Modelos de regressão linear ajustados de forma hierarquizada foram usados para avaliar a associação entre variáveis de *Nurturing care*, de contexto e ambientais e o QD. O gráfico acíclico direcionado foi utilizado para definir os ajustes dos modelos de regressões lineares múltiplos. A diferença entre os grupos foi avaliada a por meio do IC 95% e o $p < 0,05$. **Resultados:** A média do QD (IC) foi menor entre crianças de 36-59 meses (0,91[0,88-0,93]), meninos (1,03[1,01-1,06]) e crianças da região Norte (0,98[0,93-1,04]) comparadas com crianças de 1-35 meses (1,18[1,15-1,22]), meninas (1,11[1,08-1,13]) e crianças da região Suldeste (1,11[1,07-1,16]). O QD esteve inversamente associado à cesariana de emergência, consumo de alimentos ultraprocessados e positivamente com a frequência a creche/escola privadas entre crianças de 1 a 35 meses. O nascimento de pequeno para a idade

gestacional e acesso a serviços públicos de saúde (outro nível de atenção diferente da primária) estiveram inversamente associadas ao QD e a frequência em creche/escola privada, positivamente associada com o QD entre crianças de 36 a 59 meses. A idade da criança associou-se inversamente com QD e uma interação entre a idade e a deficiência de vitamina B12 no QD foi observada. As concentrações séricas de vitamina B6 foram positivamente associadas com QD entre crianças de 24-59 meses após o ajuste para fatores de confusão. Não foram observadas associações entre as concentrações séricas de folato e QD. **Conclusão:** O DPI das crianças brasileiras diminui com o aumento da idade. O DPI esteve associado com variáveis de *Nurturing care* e nutricionais, como o estado nutricional de vitamina B6 e B12.

Palavras-chaves: desenvolvimento infantil; desenvolvimento na primeira infância; complexo vitamínico B; vitamina B6; folato; cobalamina; vitamina B12; *Nurturing care*; desigualdades em saúde; neurodesenvolvimento; SWCY; lactente; pré-escolar; países em desenvolvimento.

ABSTRACT

COSTA, Nathalia Cristina de Freitas. *Nurturing care, fatores ambientais, de contexto e o estado nutricional de micronutrientes e o desenvolvimento na primeira infância: resultados do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019)*. Rio de Janeiro, 2024. Tese (Doutorado em Ciências Nutricionais) – Programa de Pós-graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Objective: To estimate the association between nurturing care, environmental and contextual variables, and nutritional status of vitamin B6, B12, and folate with early childhood development (ECD) in Brazilian children <5 years old. **Method:** Data from 14,558 children <5 years evaluated in the 2019 Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019), a cross-sectional, population-based study, were used. ECD was assessed using the Survey of Well-being of Young Children Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire. Context, environmental, and nurturing care variables were evaluated using a structured questionnaire. The nutritional status of B6, B12, and folate was evaluated using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and immunoenzymatic chemiluminescence assays. Vitamin B6 insufficiency (<20 nmol/L), tertiles of the B6 distribution, folate excess (>45.3 nmol/L), folate deficiency (<10 nmol/L), and vitamin B12 deficiency (<150 pmol/L) were evaluated. The graded response model was used to estimate developmental age. The development quotient (DQ) was calculated by dividing chronological age by developmental age. Statistical analysis comprised the sample description using the mean DQ and 95% confidence interval (CI). Multiple linear regression models and a hierarchical approach were used to evaluate the association between nurturing care, contextual and environmental variables, and DQ. The Directed Acyclic Graph (DAG) was used to define the adjustments of the multiple linear regression models. Differences between groups were assessed using the 95% CI and $p < 0.05$. **Results:** The mean DQ was lower among children aged 36-59 months (0.91 [0.88-0.93]), boys (1.03 [1.01-1.06]) and those residing in the North region (0.98[0.93-1.04]) compared to children aged 1-35 months (1.18[1.15-1.22]), girls (1.11[1.08-1.13]) and those from the South region (1.11[1.07-1.16]). DQ was inversely associated with emergency cesarean section and consumption of ultra-processed foods, and positively with attendance at private daycare/school among children aged 1-35 months. Small for gestational age at birth, and access to public health services (another level of care other than primary) were

inversely associated with DQ, and attendance at private daycare/school were positively associated with DQ among children aged 36-59 months. Child age was inversely associated with DQ, and an interaction between age and vitamin B12 deficiency in DQ was observed. Serum vitamin B6 concentrations were positively associated with DQ among children aged 24–59 months after adjusting for confounders. No associations were observed between serum folate concentrations and DQ. **Conclusion:** The ECD of Brazilian children decreases with increasing age. ECD was associated with Nurturing care and nutritional variables, such as nutritional status of vitamins B6 and B12.

Keywords: Early child development; neurodevelopment; SWYC; children; Nurturing care; B vitamins; Vitamin B6; folate; cobalamin; vitamin B12; health inequities; lower-middle-income countries; national survey; developing countries.

LISTA DE FIGURAS

TESE

Figura 1. Os efeitos de contextos, ambientes e Nurturing care ao longo do curso de vida ...	25
Figura 2. Metabolismo do um carbono	31
Figura 3. Diferentes compostos da vitamina B6	32
Figura 4. Fluxograma de acordo com os objetivos específicos.....	51
Figura 5. Etapas da coleta de dados ENANI-2019.....	54
Figura 6. Curva característica do item (CCI).	64

ARTIGO 1

Figure 1. Developmental quotient (DQ) mean and 95% CI according to Brazilian macro-region (A) and for Brazil (B) according to age group: 1-59, 1-35, and 36-59-months children evaluated in ENANI-2019 (n= 14,159).	99
Figure 2. Association between developmental quotient (DQ) and distal and proximal variables according to age groups for children (A) 1-35 and (B) 36-59 months evaluated in ENANI-2019 (n= 14,159).	102
Figure S1. Flow diagram of children evaluated in ENANI-2019.....	103

ARTIGO 2

Figure 1. Flow diagram of children with blood samples and early childhood development data evaluated in ENANI-2019.....	140
Figure 2. Directed acyclic graph of the association between B6, folate, and B12 vitamin status and early childhood development.....	141
Figure 3. Simple linear regression between developmental quotient (DQ) and age (months) for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).	143
Figure 4. Association between developmental quotient (DQ) and chronological age with vitamin B12 deficiency interaction for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).	144
Figure 5. Association between developmental quotient (DQ) and vitamin B6 with chronological age interaction for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).	145

Supplementary figure 1. Association between developmental quotient (DQ) and chronological age with vitamin B6 tertile (A) and insufficiency (B) interaction for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).	147
Supplementary figure 2. Association between developmental quotient (DQ) and chronological age with high folate interaction for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).	149

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Recomendações da Organização Mundial de Saúde para a melhora do desenvolvimento infantil na primeira infância.	21
Quadro 2. Características gerais dos estudos que avaliaram o estado nutricional de folato, vitamina B6 e B12 em crianças menores de cinco anos.....	41
Quadro 3. Principais resultados dos estudos que avaliaram o estado nutricional de folato, vitamina B6 e B12 em crianças menores de cinco anos.....	43
Quadro 4. Sequência de blocos/questionários Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil de 2019 (ENANI-2019).	53
Quadro 5. Faixas etárias para o questionário de marcos do desenvolvimento do SWYC-BR.	55
Quadro 6. Orientação e esclarecimentos sobre a coleta de sangue.	57
Quadro 7. Classificação do estado nutricional para os micronutrientes estudados.....	59
Quadro 8. Classificação do estado nutricional antropométrico.....	63
Quadro 9. Classificação das variáveis de acordo com o modelo conceitual.....	65

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1. Mean developmental quotient according to distal level variables by age groups for children 1-59 months evaluated in ENANI-2019 (n= 14,159).....	95
Table 2. Mean developmental quotient according to proximal levels variables and age groups for children 1-59 months evaluated in ENANI-2019 (n= 14,159).	97
Table S1. Association between developmental quotient (DQ) and environmental, context, and nurturing care variables for children 1-59 months evaluated in ENANI-2019 (n= 14,159).....	104

ARTIGO 2

Table 1. Characteristics of children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520). ...	133
Table 2. Developmental quotient (DQ) means and 95% confidence intervals according to vitamin B6, B12 and folate variables, and age group for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).	135
Table 3. Association between developmental quotient (DQ) and vitamin B6, B12, and folate with chronological age interaction for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520) ¹	138
Table S1. Correlation between vitamin B6, B12 and folate dietary intake and B6, B12 and folate serum/blood concentrations according to age groups for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,516).....	146

ABREVIACES

5-FTHF	5-formiltetrahidrofolato
5-MTHF	5-metiltetrahidrofolato
CSPro	<i>Census Survey Processing System</i>
CV	Coeficiente de variação
DAG	<i>Directed Acyclic Graph</i>
DB	Laboratório Diagnósticos do Brasil
DI	Desenvolvimento infantil
DPI	Desenvolvimento na primeira infância
DNA	cido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ENANI-2019	Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil de 2019
ENCE	Escola Nacional de Ciências Estatísticas
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HCY	Homocisteína
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês <i>High-performance liquid chromatography</i>)
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICC	Curva característica do item
IDH	ndice de desenvolvimento humano
KMO	Kaiser-Meyer-Olkin
MICS	<i>Multiple Indicator Cluster Surveys</i>
MMA	cido metilmalnico (do inglês, <i>methylmalonic acid</i>)
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Proteína C reativa
PL	Piridoxal
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
PM	Piridoxamina
PMP	Piridoxamina 5'-fosfato
PN	Piridoxina
PNP	Piridoxina 5'-fosfato
QD	Quociente de desenvolvimento

RDA	Recomendação de ingestão diária (do inglês, <i>recommended daily allowances</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
Science	Sociedade para o Desenvolvimento da Pesquisa Científica
SWYC-BR	<i>Survey of Well-being of Young Children</i> versão brasileira
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância (do inglês, <i>United Nations Children's Fund</i>)
VME	Variância Média Extraída

SUMÁRIO

Apresentação	19
1 REFERENCIAL TEÓRICO	20
1.1 Desenvolvimento infantil na primeira infância.....	20
1.2 Fatores associados ao desenvolvimento na primeira infância	22
1.3 Desenvolvimento na primeira infância e fatores sociodemográficos	26
1.4 Desenvolvimento na primeira infância e o estado nutricional de micronutrientes	29
1.4.1 Vitamina B6.....	31
1.4.2 Folato.....	34
1.4.3 Vitamina B12.....	37
2 JUSTIFICATIVA.....	46
3 OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo geral	48
3.2 Objetivos específicos	48
4 MÉTODOS	49
4.1 Desenho e população do estudo.....	49
4.2 Coleta de dados	51
4.3 Variáveis de interesse	54
4.3.1 Desenvolvimento na primeira infância (DPI).....	54
4.3.2 Estado nutricional de vitamina B6, B9 e B12	57
4.3.3 Uso de suplementos vitamínicos e/ou minerais.....	59
4.3.4 Consumo de fontes dietéticas de vitamina B6, B12 e folato	59
4.3.5 Consumo de alimentos ultraprocessados	61
4.3.6 Variáveis socioeconômicas.....	61
4.3.7 Variáveis da gestação, nascimentos e saúde infantil	62
4.3.7 Variáveis antropométricas infantis	62
4.4 Questões éticas.....	63
4.5 Análises estatísticas	63
5 RESULTADOS.....	69
Artigo 1	69
<i>Factors associated with early childhood development: Results from the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019)</i>	69
Artigo 2.....	106

FREITAS-COSTA <i>et al.</i> Association of development quotient with nutritional status of vitamins B6, B12, and folate in 6–59-month-old children: Results from the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019). The American Journal of Clinical Nutrition, 2023.	106
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	150
7 REFERÊNCIAS	153
Anexos	166
Anexo 1 - Marcos do desenvolvimento do SWYC-BR.	166
Anexo 2 – Alimentos avaliados no Bloco E.	169
Anexo 3 - Agrupamentos de biomarcadores sanguíneos.	170

Apresentação

Essa tese é um subprojeto do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil de 2019 (ENANI-2019), um inquérito de base populacional que teve o objetivo principal de avaliar as práticas de aleitamento materno e de alimentação, o estado nutricional antropométrico e as deficiências de micronutrientes entre crianças brasileiras menores de cinco anos. Nesse inquérito foram considerados elegíveis todos os domicílios dos municípios selecionados em que residissem crianças menores de cinco anos.

O ENANI-2019 foi concebido por um conjunto de pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), com participação da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Universidade Federal Fluminense (UFF) e Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e foi financiado pela Coordenação Geral de Alimentação e Nutrição Infantil e pelo Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde (MS). A coleta de dados aconteceu entre fevereiro de 2019 e março de 2020, em 123 municípios, em todos os estados e o Distrito Federal, e foi executada pela Sociedade para o Desenvolvimento da Pesquisa Científica (Science). A coleta, o processamento e as análises laboratoriais das amostras de sangue foram coordenados pelo laboratório Diagnósticos do Brasil (DB). Foram avaliadas 14.558 crianças em 12.524 domicílios.

A presente tese tem como objetivo estimar a associação entre variáveis proximais (*Nurturing care*) e distais e do estado nutricional de vitamina B6, B12 e folato e o desenvolvimento infantil na primeira infância de crianças brasileiras menores de cinco anos. Esse documento está estruturado em cinco seções: referencial teórico, justificativa, objetivos, métodos e resultados. Essa última seção foi apresentada em forma de dois artigos científicos: 1) *Factors associated with early childhood development: results from the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019)* em processo de submissão a um novo periódico e 2) *Association of development quotient with nutritional status of vitamins B6, B12, and folate in 6–59-month-old children: Results from the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019)* publicado no periódico *The American Journal of Clinical Nutrition*, em Julho de 2023 (<https://doi.org/10.1016/j.ajcnut.2023.04.026>).

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Desenvolvimento infantil na primeira infância

O desenvolvimento na primeira infância (DPI) compreende o processo de desenvolvimento cognitivo, físico, de linguagem, temperamento, socioambiental e motor. A primeira infância foi definida no Brasil, como o período da concepção ao 6 ano de vida, por meio do Marco Legal da Primeira Infância (BRASIL, 2016a). Dessa forma, o Brasil passa a ser o primeiro país do mundo a garantir os princípios e diretrizes para a formulação de políticas públicas destinadas à essa faixa etária por meio de legislação específica para a primeira infância (Conselho Nacional de Justiça, 2016). Por outro lado, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o DPI como um processo que se inicia no momento da concepção e se estende até os 8 anos de idade. Atingir a plenitude do potencial de desenvolvimento é um direito humano e um requisito para o desenvolvimento sustentável (WHO, 2020).

Estimou-se que entre 2005-2015, 250 milhões de crianças menores de cinco anos não estavam atingindo o seu pleno potencial de desenvolvimento e 80,8 milhões de crianças entre 36-59 meses apresentavam baixo nível de desenvolvimento cognitivo e/ou socioemocional em países de baixa e média renda (LU; BLACK; RICHTER, 2016; MCCOY; PEET; EZZATI; DANAIE *et al.*, 2016). No Brasil, a estimativa é que 20% das crianças menores de cinco anos estejam em risco de DPI deficiente e que entre 16-26% de crianças entre 36-59 meses estejam com DPI para a idade abaixo do esperado (LU; BLACK; RICHTER, 2016; MCCOY; RAVEN, 2014). Ainda é desconhecido o nível de DPI e suas diferenças regionais para a população brasileira. Estudos locais com diferentes abordagens de avaliação do desenvolvimento infantil (DI) revelaram que a prevalência de risco ou atraso está entre 20 e 30% (BOO; MATEUS; DURYE, 2018; ROCHA; SARAIVA; BARBIERI; FERRARO *et al.*, 2020; VALENTINI; COUTINHO; PANSERA; SANTOS *et al.*, 2012; ZAGO; PINTO; LEITE; SANTOS *et al.*, 2017), chegando até mais de 50% em alguns estudos (DELGADO; MICHELON; GERZSON; ALMEIDA *et al.*, 2020; SILVA; ENGSTRON; MIRANDA, 2015; ZANARDI; SANTOS; PACAGNELLA; PARPINELLI *et al.*, 2021), variando com o local e faixa etária avaliada.

A série do periódico Lancet (BARROS; EWERLING, 2016) e um *guideline* sobre DPI da OMS (WHO, 2020) reforçam a importância dos primeiros anos de vida para o desenvolvimento adequado. Esses documentos destacam o *Nurturing care* (cuidado de criação/integral, em tradução livre) como princípio central para alcançar o DPI pleno nesse período (BARROS; EWERLING, 2016; WHO, 2020). O *Nurturing care* é composto por cinco domínios que interagem entre si e podem ser mutuamente reforçados por meio do processo de

desenvolvimento: saúde, nutrição, segurança e proteção, cuidados responsivos e oportunidades de aprendizado (WHO, 2020). Ademais, é caracterizado por um ambiente sensível à saúde e necessidades nutricionais das crianças, responsivo, emocionalmente favorável, estimulante e apropriado para o desenvolvimento, com oportunidades para brincar e explorar e proteção contra adversidades (BLACK; ABOUD, 2011).

Segundo revisão sistemática realizada pelo grupo de trabalho da OMS sobre DPI, intervenções nutricionais combinadas ao cuidado responsivo - definido como o cuidado sensível às necessidades e desejos da criança, voltado para ajudar/apoiar a concentração e o desenvolvimento, com a formação de vínculo - são eficazes para melhorar a capacidade cognitiva, a linguagem e o desenvolvimento motor em comparação com os cuidados habituais, e melhoram o desenvolvimento cognitivo e de linguagem quando comparados com intervenções nutricionais isoladas. Dessa forma, a OMS recomenda que “o apoio para cuidados responsivos e aprendizagem precoce deve ser incluído como parte das intervenções para a nutrição ideal de bebês e crianças pequenas”, sendo essa uma recomendação de grau forte e com qualidade de evidência moderada (WHO, 2020). Além disso, outras três recomendações também são feitas no mesmo documento a fim de melhorar o DPI (**Quadro 1**).

Quadro 1. Recomendações da Organização Mundial de Saúde para a melhora do desenvolvimento infantil na primeira infância.

Recomendações	Força da recomendação¹	Qualidade da evidência²
Cuidado responsivo <ul style="list-style-type: none"> ▪ Todos os bebês e crianças devem receber cuidados responsivos durante os primeiros 3 anos de vida; ▪ Os pais e outros cuidadores devem ser apoiados para fornecer cuidados responsivos. 	Forte	Moderada
Promover aprendizagem precoce <ul style="list-style-type: none"> ▪ Todos os bebês e crianças devem ter atividades de aprendizagem precoce com seus pais e outros cuidadores durante os primeiros 3 anos de vida; ▪ Os pais e outros cuidadores devem ser apoiados para se envolverem na aprendizagem precoce com seus bebês e crianças. 	Forte	Moderada
Cuidados integrados e intervenções nutricionais <ul style="list-style-type: none"> ▪ O apoio a cuidados responsivos e aprendizagem precoce devem ser incluídos como parte das intervenções para a nutrição ideal de bebês e crianças pequenas. 	Forte	Moderada
Apoio à saúde mental materna <ul style="list-style-type: none"> ▪ As intervenções psicossociais para apoiar a saúde mental materna devem ser integradas aos serviços de saúde e desenvolvimento na primeira infância. 	Forte	Moderada

Nota: ¹ baseada nos critérios *Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation - GRADE* (JAESCHKE; GUYATT; DELLINGER; SCHÜNEMANN *et al.*, 2008); ² baseada no manual da OMS para o desenvolvimento de diretrizes (WHO, 2014).

Fonte: Adaptado de (WHO, 2020)

1.2 Fatores associados ao desenvolvimento na primeira infância

O DPI é processo complexo, contínuo e resultado da interação de uma série de fatores biológicos, nutricionais, ambientais e socioeconômicos. Entre eles destacam-se o fornecimento da alimentação/ nutrição adequada durante a gestação, intervenções na saúde mental materna, programas que combinem a prevenção de carências nutricionais e a promoção de atividades estimulantes entre pais/cuidadores e crianças, a amamentação, a suplementação de micronutrientes e a frequência e qualidade de pré-escolas e/ou creches, estando todos esses fatores dinamicamente relacionados (BRITTO; LYE; PROULX; YOUSAFZAI *et al.*, 2017).

Black *et al.* (2017) propuseram uma estrutura conceitual de fatores relacionados ao potencial DPI que foi posteriormente adotada pela OMS e pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF, do inglês, *United Nations Children's Fund*) em 2018 (**Figura 1, página 25**). O esquema gráfico proposto é composto por três níveis de categorias de fatores que estão relacionados ao DPI. Esses fatores são reconhecidamente como potenciais determinantes do desenvolvimento até a vida adulta. O nível mais proximal é representado pelo *Nurturing care*, seguido por questões ambientais e de contexto (BLACK; WALKER; FERNALD; ANDERSEN *et al.*, 2017).

Associações positivas entre o *Nurturing care* e o crescimento e desenvolvimento infantil foram demonstrados em todo o mundo (BRADLEY; PUTNICK, 2012; SINGLA; KUMBAKUMBA; ABOUD, 2015). Resultados do estudo Primeira Infância para Adultos Saudáveis (PIPAS), um inquérito realizado durante a campanha vacinal no Ceará, demonstraram que as chances de alcançar os marcos do DPI aos 36 meses eram maiores em crianças que nasceram com peso ao nascer adequado, cujo cuidador estava atento aos cuidados com o DPI, ao ler as orientações presentes na caderneta de saúde da criança e relatou ter interagido com a criança com atividades estimulantes. Enquanto para crianças entre 36-59 meses, as chances eram maiores quando haviam sido amamentadas (receber leite de peito) por pelo menos 3 meses, tinham no mínimo um livro em casa, quando o cuidador recebia orientações sobre o DPI em instituições assistenciais e relatou ter interagido com a criança com atividades estimulantes (VENANCIO; TEIXEIRA; DE BORTOLI; BERNAL, 2022). Dados do projeto INTERGROWTH-21st, composto pela avaliação de crianças acompanhadas no Brasil, Índia,

Itália, Quênia e Reino Unido, demonstram que o tempo de amamentação exclusivo está diretamente associada com o desenvolvimento motor grosso aos dois anos (VILLAR; OCHIENG; STAINES-URIAS; FERNANDES *et al.*, 2020). Além disso, Villar et al. (2020), também observaram relação direta entre o tempo de aleitamento materno e o desenvolvimento de atividades autônomas aos dois anos, como correr, subir as escadas e beber do copo sem ajuda, importantes marcos do DPI.

No nível seguinte, i.e., das questões ambientais estão os recursos pessoais, incluindo educação materna, saúde materna física e mental, e recursos sociais/ambientais, como segurança, e saneamento básico. Os cuidados durante o pré-natal têm importante papel nesse nível. O ganho de peso gestacional excessivo aumentou o risco de suspeita de atraso do DI, para os domínios de linguagem e cognição aos dois anos, entre as crianças da coorte de Pelotas (NEVES; GATICA-DOMÍNGUEZ; SANTOS; BERTOLDI *et al.*, 2020). A saúde mental materna também parece ser um aspecto essencial no ambiente em que a criança está inserida, sendo fortemente recomendada pela OMS, intervenções na saúde mental materna a fim de potencializar o DPI. Em revisão sistemática realizada pelo grupo de trabalho da OMS, os estudos demonstraram que intervenções na saúde mental materna foram protetoras para alguns aspectos de saúde infantil, entre eles a mortalidade e o desenvolvimento cognitivo (**Quadro 1, página 21**) (WHO, 2020).

Recursos financeiros parecem ter um importante papel no potencial de DPI. O baixo nível socioeconômico na primeira infância esteve associado com menor volume de substância cinzenta do hipocampo e do lobo temporal. A estrutura cerebral de crianças expostas a recursos financeiros limitados apresentava desenvolvimento atípico para substância cinzenta, estando até 10 pontos percentuais abaixo das normas de desenvolvimento para seu sexo e idade (HAIR; HANSON; WOLFE; POLLAK, 2015). Hanson et al. (2015) observaram associação negativa entre o acúmulo de situações de estresse, como abuso físico e mudança ambiental drástica e a piora na estrutura cerebral, fatores determinantes para além da exposição a baixa renda. Além disso, os resultados também revelaram que o volume do hipocampo é um dos caminhos mediadores da associação entre a renda/pobreza e o desempenho comportamental (HANSON; NACEWICZ; SUTTERER; CAYO *et al.*, 2015). A hipótese de que a exposição a um ambiente limitado/ insuficiente em recursos financeiros limitam o acesso infantil a um ambiente que potencialize seu DPI, levando ao desenvolvimento limitado das estruturais no sistema nervoso central. Nesse sentido, os *Nurturing care* podem atenuar os efeitos dos baixos recursos financeiros, principalmente da pobreza extrema no DPI. Evidências neurocientíficas confirmam que os *Nurturing care*, incluindo programas de treinamento do cuidado para a família e de

melhoria da pré-escola, durante a primeira infância atenuam os efeitos prejudiciais do baixo nível socioeconômico sobre desenvolvimento do cérebro (HANSON; NACEWICZ; SUTTERER; CAYO *et al.*, 2015; MUENNIG; SCHWEINHART; MONTIE; NEIDELL, 2009; NEVILLE; STEVENS; PAKULAK; BELL *et al.*, 2013; NOBLE; ENGELHARDT; BRITO; MACK *et al.*, 2015; PAVLAKIS; NOBLE; PAVLAKIS; ALI *et al.*, 2015).

Por último, os contextos sociais, econômicos, políticos, climáticos e culturais, como políticas e leis que garantam o bem-estar, como também guerras, conflitos, alterações climáticas extremas e outras questões relacionadas ao clima impactam mais distalmente no DPI. Segundo a UNICEF, metade das crianças no mundo vivem em países em risco extremo para as mudanças climáticas. O aumento nas alterações climáticas e, com isso, a ocorrência de degradação e desastres ambientais, faz com que a estabilidade e a previsibilidade necessárias na vida de uma criança seja perturbado, impedindo o DPI pleno (UNICEF, 2022). Crises (financeiras, políticas e econômicas), também parecem ter um importante impacto na saúde e desenvolvimento de crianças, uma vez que os recursos ou incentivos governamentais se tornam mais escassos (FRIEDMAN; STURDY ; RAJMIL; FERNANDEZ DE SANMAMED; CHOONARA; FARESJÖ *et al.*, 2014). Crises sanitárias, como a pandemia de Covid-19, também têm sido discutidas como importante impacto a curto e longo prazo no DPI (MULKEY; BEARER; MOLLOY, 2023; SATO; FUKAI; FUJISAWA; NAKAMURO, 2023).

Os efeitos negativos do contexto em que a criança está inserida, parecem ser mais pronunciado para as crianças mais desfavorecidas e vulneráveis socialmente (UNICEF, 2022). Portanto, existe uma necessidade de políticas públicas que garantam tempo e recursos aos pais/cuidadores para fornecerem o cuidado de criação, permitindo que as crianças atinjam seu potencial de DPI. Todos esses componentes multiníveis estão mediados por meio dos cuidados de criação para influenciar o desenvolvimento das crianças e, por consequência, o desenvolvimento na adolescência e na vida adulta (BLACK; WALKER; FERNALD; ANDERSEN *et al.*, 2017).

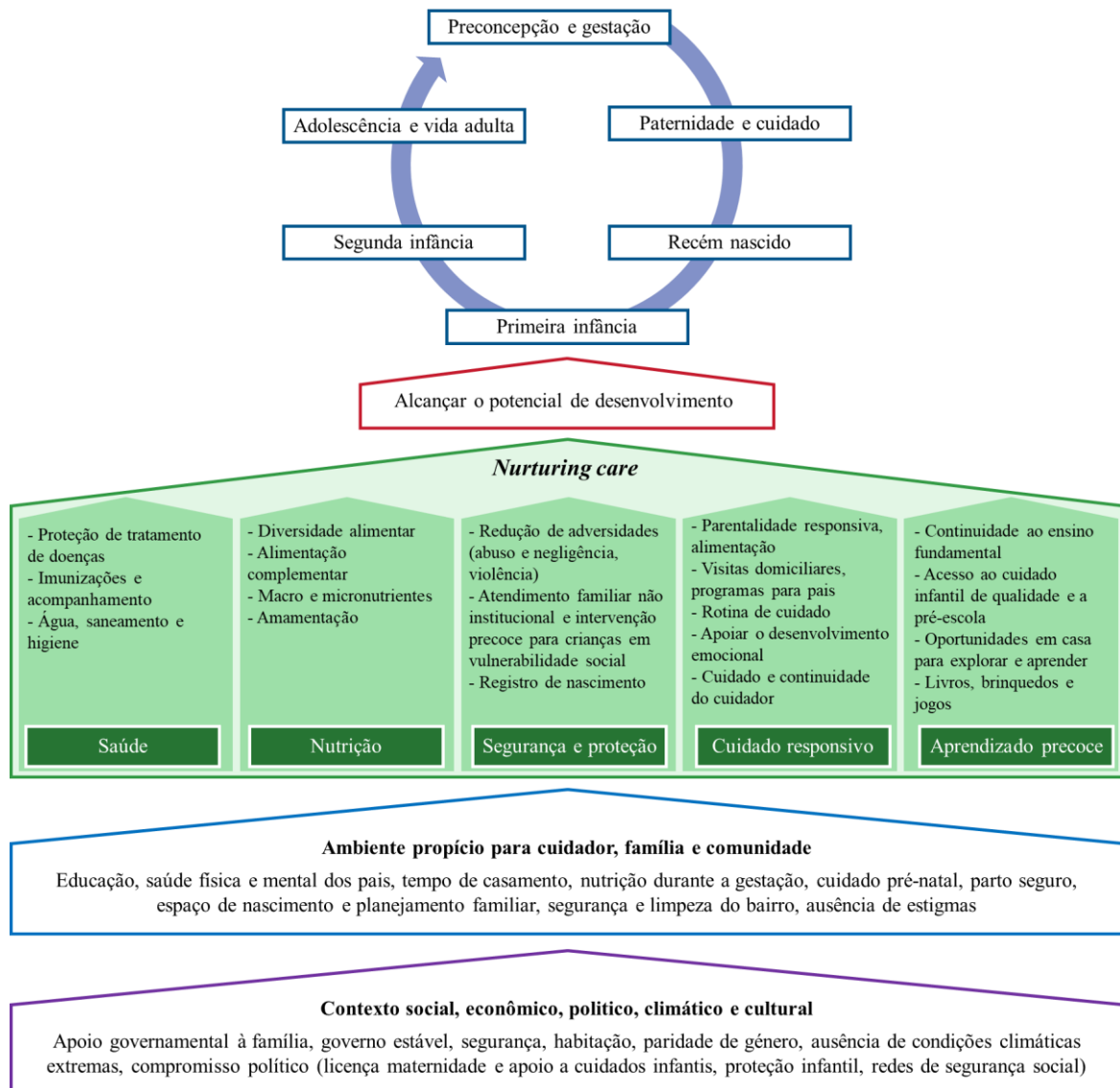


Figura 1. Os efeitos de contextos, ambientes e *Nurturing care* ao longo do curso de vida (Traduzido de (BLACK; WALKER; FERNALD; ANDERSEN *et al.*, 2017)).

Adversidades no início da vida afetam o curso do desenvolvimento até a vida adulta, especialmente quando múltiplas situações ocorrem concomitantemente. Entre elas destacam-se a pobreza, deficiências nutricionais, exposição a comunidades com alta criminalidade e outras situações de estresse (PAVLAKIS; NOBLE; PAVLAKIS; ALI *et al.*, 2015). Alguns estudos têm investigado o efeito do acúmulo de adversidades sobre o DPI. O acúmulo de adversidades como estresse familiar, violência infantil, insegurança alimentar e violência são mais prejudiciais ao DPI quando comparadas as crianças expostas a apenas uma das adversidades citadas, de forma isolada (EVANS; KIM, 2013; MCCOY; RAVER, 2014).

1.3 Desenvolvimento na primeira infância e fatores sociodemográficos

O contexto ambiental em que as crianças vivem desempenha um papel importante no seu desenvolvimento motor, psicossocial e cognitivo (BLACK; WALKER; FERNALD; ANDERSEN *et al.*, 2017; DUNCAN; MORRIS; RODRIGUES, 2011; JOHNSON; RIIS; NOBLE, 2016). Como já discutido brevemente na seção anterior, a restrição de recursos financeiros e as desigualdades sociais impactam substancialmente o potencial de DPI. Essa relação parece ser mediada por alterações na estrutura cerebral infantil. Por outro lado os *Nurturing care* consistem em um dos potenciais atenuadores do impacto negativo da pobreza no DPI e conseqüentemente podem contribuir para reduzir danos na estrutura cerebral (HAIR; HANSON; WOLFE; POLLAK, 2015; HANSON; NACEWICZ; SUTTERER; CAYO *et al.*, 2015; MUENNIG; SCHWEINHART; MONTIE; NEIDELL, 2009; NEVILLE; STEVENS; PAKULAK; BELL *et al.*, 2013; NOBLE; ENGELHARDT; BRITO; MACK *et al.*, 2015; PAVLAKIS; NOBLE; PAVLAKIS; ALI *et al.*, 2015).

Alguns estudos têm demonstrado que os fatores socioeconômicos são significativamente mais importantes do que os biológicos na determinação do desenvolvimento e cognição de uma criança (BARROS; EWERLING, 2016; CAMARGO-FIGUERA; BARROS; SANTOS; MATIJASEVICH *et al.*, 2014; CORREIA; ROCHA; SUDFELD; ROCHA *et al.*, 2019). Dados do *Multiple Indicator Cluster Surveys* (MICS) da UNICEF, foram empregados na avaliação do índice de DPI, composto pelos domínios de alfabetização-numeração, aprendizagem/cognição, desenvolvimento físico e desenvolvimento socioemocional com 10 questões sobre atividades que a criança realiza (sim/não). Esses dados têm sido utilizados por alguns estudos sobre a associação entre as desigualdades sociais e o DPI. Barros & Ewerling (2016) avaliaram a prevalência de adequação do índice de DPI (pontuar 0 em ≤ 1 questão/domínio), coletado no MICS, de acordo com o quintil de riqueza e demonstraram que na região da América Latina e Caribe (os dados incluíam os seguintes países: Cuba, República Dominicana, El Salvador, Guiana, Panamá, Uruguai, Barbados, Santa Lúcia, Argentina, Belize, Costa Rica, Jamaica, Trindade e Tobago, Cuba e Suriname) existia uma diferença de quase 20% de prevalência de adequação do DPI entre o quintil mais alto e o quintil mais baixo de riqueza para crianças de 36-59 meses (BARROS; EWERLING, 2016).

Bornstein *et al.* (2021) demonstraram uma forte associação direta entre o índice de desenvolvimento humano (IDH) e os escores de DPI em crianças de 36-59 meses em 51 países de baixa e média renda, com os dados do MICS realizados entre 2009 e 2017. Países com pontuações de IDH mais altas tendem a investir mais em saneamento, bem-estar, habitação e

educação e sistemas nutricionais que promovem o DPI adequado. A ausência do acesso a serviços de saneamento básico e água adequada para o consumo humano foi negativamente associada ao DPI em países de baixa e média renda em uma meta-análise realizada com dados de 20.882 crianças em 13 países (SANIA; SUDFELD; DANAEI; FINK *et al.*, 2019). Além disso, essas nações, provavelmente, também têm infraestrutura mais bem desenvolvida que subsidiam os *nurturing care* por facilitando o acesso dos pais à materiais educacionais, maior divulgação de conhecimento sobre adaptação de práticas parentais e promoção do tempo e esforço dos pais no estímulo e cuidado com seus filhos (BORNSTEIN; ROTHENBERG; LANSFORD; BRADLEY *et al.*, 2021).

O acesso a programas educacionais como creches e pré-escolas e a atividades que estimulem a aprendizagem e o desenvolvimento em casa, também são importantes fatores relacionados as inequidades no DPI, o acesso a esse tipo de cuidado e estímulo parece acontecer de forma menos eficiente para famílias nos menores quintis de renda, especialmente em países de baixa e média renda. Um outro estudo, também usou dados do MICS e de Pesquisas demográficas e de saúde entre 2010 e 2018, e avaliou a frequência de crianças entre 36-59 meses com acesso a programas educacionais. Nos países de baixa e média renda a frequência foi de 37,6% e na América Latina e Caribe (Argentina, Belize, Costa Rica, República Dominicana, El Salvador, Guiana, Jamaica, México, Panamá, Paraguai, Suriname, Trindade e Tobago e Uruguai) de 52,8% (LU; CUARTAS; FINK; MCCOY *et al.*, 2020). As disparidades para esse indicador entre o maior e o menor quintil de renda foram de 33,7% no grupo de países de baixa e média renda e de 30,5% para a América Latina e Caribe (LU; CUARTAS; FINK; MCCOY *et al.*, 2020). Os autores também avaliaram a frequência de estimulação em casa, ou seja, quando a criança foi exposta a pelo menos seis atividades estimulantes (ler livros ou olhar fotos; contar histórias; cantar canções; passear; brincar; nomear, contar ou desenhar com a criança) nos últimos três dias. Os autores observaram uma frequência de 61,8 e 78,6% de crianças entre 36-59 meses nos países de baixa e média renda e a América Latina e Caribe, respectivamente (LU; CUARTAS; FINK; MCCOY *et al.*, 2020). Ambas as frequências estão abaixo dos países de alta renda onde 85,3% das crianças de 36-59 meses foram expostas ao estímulo em casa (LU; CUARTAS; FINK; MCCOY *et al.*, 2020). Avaliações desses dois fatores, programas educacionais e a atividades que estimulem a aprendizagem e o desenvolvimento em casa, são essenciais, uma vez que intervenções nesses campos tem a capacidade de se complementarem.

Sania et al. (2019) realizaram uma meta-análise com dados de 20.882 crianças menores de sete anos, analisadas de 21 estudos entre países de baixa e média renda, com objetivo de

investigar os fatores de risco para o desenvolvimento motor, cognitivo e de linguagem. A escolaridade materna e paterna foram associadas com os três domínios do DI. O DI apresentou uma dose-resposta ao nível de escolaridade dos pais, ou seja, associações mais fortes e positivas foram observadas com o aumento da escolaridade (SANIA; SUDFELD; DANAEI; FINK *et al.*, 2019). Observou-se que filhos de mães com mais anos de estudo tendem a se beneficiar com maior estimulação ao desenvolvimento em casa, melhores práticas de alimentação e higiene, acesso a serviços de saúde e imunização, que também vão impactar positivamente no DPI (FEIN; LABINER-WOLFE; SCANLON; GRUMMER-STRAWN, 2008; PAREY; CARNEIRO; MEGHIR, 2013; SIMKHADA; TEIJLINGEN; PORTER; SIMKHADA, 2008). Por outro lado, a escolaridade paterna ainda é pouco explorada na literatura, provavelmente, pela dificuldade no acesso a essa informação e/ou a ausência de uma figura paterna em algumas famílias. Um dos possíveis caminhos seria o aumento da renda familiar, entretanto, acredita-se que com a crescente participação paterna na criação dos filhos no mundo contemporâneo, o impacto da escolaridade paterna no DPI se dê pelos mesmos motivos dos maternos.

Camargo-Figueira et al. (2014) utilizaram dados da coorte de Pelotas de 2004, e demonstraram que o risco de ter baixo quociente de inteligência aos 6 anos foi maior entre crianças com pais não brancos, com menor nível de escolaridade, desempregados e com menor renda familiar nos primeiros 12 meses de vida da criança. Além disso, os autores observaram que esses fatores apresentaram maior magnitude de associação comparado a fatores de saúde e nutrição como déficit no perímetro cefálico e no comprimento para a idade no primeiro ano de vida. Em um estudo de base populacional realizado no Ceará, com crianças entre 2-72 meses, os autores observaram que o aumento da renda mensal e a classe social mais alta foram associados à redução do risco de atraso em todos os domínios de DI avaliados e que em famílias com baixa renda, a participação em programas de transferência condicional de renda indicava uma redução no risco de atraso do DI em comparação com crianças em famílias que não participavam desse tipo de programa (CORREIA; ROCHA; SUDFELD; ROCHA *et al.*, 2019).

Um estudo transversal realizado em dois municípios de Minas Gerais, avaliou a relação do ambiente doméstico, da creche e da vizinhança com o DI de 147 crianças de 24-36 meses e frequentadoras de creches públicas (DE SOUZA MORAIS; DE CASTRO MAGALHÃES; NOBRE; PINTO *et al.*, 2021). Os autores observaram, por meio da modelagem de equação estrutural, que o nível socioeconômico estava diretamente relacionado com o ambiente doméstico e da vizinhança, mas não com nenhum domínio do desenvolvimento, e que as condições ambientais em casa e na creche estavam diretamente associadas ao desenvolvimento cognitivo. Portanto, a casa era o ambiente que exercia o efeito

direto mais significativo, seguido pela creche e, indiretamente e em menor grau, a vizinhança (DE SOUZA MORAIS; DE CASTRO MAGALHÃES; NOBRE; PINTO *et al.*, 2021). Esses resultados indicam que as inequidades no DPI estão fortemente relacionadas as condições necessárias para a manutenção de um ambiente doméstico e de aprendizado adequado para o DPI pleno.

1.4 Desenvolvimento na primeira infância e o estado nutricional de micronutrientes

Por muito tempo, um dos grandes desafios para a saúde pública era a desnutrição, considerando a baixa estatura para idade e/ou baixo peso para idade, em crianças menores de cinco anos. Após grandes investimentos mundiais e nacionais, dados na UNICEF indicam que de 2000 a 2020 a prevalência de baixa estatura para idade diminuiu de 165 para 55 milhões de crianças, uma redução de 66%. No Brasil, dados entre 1974 e 2019 demonstram uma diminuição de 37 para 7% na prevalência de baixa estatura para a idade. (DE ALBUQUERQUE; IBELLI; SAWAYA, 2023)

Porém, o estado nutricional de crianças não é aferido apenas através de parâmetros antropométricos. Os parâmetros bioquímicos do estado nutricional na infância ainda segue sendo um problema pouco explorado. As diferentes formas de má nutrição englobam a inadequação de micronutrientes, o excesso de peso, obesidade e as doenças não transmissíveis, além dos contextos de subnutrição (WHO, 2023). Em 2020, estimou-se que uma em cada duas crianças, no mundo, sofrem de deficiências de vitaminas e minerais, incluindo vitamina A e nutrientes relacionados com a anemia, como ferro, folato e vitamina B12 (WHO, 2022), especialmente em países de baixa e média renda, como no Brasil (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF), 2020).

As deficiências de micronutrientes e suas implicações na saúde de crianças menores de cinco anos têm sido investigadas. Além do déficit de crescimento linear (SUDFELD; MCCOY; DANAEI; FINK *et al.*, 2015), outras consequências estão relacionadas às carências nutricionais, como baixo desempenho cognitivo e o comprometimento do sistema imunológico (ALLEN; MILLER; DE GROOT; ROSENBERG *et al.*, 2018; BAILEY; STOVER; MCNULTY; FENECH *et al.*, 2015; BRION; BELL; RAGHUVVEER, 2003; HOLICK, 2017; KING; BROWN; GIBSON; KREBS *et al.*, 2015; LYNCH; PFEIFFER; GEORGIEFF; BRITTENHAM *et al.*, 2018; TANUMIHARDJO; RUSSELL; STEPHENSEN; GANNON *et al.*, 2016; YAKOUB; LO, 2017).

A nutrição inadequada pode limitar o desenvolvimento de aspectos importantes da arquitetura do cérebro (YAKOOB; LO, 2017), com efeitos variados dependendo do momento, duração e a presença de deficiências (GEORGIEFF, 2007). O desenvolvimento é vulnerável a influências nutricionais desde a concepção até os primeiros dois anos de vida. Durante a concepção se inicia a formação da placa neural, enquanto no terceiro trimestre gestacional e nos primeiros dois anos de vida, há um crescimento acelerado do cérebro (BENTON, 2010). Carências nutricionais antes da concepção e na gestação podem resultar em problemas na formação do tubo neural, baixo peso e/ou comprimento ao nascer e atrasos no desenvolvimento ao longo da vida (BHUTTA; DAS; BAHL; LAWN *et al.*, 2014).

Dessa forma, as vitaminas do complexo B e participantes do metabolismo de um carbono, têm sido investigadas como importantes fatores limitantes do desenvolvimento fetal e infantil. O metabolismo de um carbono (**Figura 2, página 30**) envolve a adição, transferência ou remoção de unidades de carbono nas reações bioquímicas celulares (DUCKER; RABINOWITZ, 2017) e é central para múltiplos processos fisiológicos, incluindo metilação de ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico [DNA, do inglês, *deoxyribonucleic acid*] e ácido ribonucleico [RNA, do inglês, *ribonucleic acid*]) e modificação de histonas (manutenção epigenética), mielinização, homeostase redox, síntese de neurotransmissores, purinas, timidina e fosfolípidios (BAILEY; STOVER; MCNULTY; FENECH *et al.*, 2015; DUCKER; RABINOWITZ, 2017; FAN; YE; KAMPHORST; SHLOMI *et al.*, 2014; ROSENZWEIG; BLENIS; GOMES, 2018). Portanto, é essencial para a formação e manutenção do cérebro humano. Essas reações são dependentes da oferta dietética de doadores de metil, incluindo folato (vitamina B9) e metionina (FOX; STOVER, 2008), e de cofatores essenciais para o funcionamento do ciclo, como vitamina B12, B6 e a riboflavina (BERTOLO; MCBREAIRTY, 2013).

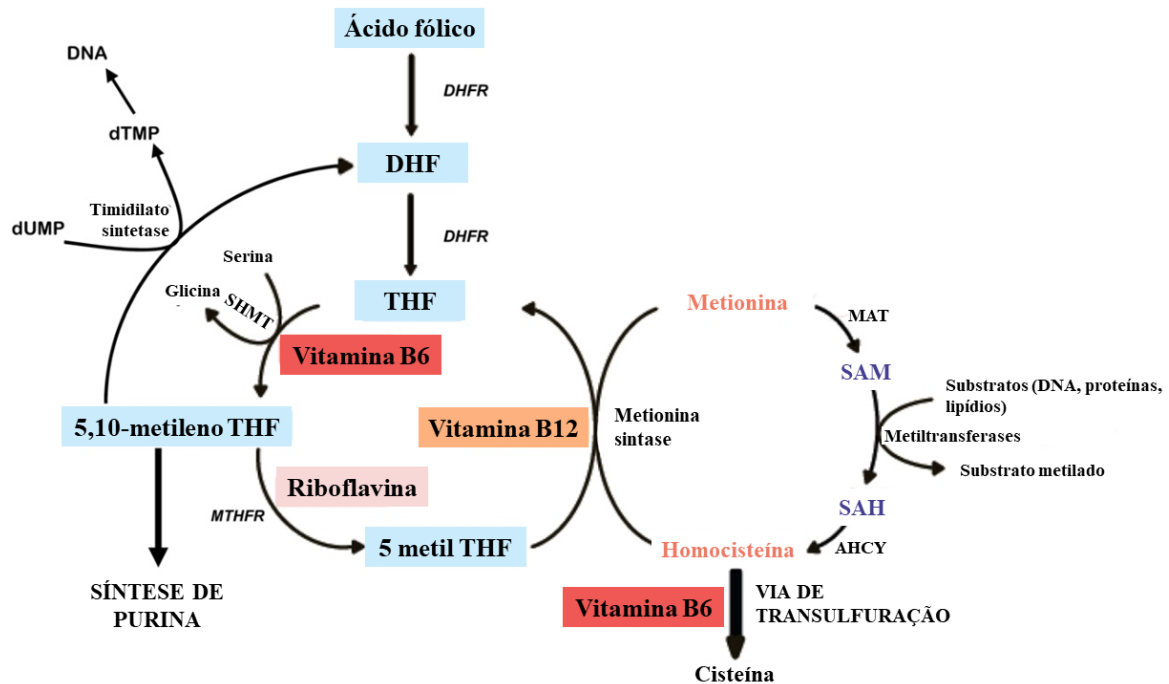


Figura 2. Metabolismo do um carbono

Traduzido de (MCNULTY; WARD; HOEY; HUGHES *et al.*, 2019)

Nota: DNA: ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*); dTMP: monofosfato de deoxitimidina; dUMP: monofosfato de deoxiuridina; DHFR: diidrofolato redutase; DHF: diidrofolato; THF: tetraidrofolato; SHMT: serina hidroximetiltransferase; MTHFR: metilenetetraidrofolato redutase; MAT: metionina adenosiltransferase; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; AHCY: S-adenosilhomocisteína hidrolase.

1.4.1 Vitamina B6

A vitamina B6 é um termo genérico que se refere a seis compostos interconvertíveis, com uma mesma estrutura 2-metil-3-hidroxipiridina somada a substituintes nas posições C4 e C5, piridoxina (PN), piridoxamina (PM), piridoxal (PL) e seus derivados fosforilados, piridoxina 5'-fosfato (PNP), piridoxamina 5'-fosfato (PMP) e piridoxal 5'-fosfato (PLP) (**Figura 3, página 31**) (UELAND; ULVIK; RIOS-AVILA; MIDTTUN *et al.*, 2015). A vitamina B6 está presente em muitos alimentos, destacando-se peixes, fígado e outras vísceras bovinas, além de batatas e frutas em geral (U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2019).

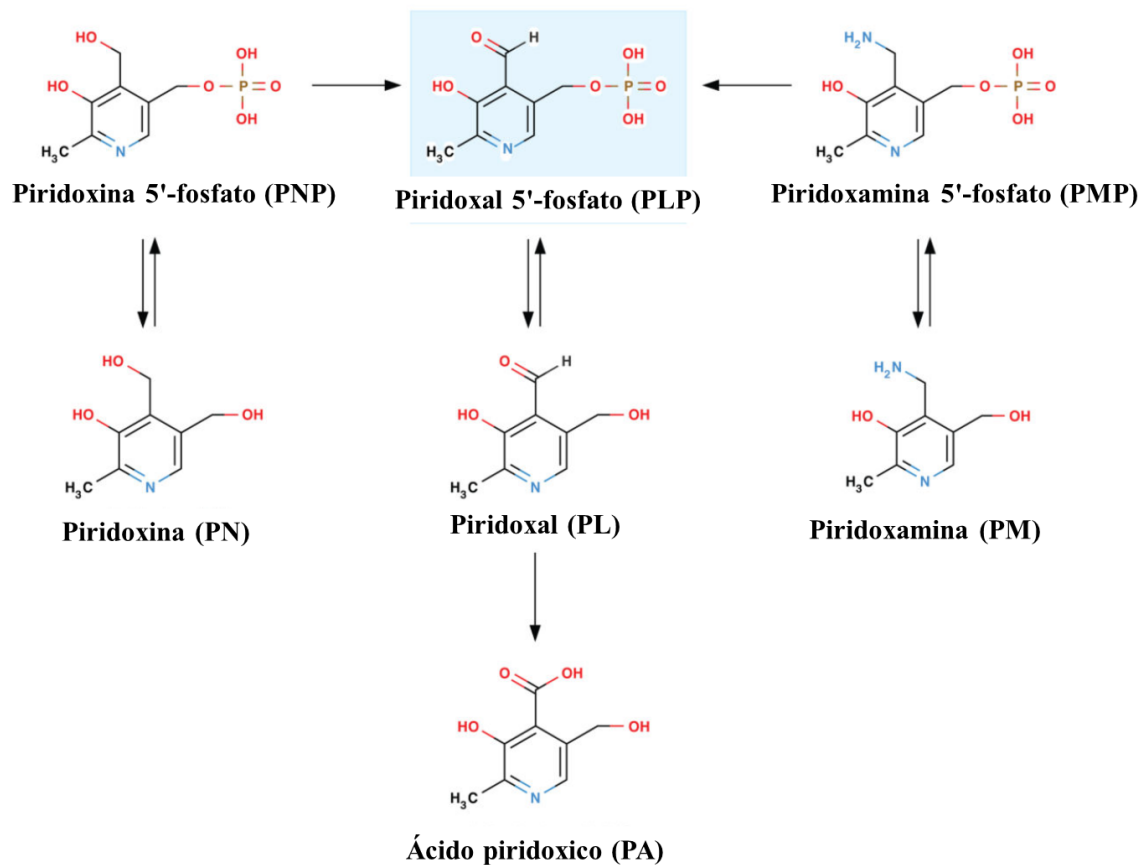


Figura 3. Diferentes compostos da vitamina B6 (traduzido de (UELAND; ULVIK; RIOS-AVILA; MIDTTUN *et al.*, 2015))

O PLP é a forma ativa da vitamina B6 que atua como cofator em mais de 160 funções catalíticas, incluindo o importante papel na síntese de neurotransmissores (PERCUDANI; PERACCHI, 2009) e na via de transulfuração, convertendo homocisteína em cisteína para a síntese da glutathiona (**Figura 2, página 30**) (UELAND; ULVIK; RIOS-AVILA; MIDTTUN *et al.*, 2015).

A deficiência de B6 causada por baixa ingestão alimentar é rara em países desenvolvidos, uma vez que está presente em muitos alimentos. Embora a deficiência seja incomum, geralmente ocorre em combinação com deficiências de outras vitaminas do complexo B (UELAND; ULVIK; RIOS-AVILA; MIDTTUN *et al.*, 2015).

A concentração plasmática de PLP reflete a ingestão de vitamina B6 e o *pool* desse composto no fígado, podendo ser influenciado por condições inflamatórias, albumina sérica e uso de alguns medicamentos (DI SALVO; SAFO; CONTESTABILE, 2012). Em indivíduos saudáveis, o uso da concentração plasmática de PLP como um indicador de status de vitamina B6 parece ser apropriado (HANSEN; SHULTZ; KWAK; MEMON *et al.*, 2001).

Durante a gestação, alterações nos marcadores de vitamina B6 podem não refletir a insuficiência desse nutriente, mas sim uma resposta fisiológica envolvendo distribuição alterada desse nutriente, incluindo acúmulo de PLP nos eritrócitos, secundário a alterações hormonais, e a hemodiluição. As altas concentrações de PLP encontradas em recém-nascidos tendem a diminuir após seis meses de vida e se aproximam dos níveis de adultos, independentemente da ingestão de vitamina B6 (BORSCHER, 1995).

São escassos os estudos que já avaliaram a associação entre a deficiência/insuficiência da vitamina B6 e o DI em lactentes (1-23 meses) e pré-escolares (2-5 anos) (**Quadro 2 e 3, página 40 e 42, respectivamente**). Um único estudo longitudinal realizado no Nepal foi encontrado. Nesse estudo, quanto o estado de vitamina B6 foi avaliado em 321 crianças entre 2-12 meses e o DI aos cinco anos. Os autores observaram uma associação positiva entre a concentração plasmática de vitamina B6 e o teste de DI, ou seja, quanto maior a concentração de vitamina B6 melhor o escore de DI (KVESTAD; MCCANN; CHANDYO; GIL *et al.*, 2021). A maioria dos estudos em crianças avalia o efeito do uso de vitamina B6 em patologias como a epilepsia responsiva a vitamina B6 (AKIYAMA; HYODO; HASEGAWA; OBOSHI *et al.*, 2020; ALBERSEN; BOSMA; JANS; HOFSTEDE *et al.*, 2015; LOB; BASSELL-HAWKINS; PATIL; NIE *et al.*, 2022). A concentração plasmática de vitamina B6 está fortemente relacionada a concentração de vitamina B6 no líquido cefalorraquidiano (ALBERSEN; BOSMA; JANS; HOFSTEDE *et al.*, 2015), estando associado à epilepsia em crianças com algum atraso no desenvolvimento ou eventos epilépticos (AKIYAMA; HYODO; HASEGAWA; OBOSHI *et al.*, 2020; LOB; BASSELL-HAWKINS; PATIL; NIE *et al.*, 2022).

Alguns estudos têm avaliado a relação entre a concentração da vitamina B6 no plasma e no leite materno e o DI (BOYLAN; HART; PORTER; DRISKELL, 2002; LAI; MOHAMAD AYOB; CAI; QUAH *et al.*, 2019; LOCKYER; MCCANN; MOORE, 2021). Uma coorte que acompanhou 443 gestantes entre 26-28 semanas gestacionais residentes em Singapura, avaliou a relação entre o estado de vitamina B12 e B6 na gestação e o DI dos seus filhos aos 2 anos. Observou-se que filhos de mães com insuficiência dos dois marcadores tinham menores pontuações de desenvolvimento cognitivo e de linguagem, quando comparado aos filhos de mães com suficiência para os dois marcadores. Adicionalmente, não foi encontrada diferença estatística para filhos de mães com insuficiência de B12 e suficiência de B6 (LAI; MOHAMAD AYOB; CAI; QUAH *et al.*, 2019). A concentração de vitamina B6 no leite materno (7-11 dias pós-parto) foi positivamente associado com o neurodesenvolvimento de seus filhos na segunda semana de vida, em um estudo transversal com 25 pares de mães-filhos americanos (BOYLAN; HART; PORTER; DRISKELL, 2002). Os dados sobre o estado de vitamina B6, seja materno,

no leite humano ou infantil, ainda são escassos e não permitem conclusões sobre a real influência no DI. Por outro lado, essa relação tem um importante potencial, considerando as funções da vitamina B6 no metabolismo de um carbono e na síntese de neurotransmissores.

1.4.2 Folato

O folato também é conhecido como vitamina B9 e é o termo genérico dado a uma família de compostos quimicamente semelhantes e reconhecidos com a mesma atividade vitamínica no corpo humano. Essa família inclui o ácido fólico e seus derivados; 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), 5-formiltetrahidrofolato (5-FTHF ou ácido folínico), 10-formil-THF, 5,10-metileno-THF e THF não substituído (SCAGLIONE; PANZAVOLTA, 2014).

O ácido fólico é um composto sintético, solúvel em água, formado por um grupo pteroil ligado a um resíduo de ácido glutâmico. O ácido fólico em si não é ativo como coenzima e tem que passar por várias etapas metabólicas para ser convertido na forma de THF metabolicamente ativa (**Figura 2, página 30**). O ácido folínico é um derivado 5-formil do THF, é encontrado naturalmente em alimentos e, facilmente, convertido em THF. O ácido fólico é encontrado em suplementos vitamínicos e alimentos fortificados, como farinhas e cereais matinais (BAILEY, 2000) e o ácido folínico em vegetais folhosos verde-escuros, como espinafre, couve e brócolis, leguminosas, frutas cítricas e fígado bovino (KRISHNASWAMY; MADHAVAN NAIR, 2001; SCAGLIONE; PANZAVOLTA, 2014). O 5-MTHF é a forma biologicamente ativa do folato e encontrada mais abundantemente no plasma (**Figura 2, página 30**) (SCAGLIONE; PANZAVOLTA, 2014).

O folato está envolvido em diferentes processos fisiológicos como o crescimento e o desenvolvimento fetal e infantil, devido a participação na síntese, reparo e metilação do DNA, contribuindo para a formação de novas células e tecidos (BURDGE; LILLYCROP, 2012). O estado de folato pode ser avaliado usando a concentração de folato nos eritrócitos ou no plasma. A primeira é considerada um marcador da ingestão média a longo prazo, porque o folato usado para a constituir as hemácias é absorvido durante a eritropoiese e liberado na sua quebra depois de 120 dias; já a segunda, reflete a ingestão recente (LAMERS, 2011a; b; WU; CHANARIN; SLAVIN; LEVI, 1975). Por outro lado, a dosagem de folato eritrocitário possui dificuldades analíticas e maior chances de erro durante o processo de análise, comparado a avaliação do folato plasmático (FARRELL; KIRSCH; HERRMANN, 2013). Além disso, o folato

eritrocitário pode ser influenciado pela presença de polimorfismos relacionados a metabolização do folato, e se trata de uma técnica mais cara (FARRELL; KIRSCH; HERRMANN, 2013). A dosagem de folato sérico é uma técnica mais simples analiticamente, barata e não sofre influência da presença de polimorfismos (FARRELL; KIRSCH; HERRMANN, 2013). Portanto, não se justifica o uso do folato eritrocitário em estudos epidemiológicos.

A deficiência e a insuficiência de folato na gestação está relacionada com ocorrência de defeitos do tubo neural, descolamento prematuro de placenta, nascimento prematuro e baixo peso ao nascer (SCHOLL; JOHNSON, 2000). Durante a infância, a deficiência de folato está associada com déficit de crescimento na infância (REYNOLDS, 2006) e mais recentemente tem se investigado a relação com desvios no DI (**Quadro 2 e 3, página 40 e 42, respectivamente**).

O estado de folato e o DI foi avaliado em um coorte na Índia com 650 crianças. Strand et al. (2013) não encontraram relação estatisticamente significativa entre as concentrações de folato no plasma aos 12-18 meses e o desenvolvimento mental e psicomotor no mesmo momento ou entre 16-24 meses de vida. Por outro lado, para crianças nos maiores quartis de vitamina B12 ($>25\% \geq 145$ pmol/L), a concentração plasmática de folato foi positivamente associada com o DI nos dois momentos avaliados, o que não foi observado para as crianças no primeiro quartil de vitamina B12 (<145 pmol/L) (STRAND; TANEJA; UELAND; REFSUM *et al.*, 2013). Outros estudos realizados no Taiwan e Nepal não relataram nenhuma relação entre o estado de folato na infância (<5 anos; 2-12 meses e 5 anos) e o DI (KVESTAD; MCCANN; CHANDYO; GILL *et al.*, 2021; LIN; CHUNG; HUANG; HSIEH *et al.*, 2019) (**Quadro 2 e 3, página 40 e 42, respectivamente**).

A relação entre suplementação de ácido fólico e o DI tem sido mais explorada na literatura do que a deficiência. Em uma coorte realizada com 420 pares de mães e filhos na Espanha, a exposição a suplementação de ácido fólico durante o primeiro trimestre gestacional esteve positivamente associada ao DI aos quatro anos para os domínios de função verbal, motora e verbal-executiva, e competência social (JULVEZ; FORTUNY; MENDEZ; TORRENT *et al.*, 2009). Na China, um estudo transversal avaliou 1,186 lactantes, quanto a exposição a distintos períodos de uso de ácido fólico na gestação (<3 , 3-6 e >6 meses) e o desfecho do DI no primeiro mês de vida. A suplementação de ácido fólico foi positivamente associada ao DI em todos os períodos de exposição, comparado a ausência do uso. Entretanto, o uso entre 3-6 meses apresentou maior influência sobre o DI (YAN; ZHU; CAO; LIU *et al.*, 2020). Um ensaio clínico conduzido na Irlanda do Norte, demonstrou efeito positivo da

suplementação de ácido fólico durante o segundo e terceiro trimestre gestacional no DI em 68 crianças aos 7 anos (MCNULTY; ROLLINS; CASSIDY; CAFFREY *et al.*, 2019), mas não aos 11 anos (CAFFREY; MCNULTY; ROLLINS; PRASAD *et al.*, 2021).

Adicionalmente, o efeito da dose de ácido fólico suplementado e o excesso de ácido fólico também tem sido investigado. Chatzi et al. (2012), avaliaram o DI de 599 crianças Gregas aos 18 meses e compararam entre filhos de mães que suplementaram 5 mg vs >5 mg/dia de ácido fólico até 14-18 semanas gestacionais. Os autores observaram que a suplementação em 5 mg foi positivamente associada com o domínio da comunicação do DI. Adicionalmente, os autores não observaram melhora no DI entre as crianças expostas a doses >5 mg/dia (CHATZI; PAPADOPOULOU; KOUTRA; ROUMELIOTAKI *et al.*, 2012). Na Espanha, Valera-Gran et al. (2014 e 2017) avaliaram a relação entre a suplementação de doses de ácido fólico entre 0,4-1 e >5 mg/dia e o DI. O relato do uso materno de doses 0,4-1 mg/dia foi positivamente relacionadas com o DI e foi fator de proteção para atraso, enquanto a suplementação >5 mg/dia foi um fator de risco para atraso aos 12 meses (VALERA-GRAN; GARCÍA DE LA HERA; NAVARRETE-MUÑOZ; FERNANDEZ-SOMOANO *et al.*, 2014) e entre 4-5 anos (VALERA-GRAN; NAVARRETE-MUÑOZ; GARCIA DE LA HERA; FERNÁNDEZ-SOMOANO *et al.*, 2017). Compañ Gabucio et al. (2021) também avaliaram o efeito da dose suplementada durante a gestação no DI aos 4-5 anos em 1,329 pares de mães-filhos na Espanha. A suplementação de ácido fólico <0,4 e ≥ 1 mg/dia na gestação foi positivamente associado com déficit de atenção, quando comparado ao grupo de referência de (0,4-0,99 $\mu\text{g}/\text{dia}$), recomendado pelo governo espanhol (COMPañ GABUCIO; GARCÍA DE LA HERA; TORRES COLLADO; FERNÁNDEZ-SOMOANO *et al.*, 2021).

Na infância, o efeito da suplementação de folato e/ou vitamina B12 foi avaliado por Kvestad et al. (2015). O ensaio clínico acompanhou 422 crianças saudáveis entre 6-30 meses durante 6 meses na Índia. As crianças suplementadas com folato e vitamina B12 tiveram maiores pontuações para coordenação motora grossa e resolução de problemas, quando comparado ao grupo placebo (KVESTAD; TANEJA; KUMAR; HYSING *et al.*, 2015). Por outro lado, o excesso de folato, especialmente, quando em insuficiência/deficiência de vitamina B12 parece levar a um agravamento do quadro. Resultados com crianças ainda são limitados, entretanto, entre adultos (>20 anos) avaliados no *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), na deficiência de vitamina B12 (< 148 pmol/L) o folato plasmático > 20 nmol/L foi associado a concentrações mais altas de homocisteína e ácido metil malônico (SELHUB; MORRIS; JACQUES, 2007).

As investigações sobre os possíveis efeitos negativos na saúde do excesso de folato, seja pela alta ingestão ou por altas concentrações plasmáticas, se deve a indícios de que o excesso de folato estaria associado a subnutrição da vitamina B12 (BAILEY; JUN; MURPHY; GREEN *et al.*, 2020; SELHUB; ROSENBERG, 2016). Especialmente em idosos, isso tem sido mais amplamente investigado. Ademais, pós fortificações de farinhas e outros alimentos o consumo de folato é caracteristicamente acima da ingestão recomendada (BAILEY; JUN; MURPHY; GREEN *et al.*, 2020). As investigações sobre o excesso de folato na saúde e desenvolvimento infantil ainda são escassas. Recentemente, usando dados do ENANI-2019, Salvatte *et al.*, 2023 demonstraram expressiva prevalência (36,9%) de altas concentrações de folato entre crianças brasileiras e que essas tinham 62% mais chances de terem deficiência de vitamina B12 (SALVATTE; FARIAS; NORMANDO; BERTI *et al.*, 2023).

1.4.3 Vitamina B12

A vitamina B12 (cobalamina) é hidrossolúvel e encontrada em alimentos de origem animal, como carnes, laticínios e ovos (ANKAR; KUMAR, 2022). Alguns alimentos fortificados apresentam boa biodisponibilidade de vitamina B12, como cereais de café da manhã e leveduras (DAMAYANTI; JACELDO-SIEGL; BEESON; FRASER *et al.*, 2018; WATANABE; YABUTA; BITO; TENG, 2014). Em alimentos fortificados e em suplementos, a hidroxicobalamina, cianocobalamina e adenosicobalamina são as formas comumente encontradas. Essas tornam-se biologicamente ativas após serem convertidas em metilcobalamina ou 5-desoxiadenosilcobalamina (ALLEN, 2010; INSTITUTE OF MEDICINE, 1998; PAUL; BRADY, 2017).

A vitamina B12 exerce funções como co-fator enzimático, participando de processos biológicos essenciais para a produção de DNA, RNA e ácidos graxos e a mielinização (ANKAR; KUMAR, 2022). O estado de vitamina B12 é comumente avaliado pela concentração desse composto no plasma ou soro. Por outro lado, a concentração de holotranscobalamina (cobalamina + proteína transcobalamina), ácido metilmalônico (MMA, do inglês, *methylmalonic acid*) e homocisteína têm sido usados como marcadores funcionais do estado nutricional de B12 (ALLEN, 2010).

Durante a gestação, a deficiência de B12 está relacionada a abortos (BENNETT, 2001), pré-eclâmpsia, nascimento prematuro (BONDEVIK; SCHNEEDE; REFSUM; LIE *et al.*, 2001; GEORGE; MILLS; JOHANSSON; NORDMARK *et al.*, 2002) e a defeitos no tubo neural (KIRKE; MOLLOY; DALY; BURKE *et al.*, 1993; RAY; BLOM, 2003), enquanto na

infância, a comprometimento neurológicos, atraso no desenvolvimento e atrofia cerebral, em casos mais graves (LÖVBLAD; RAMELLI; REMONDA; NIRKKO *et al.*, 1997; WHITEHEAD, 2006).

Alguns estudos têm explorado a relação entre o estado da vitamina B12 na infância e o DPI. A maioria dos estudos avaliam crianças em idade escolar (>5 anos) e adolescentes, indicando uma relação positiva entre o estado de vitamina B12 e o desenvolvimento mental, cognitivo e o desempenho escolar (VENKATRAMANAN; ARMATA; STRUPP; FINKELSTEIN, 2016). Por outro lado, os dados são limitados em crianças menores de cinco anos.

Estudos na Índia, Noruega, Egito, China, Taiwan e Nepal avaliaram o estado nutricional de vitamina B12 e o DPI de crianças menores de cinco anos (**Quadro 1**). O estado nutricional adequado de vitamina B12 parece ser um fator promotor do DPI adequado na maioria dos estudos.

Azad *et al.* (2020) observaram uma associação positiva entre a deficiência de B12 e o atraso no DI em 200 crianças hospitalizadas com idade entre 1-12 meses em um estudo transversal na Índia. No Egito, um estudo transversal com 655 crianças entre 6-24 meses demonstrou que o grupo com menor concentração média de vitamina B12 tinha menor desempenho para o DI (METWALLY; SALAH EL- DIN; SHEHATA; SHAALAN *et al.*, 2016). Sheng *et al.* (2019) observaram uma associação positiva entre as concentrações séricas de vitamina B12 e o desenvolvimento cognitivo e motor de 180 crianças chinesas aos 18 meses (SHENG; WANG; LI; OUYANG *et al.*, 2019). Por outro lado, um estudo caso-controle realizado no Taiwan com 266 crianças <5 anos com e sem atraso no DI, não demonstrou nenhuma relação estatisticamente significativa entre o estado de vitamina B12 e o DI (LIN; CHUNG; HUANG; HSIEH *et al.*, 2019).

A pontuação do DI aos 5 anos esteve associada positivamente com as concentrações de vitamina B12 e negativamente com as do MMA e da homocisteína entre 2-12 meses, em uma coorte realizado no Nepal com 300 crianças (KVESTAD; HYSING; SHRESTHA; ULAK *et al.*, 2017; KVESTAD; MCCANN; CHANDYO; GILL *et al.*, 2021). Strand *et al.* (2013) observaram a mesma direção das associações citadas, anteriormente, para vitamina B12 e os dois marcadores, ao avaliarem transversalmente 650 crianças entre 12-18 meses na Índia. Torsvik *et al.* (2015) observaram associação negativa entre a concentração plasmática de homocisteína e o DI, mas nenhuma relação foi encontrada entre vitamina B12 e o DI, ao estudarem 61 crianças aos 6 meses de vida em um estudo transversal na Noruega.

Apesar de indicar uma direção da relação entre o estado nutricional de vitamina B12 e o DI, esses estudos ainda são limitados a populações com características específicas, como consumo restrito de fontes alimentares de vitamina B12 (KVESTAD; HYSING; SHRESTHA; ULAK *et al.*, 2017; KVESTAD; MCCANN; CHANDYO; GIIL *et al.*, 2021; SHENG; WANG; LI; OUYANG *et al.*, 2019), crianças hospitalizadas ou muito pequenas (6 meses) (LIN; CHUNG; HUANG; HSIEH *et al.*, 2019; TORSVIK; UELAND; MARKESTAD; BJØRKE-MONSEN, 2013), e tamanho amostral limitado (<200 crianças) (AZAD; JAT; KAUR; GUGLANI *et al.*, 2020; TORSVIK; UELAND; MARKESTAD; BJØRKE-MONSEN, 2013).

Adicionalmente, alguns estudos têm avaliado o efeito da suplementação de vitamina B12 no DI. A suplementação pré e pós concepção e seus efeitos no DI tem sido avaliada, especialmente na Índia, onde a alimentação é restrita para boas fontes de vitamina B12, por não consumirem fontes animais desse nutriente. Um ensaio clínico, com 74 pares de mães e filhos, avaliou a suplementação de vitamina B12 e múltiplos micronutrientes pré-concepção e seu efeito no DI aos dois anos. O grupo suplementado com a vitamina B12 antes da concepção apresentou melhor pontuação no desenvolvimento cognitivo e de linguagem comparado ao grupo suplementada com múltiplos micronutrientes (D'SOUZA; BEHERE; PATNI; DESHPANDE *et al.*, 2021). Outro estudo na Índia avaliou o efeito da suplementação de vitamina B12 durante a gestação e nas primeiras 6 semanas de puerpério no DI de 218 crianças aos 30 meses. As pontuações do subdomínio de linguagem foram significativamente maiores em crianças nascidas de mulheres no grupo suplementado comparado ao placebo. Além disso, os níveis plasmáticos de homocisteína materna no 2º e 3º trimestre foram negativamente associados com os domínios de linguagem e coordenação motora (THOMAS; THOMAS; BOSCH; RAMTHAL *et al.*, 2019). O mesmo estudo também avaliou o desenvolvimento neurológico aos nove meses e aos seis anos de idade, e não encontrou efeito da suplementação no DI (SRINIVASAN; THOMAS; ANAND; JAYACHANDRA *et al.*, 2020; SRINIVASAN; THOMAS; KAPANEE; RAMTHAL *et al.*, 2017). Apesar disso, aos 9 meses de idade, os níveis elevados de homocisteína maternos no segundo e terceiro trimestre gestacional foram associados a menores pontuações de DI cognitivo.

A suplementação de vitamina B12 na infância em crianças menores de cinco anos e seu efeito no DI foi avaliada por dois estudos. No Nepal, um ensaio-clínico realizado com 600 lactentes de 6-11 meses com *score-Z* de estatura para idade <-1, suplementou 2 µg de vitamina B12/dia por via oral durante 12 meses. A suplementação de vitamina B12 não impactou no DI após 12 meses (STRAND; ULAK; HYSING; RANJITKAR *et al.*, 2020). Na Noruega, a suplementação de 400 µg de vitamina B12 intramuscular em crianças menores de 8 meses com

dificuldades de alimentação, sintomas neurológicos menores ou atraso no DI, resultou em um estado suficiente de cobalamina e no DI motor comparado ao grupo placebo (TORSVIK; UELAND; MARKESTAD; BJØRKE-MONSEN, 2013). Os resultados ainda são controversos, provavelmente, devido a diferenças quanto a dose, via de suplementação e a características dos sujeitos estudados. A escolha da via de suplementação impacta no efeito encontrado, uma vez que a eficiência dos mecanismos necessários para a absorção da vitamina B12 vão influenciar a sua biodisponibilidade (ANKAR; KUMAR, 2022). No estudo de Strand et al. (2020) tanto o grupo intervenção como o controle recebiam uma suplementação com 1 dose diária recomendada (RDA, do inglês, *recommended daily allowances*) de micronutrientes, permitindo a melhora no quadro de baixa estatura para a idade e no DI das crianças avaliadas. Entretanto, a melhora em ambos os grupos pode ter dificultado a observação do efeito da vitamina B12 de forma isolada. Além disso, o estudo de Torvick et al. (2013) demonstrou o efeito da suplementação em crianças com alterações neurológicas e/ ou no DI, tornando, em tese, o efeito mais expressivo, por ser um grupo mais vulnerável.

Quadro 2. Características gerais dos estudos que avaliaram o estado nutricional de folato, vitamina B6 e B12 em crianças menores de cinco anos.

Autor, ano e título	Objetivo	País	Participantes	Faixa etária	N	Desenho do estudo
Strand et al. 2013 <i>Cobalamin and folate status predicts mental development scores in North Indian children 12–18 mo of age</i>	Avaliar as associações entre os marcadores de cobalamina e status de folato e os escores de DI	Índia	Moradores da comunidade urbana Dakshinpuri	12-18 e 16-22 meses	650	Coorte
Torsvik et al. 2013 <i>Motor development related to duration of exclusive breastfeeding, B vitamin status and B12 supplementation in infants with a birth weight between 2000-3000 g, results from a randomized intervention trial</i>	Investigar o estado da vitamina B12 (cobalamina, HCY e MMA) durante os primeiros 6 meses, em relação ao aleitamento materno e a associação com o DI, nutrição e estado de vitamina B12 aos 6 meses. Avaliar o estado de vitamina B12 e o DI após 1 mês da intervenção.	Noruega	Lactentes com peso ao nascer entre 2000-3000 g	6 meses	61	Ensaio-clínico: intervenção de 400 µg de hidroxibalamina intramuscular aos 6 meses para crianças com HCY > 6,5µmol/L, o grupo controle recebeu uma simulação de injeção.
Metwally et al. 2016 <i>Early Life Predictors of Socio-Emotional Development in a Sample of Egyptian Infants</i>	Avaliar os fatores associados ao DI.	Egito	Lactentes sem anormalidades congênitas, doenças genéticas ou alguma alteração metabólica ou neurológica	6-24 meses	655	Transversal
Kvestad et al. 2017 <i>Vitamin B-12 status in infancy is positively associated with development and cognitive functioning 5 y later in Nepalese children</i>	Avaliar o estado de vitamina B12 entre 2-12 meses e seu efeito no DI aos 5 anos	Nepal	Ausência de infecção clinicamente avaliada e residir na área	2-12 e 5 meses	300	Coorte

Autor, ano e título	Objetivo	Pais	Participantes	Faixa etária	N	Desenho do estudo
Lin et al. 2019 <i>Association of plasma folate, vitamin B12 levels, and arsenic methylation capacity with developmental delay in preschool children in Taiwan</i>	Elucidar se maiores concentrações plasmáticas de folato e vitamina B12 aumentam a capacidade de metilação do arsênico e aliviam o atraso no desenvolvimento em crianças pré-escolares	Taiwan	178 crianças com atraso no DI e 88 com DI normal	<5 anos	266	Caso-controle
Sheng et al. 2019 <i>Effects of dietary intervention on vitamin B12 status and cognitive level of 18-monthold toddlers in high-poverty areas: a cluster-randomized controlled trial</i>	Avaliar a relação entre o estado nutricional de vitamina B12 e o DI de lactentes aos 18 meses e a eficácia do consumo de alimentos, incluindo cereais de arroz fortificados e carne vermelha, para melhora do estado de vitamina B12.	China	Lactentes nascidos a termo sem complicações neonatais graves, ausência de doença crônica ou aguda, com peso ao nascer > 2000 g e amamentados exclusivamente	18 meses	180	Ensaio-clínico: grupo das carnes: 50 g/dia de carne suína; grupo cereais fortificados: suplemento de cereais fortificado equicalórico; grupo cereais locais: suplemento de cereais local por um ano.
Azad et al. 2020 <i>Vitamin B12 status and neurodevelopmental delay in Indian infants: a hospital-based cross-sectional study</i>	Avaliar a prevalência de deficiência de vitamina B12 em lactentes em estágio inicial de deficiência.	Índia	Os lactentes apresentavam condições clínicas não críticas (bronquiolite, pneumonia não grave, gastroenterite aguda, convulsões febris, anemia e febre).	1-12 meses	200	Transversal
Kvestad et al. 2021 <i>One-Carbon Metabolism in Nepalese Infant–Mother Pairs and Child Cognition at 5 Years Old</i>	Avaliar as concentrações circulantes dos metabólitos do ciclo do um carbono na infância em relação ao desempenho cognitivo infantil aos 5 anos.	Nepal	Ausência de infecção clinicamente avaliada e residir na área	2-12 e 5 anos	321	Coorte

Nota: DI: desenvolvimento infantil; HCY: homocisteína; MMA: ácido metilmalônico.

Quadro 3. Principais resultados dos estudos que avaliaram o estado nutricional de folato, vitamina B6 e B12 em crianças menores de cinco anos.

Autor, ano e título	Biomarcadores avaliados	Questionário de DI	Análise estatística	Principais resultados
Strand et al. 2013 <i>Cobalamin and folate status predicts mental development scores in North Indian children 12–18 mo of age</i>	Vitamina B12, folato, HCY e MMA plasmático	<i>Mental development index (MDI) e Bayley Scales of Infant Development II (BSID II)</i>	Regressão linear múltipla	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A concentração de vitamina B12 (12-18 meses) foi diretamente associada com o escore de DI mental 4 meses depois ($\beta= 1,3$; $p<0,05$). ▪ O MMA (12-18 meses) esteve inversamente associado ao DI mental depois de 4 meses ($\beta= -1,1$), e a HCY esteve inversamente associado ao DI mental nos dois momentos (12-18 e 16-22 meses) ($\beta_{12-18}= -1,7$; $\beta_{16-22}=-2,0$; $p<0,05$). ▪ As concentrações de folato (12-18 meses) foram positivamente relacionadas com o DI mental no grupo com vitamina B12 > percentil 25 (>145 pmol/L) nos dois momentos avaliados ($\beta_{12-18}= 1,3$; $\beta_{16-22}= 1,6$; $p<0,05$).
Torsvik et al. 2013 <i>Motor development related to duration of exclusive breastfeeding, B vitamin status and B12 supplementation in infants with a birth weight between 2000-3000 g, results from a randomized intervention trial</i>	MMA, HCY, folato sérico e vitamina B6 plasmática	<i>Alberta Infants Motor Scale (AIMS) e Ages and Stages Questionnaire 2nd edition (ASQ-2)</i>	Regressão linear múltipla e modelos aditivos generalizados	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A duração do aleitamento materno foi negativamente associada a concentração de vitamina B12 ($\beta= -0,55$) e B6 ($\beta= -0,53$), e positivamente associada a concentração plasmática de HCY ($\beta= 0,47$) e MMA ($\beta= 0,55$) ($p<0,05$). ▪ A concentração de HCY e MMA foram negativamente associadas com os escores de DI ($p<0,05$). ▪ Após a intervenção foi observada melhora nas concentrações de vitamina B12 e seus marcadores (HCY e MMA) e no escore de DI motor ($p<0,05$).
Metwally et al. 2016 <i>Early Life Predictors of Socio-Emotional Development in a Sample of Egyptian Infants</i>	Vitamina B12, zinco, ferro e cobre séricos	<i>Bayley Scales of Infant and Toddler Development (Bayley III)</i>	Regressão logística múltipla	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A média da concentração de vitamina B12 foi maior entre as crianças com o DI adequado (1109,4 pg/mL), comparado com as crianças abaixo (981,6 pg/mL) do ponto de corte para DI ($p<0,05$). ▪ A concentração de vitamina B12 não foi significativamente associada com o DI (OR= 3,35 $p<0,05$).

Autor, ano e título	Biomarcadores avaliados	Questionário de DI	Análise estatística	Principais resultados
Kvestad et al. 2017 <i>Vitamin B-12 status in infancy is positively associated with development and cognitive functioning 5 y later in Nepalese children</i>	Vitamina B12, HCY e MMA plasmática	<i>Ages and Stages Questionnaire 3rd edition</i> (ASQ-3),	Regressão linear múltipla	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A concentração de vitamina B12 (2-12 meses) não esteve estatisticamente associada com nenhum dos domínios de DI aos 5 anos ($p>0,05$). ▪ As concentrações de HCY e MMA foram negativamente associadas ($\beta = -3,12$; $\beta = -6,78$) a pontuação global de DI ($p<0,05$). ▪ O aumento das concentrações de MMA e HCY foram associadas ao aumento de 1,36 e 2,33, respectivamente, no risco de estar no menor quartil de DI para o domínio de resolução de problemas ($p<0,05$).
Lin et al. 2019 <i>Association of plasma folate, vitamin B12 levels, and arsenic methylation capacity with developmental delay in preschool children in Taiwan</i>	Vitamina B12 plasmática, folato plasmático e arsênico urinário	Escala de Inteligência Wechsler Chinesa para Crianças (3 ^a edição) e <i>Bayley Scales of Infant Development, 3rd Edition</i> (BSID III)	Regressão logística múltipla	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Os níveis de arsênico urinário total, índices de capacidade de metilação de arsênio e o folato plasmático e as concentrações de vitamina B12 não foram diferentes entre as crianças com e sem atraso no DI ($p>0,05$). ▪ As concentrações plasmáticas de folato e B12 não foram associadas com o DI ($p>0,05$). ▪ Altos níveis de folato e vitamina B12 aumentaram a capacidade eficiente de metilação do arsênico.
Sheng et al. 2019 <i>Effects of dietary intervention on vitamin B12 status and cognitive level of 18-monthold toddlers in high-poverty areas: a cluster-randomized controlled trial</i>	Vitamina B12 e HCY séricas	<i>Bayley Scales of Infant Development, 3rd Edition</i> (BSID III)	Regressão linear múltipla	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A prevalência de deficiência de vitamina B12 foi de 16,7%, depois das intervenções. Maiores concentrações de vitamina B12 foram observadas no grupo de cereais fortificados (509,5 pg/mL), seguido pelo grupo de carnes (338,0 pg/mL). ▪ A concentração de vitamina B12 foi positivamente associada com os escores de DI cognitivo ($\beta = 2,15$) e de coordenação motora fina ($\beta = 0,71$) ($p<0,05$). ▪ O grupo de intervenção com consumo de carne de porco teve escores de DI cognitivo significativamente maiores ($p<0,05$).

Autor, ano e título	Biomarcadores avaliados	Questionário de DI	Análise estatística	Principais resultados
Azad et al. 2020 <i>Vitamin B12 status and neurodevelopmental delay in Indian infants: a hospital-based cross-sectional study</i>	Vitamina B12 sérica	<i>Denver developmental screening test II</i> (DDST II)	Regressão logística múltipla	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 22% de prevalência de deficiência de vitamina B12; ▪ A prevalência de suspeita de atraso no DI foi de 54% entre os lactentes com deficiência de vitamina B12 e de 15% entre os sem deficiência de vitamina B12 (p<0,05). ▪ Houve correlação estatisticamente significativa entre deficiência de vitamina B12 e DDST anormal (p < 0,0001).
Kvestad et al. 2021 <i>One-Carbon Metabolism in Nepalese Infant–Mother Pairs and Child Cognition at 5 Years Old</i>	Vitamina B12; Folato; vitamina B6; HCY; MMA; cisteína; metionina; serina; glicina; cistationina no plasma/soro.	<i>Ages and Stages Questionnaire3rd edition</i> (ASQ-3) e <i>Developmental Neuropsychological Assessment, 2nd edition</i> (NEPSY- II)	Análise de classe latente e análise de caminho usando o modelo de equação estrutural exploratória	<ul style="list-style-type: none"> ▪ As concentrações de vitamina B12 (2-12 meses) foram diretamente associadas com o subteste “Quebra-cabeças geométricos” aos 5 anos ($\beta= 0,15$; p<0,05). ▪ As concentrações de HCY (2-12 meses) foram negativamente associadas com os subtestes “Afeta o reconhecimento” ($\beta= -0,16$) e “Quebra-cabeças geométricos” ($\beta= -0,12$) aos 5 anos (p<0,05). ▪ O MMA (2-12 meses) foi negativamente associado ao subteste de DI “Quebra-cabeças geométricos” aos 5 anos ($\beta= -0,15$; p<0,05). ▪ As análises de caminho demonstraram associações indiretas entre a concentração de vitamina B12, homocisteína e vitamina B6 via cistationina plasmática com o DI.

Nota: DI: desenvolvimento infantil; HCY: homocisteína; MMA: ácido metilmalônico.

2 JUSTIFICATIVA

O DPI é um processo complexo que se inicia na concepção, e se estende até o oitavo ano de vida, podendo ser influenciado por uma série de fatores biológicos, de cuidado, ambientais e econômicos. Ademais, o DPI irá influenciar o desenvolvimento do indivíduo a curto e longo prazo. O investimento no DPI tem sido considerado uma das formas mais econômicas de se promover o desenvolvimento humano e reduzir as desigualdades sociais. Nesse sentido, a meta 4.2 dos objetivos do desenvolvimento sustentável para 2030 propõe a garantia de que todas as crianças tenham acesso ao desenvolvimento de qualidade na primeira infância, cuidados e educação pré-escolar, de modo que eles estejam prontos para o ensino primário.

A OMS e a UNICEF têm orientado os esforços de pesquisadores para as lacunas na literatura a respeito do DPI em consonância com as metas do desenvolvimento sustentável. Dentre os pontos que ainda carecem de estudos destaca-se informações sobre os *Nurturing care* em países de baixa e média renda e o estado nutricional infantil associado a cuidados responsivos as necessidades da criança.

Em paralelo, o estado nutricional de micronutrientes em crianças menores de cinco anos tem sido outro foco da saúde pública. Uma vez que a insuficiência desses nutrientes está associada a desfechos negativos na saúde infantil, como a problemas no sistema imunológico, déficits de crescimento e o excesso de peso, e parece ser um importante limitador do potencial de DI. As vitaminas B6, B12 e folato são essenciais para a formação e manutenção do cérebro humano, portanto, para o DI, atuando em funções como metilação de ácidos nucleicos, modificação de histonas (manutenção epigenética), mielinização e síntese de neurotransmissores. Entretanto, ainda são escassos os estudos sobre o estado nutricional de vitamina B6, B12 e folato e o DPI.

Ademais, apesar de alguns estudos brasileiros explorarem o estado do DPI, os dados ainda são restritos para algumas localidades mais pontuais ou sem representatividade. Não estão disponíveis dados representativos da população brasileira para orientar estratégias para melhora do DPI e apoiar o atendimento aos objetivos do desenvolvimento sustentável.

Dessa forma, esse trabalho se propõe de forma inovadora a avaliar o DPI de crianças menores de cinco anos em uma mostra representativa da população brasileira e estudar a associação de variáveis de *Nurturing care*, de contexto e ambientais, além de variáveis do estado nutricional da vitamina B6, B12 e folato e o DPI nessas crianças. Os resultados do presente trabalho fornecerão corpo de evidência para esse campo de estudo,

ainda pouco explorado, e evidência necessária para a identificação de populações vulneráveis e que devem ser foco de políticas públicas para a primeira infância no Brasil.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estimar a associação entre variáveis distais e proximais ao DPI e do estado nutricional de vitamina B6, B12 e folato com o DPI em crianças brasileiras menores de cinco anos.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Descrever o DPI em crianças brasileiras menores de cinco anos segundo macrorregião e faixa etária;
- 2) Descrever e avaliar a associação entre as variáveis distais e proximais com o DPI para diferentes faixas etárias, em crianças brasileiras menores de cinco anos;
- 3) Descrever e avaliar a associação entre o estado nutricional de B6, B12 e folato com o DPI, para diferentes faixas etárias, em crianças brasileiras menores de cinco anos.

4 MÉTODOS

4.1 Desenho e população do estudo

O Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil de 2019 (ENANI-2019) é um estudo transversal, de base populacional, que tem como população de pesquisa domicílios particulares, em todo o território nacional, onde residisse uma ou mais crianças menores de cinco anos completos. Não fizeram parte da população de pesquisa domicílios com crianças: (1) indígenas que vivessem em aldeias; (2) estrangeiras residentes em domicílios nos quais não se falasse a língua portuguesa; (3) com alguma condição que as incapacitasse à medição antropométrica; e (4) moradoras em domicílios coletivos (hotéis, pensões e similares, orfanatos e hospitais) (ALVES-SANTOS; CASTRO; ANJOS; LACERDA *et al.*, 2021).

Os dados foram obtidos por meio de amostra domiciliar e a estratificação foi feita com o objetivo de permitir a estimação dos parâmetros segundo macrorregião, sexo e faixa etária. A amostra foi calculada em 15 mil domicílios em 123 municípios e 26 estados e o Distrito Federal. Além disso, foi definido um tamanho amostral por macrorregião brasileira de três mil domicílios, considerando uma proporção mínima de 2% com estimativa de erro relativo de 35%, nível de confiança de 95% e amostragem e efeito do desenho fixado em 2 (ALVES-SANTOS; CASTRO; ANJOS; LACERDA *et al.*, 2021; VASCONCELLOS; SILVA; CASTRO; BOCCOLINI *et al.*, 2021).

Para a seleção dos municípios a serem incluídos na coleta de dados, foram estratificados em capitais e municípios de grande porte (população > 500.000) e em seguida os demais municípios. Todas as capitais e municípios de grande porte foram incluídos no estudo, e os demais foram selecionados por meio de probabilidade proporcional ao número estimado de crianças menores de cinco anos em 1º de julho de 2016 (VASCONCELLOS; SILVA; CASTRO; BOCCOLINI *et al.*, 2021).

Adicionalmente, nos municípios selecionados, os setores censitários foram estratificados por quartis de renda familiar média e selecionados de acordo com a probabilidade proporcional ao número de crianças menores de cinco anos, de acordo com o Censo Demográfico de 2010, por meio de amostragem de Pareto (ROSÉN, 2000). Mais detalhes sobre o processo de amostragem e de seleção dos domicílios foram descritos em (ALVES-SANTOS; CASTRO; ANJOS; LACERDA *et al.*, 2021; UFRJ, 2021a; VASCONCELLOS; SILVA; CASTRO; BOCCOLINI *et al.*, 2021).

A coleta de dados ocorreu entre fevereiro de 2019 e março de 2020, tendo sido interrompida, prematuramente, devido à adoção de medidas de distanciamento social que foram implementadas para enfrentamento da pandemia de Covid-19. Dessa forma, a amostra não foi coletada na sua totalidade em alguns estratos e unidades amostrais. 7,9% dos setores selecionados foram perdidos devido a interrupção da coleta, sendo mais concentrados nas regiões Norte e Nordeste (22,3% e 13,7% de setores não coletados, respectivamente), uma vez que no momento da interrupção da coleta havia mais setores a serem pesquisados nessas regiões. Os pesos amostrais foram ajustados considerando o percentual de setores não avaliados (VASCONCELLOS; SILVA; CASTRO; BOCCOLINI *et al.*, 2021).

Ao fim da coleta de dados, 12.524 domicílios (83,5% do planejado) foram avaliados em 123 municípios, incluindo todas as capitais e o Distrito Federal, compreendendo 14.558 crianças menores de cinco anos e 12.155 mães biológicas (CASTRO; NORMANDO; ALVES-SANTOS; BEZERRA *et al.*, 2021; VASCONCELLOS; SILVA; CASTRO; BOCCOLINI *et al.*, 2021). Foram realizados ajustes dos pesos amostrais para dados bioquímicos, quando ocorreu não resposta total (para todos os biomarcadores) e parcial (para algum subconjunto de biomarcadores) (CASTRO; NORMANDO; ALVES-SANTOS; BEZERRA *et al.*, 2021; VASCONCELLOS; SILVA; CASTRO; BOCCOLINI *et al.*, 2021). Mais detalhes são descritos na subseção de análise estatística.

A presente tese compreende três objetivos específicos, divididos em dois artigos, a amostra final para cada um dos objetivos específicos está descrita na **Figura 4**. Para os objetivos 1 e 2, a amostra foi de 14.159 participantes, foram consideradas elegíveis todas as crianças que tinham entre 1-59 meses, e, portanto, tinham a avaliação de DPI antropométrica. Para o objetivo 3, a amostra final foi de 6.520 participantes, considerando que 8.739 crianças tiveram amostras de sangue coletadas (69,3% das 12.598 crianças elegíveis para a coleta de sangue [>6 meses]) e os dados completos para as variáveis de interesse (DI e vitaminas B6, B12 e folato).

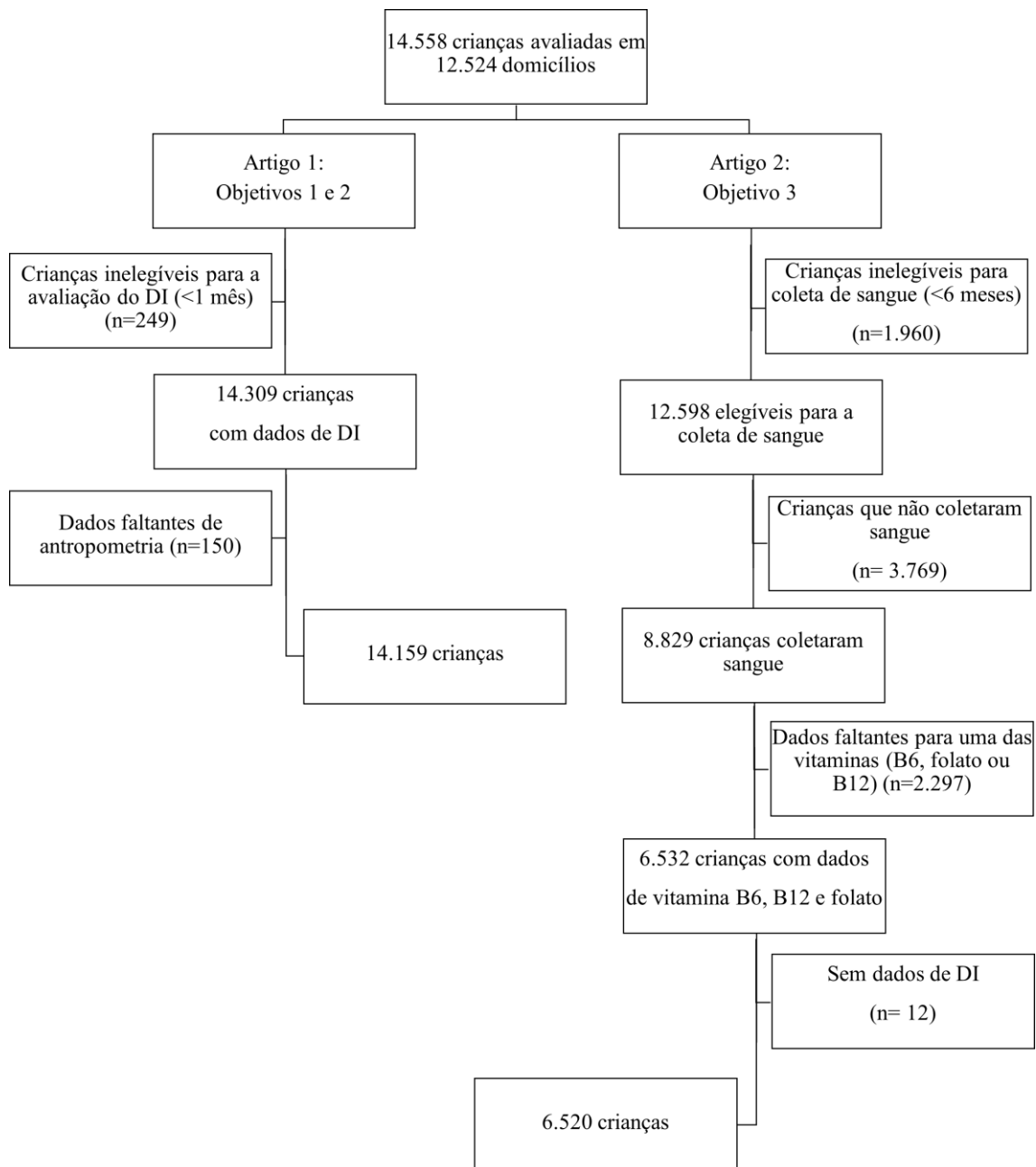


Figura 4. Fluxograma de acordo com os objetivos específicos.

Nota: DPI: desenvolvimento na primeira infância.

4.2 Coleta de dados

A coleta de dados foi executada pela Sociedade para o Desenvolvimento da Pesquisa Científica (Science), uma entidade sem fins lucrativos fundada por docentes da Escola Nacional de Ciências Estatísticas (ENCE) e do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), com experiência em coleta de dados em pesquisas nacionais e de base populacional.

Para a execução do estudo a equipe gerenciada pela Science contava com 323 entrevistadores, 30 supervisores de campo e 27 coordenadores estaduais. Os entrevistadores se dirigiam aos domicílios uniformizados com camisetas e crachás de identificação. Todo o processo de coleta de dados foi detalhado no relatório 1 do ENANI-2019 (UFRJ, 2021a) e descrito em Alves-Santos et al. (2021).

Para a coleta de dados os entrevistadores contavam com os seguintes equipamentos/documentos: mochila com equipamento de antropometria (antropômetro/infantômetro e balança digital), materiais impressos com orientações para a coleta de sangue, álbum fotográfico de quantificação alimentar infantil (CRISPIM; KAC; LACERDA; CASTRO, 2018) e carta de apresentação da pesquisa, o dispositivo móvel de coleta de dados e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ALVES-SANTOS; CASTRO; ANJOS; LACERDA *et al.*, 2021; UFRJ, 2021a).

Ao chegar no domicílio, o entrevistador se identificava, e apresentava a pesquisa com o auxílio de cartazes/panfletos sobre o ENANI-2019. O entrevistador relatava os objetivos da pesquisa e o que compreendia a participação do entrevistado. Caso o responsável do domicílio concordasse em participar, o TCLE era lido e assinado pelo participante e pelo entrevistador. Em seguida, a entrevista seguia com os blocos de perguntas da pesquisa (**Quadro 4**). O respondente era preferencialmente a mãe ou responsável legal da criança (UFRJ, 2021a).

Quadro 4. Sequência de blocos/questionários Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil de 2019 (ENANI-2019).

Bloco	Descrição
Bloco A	Sistema de controle
Bloco B	Lista de Moradores (Identificação de moradores)
Bloco C	Identificação da mãe das crianças menores de cinco anos e informações para contato
Bloco D	Características sociodemográficas das crianças
Bloco E	Alimentação da criança
Recordatório de 24 horas	Chamada do Recordatório de 24 horas
Bloco F	Suplementos e vitaminas em uso
Bloco G	Suplementos e vitaminas nos últimos 6 meses
Bloco H	Gestação, nascimento e saúde
Bloco I	Desenvolvimento na primeira infância
Bloco J	Informações sobre o responsável pela criança
Bloco K	Natalidade, pré-natal e informações sobre a criança mais nova que participa da pesquisa
Bloco L	Escala de insegurança alimentar
Bloco M	Culinária doméstica
Bloco N	Ambiente alimentar doméstico
Bloco O	Ambiente alimentar comunitário
Bloco P	Características do domicílio
Bloco Q	Benefícios e rendimentos dos moradores
Bloco R	Indicador Econômico Nacional (IEN)
Bloco S	Antropometria das crianças
Bloco T	Antropometria da mãe
Bloco U	Dados da coleta de sangue
Bloco X	Final da entrevista
Bloco W	Agendamento de nova visita ao domicílio

A coleta de dados era realizada utilizando um dispositivo móvel que contava com sistema de Questionário Eletrônico desenvolvido no software *Census Survey Processing System* (CSPro) que permitia o preenchimento inteligente dos questionários, considerando pontos de cortes, restrição de caracteres e alertas para o não preenchimento, quando desnecessário, ou de forma incorreta, garantindo assim melhor controle de qualidade para a coleta de dados (UFRJ, 2021a).

No primeiro dia, a entrevista era concluída no bloco T – antropometria da mãe, e as orientações e o agendamento para a coleta de sangue era realizado. No segundo dia, portanto, o entrevistador retornava ao domicílio junto a equipe de coleta de sangue (**Figura 5**).

Mais detalhes sobre a aplicação e as questões usadas foram descritas no manual do questionário geral (<https://enani.nutricao.ufrj.br/index.php/materiais/>) e no Relatório 1 do ENANI-2019 (UFRJ, 2021a).

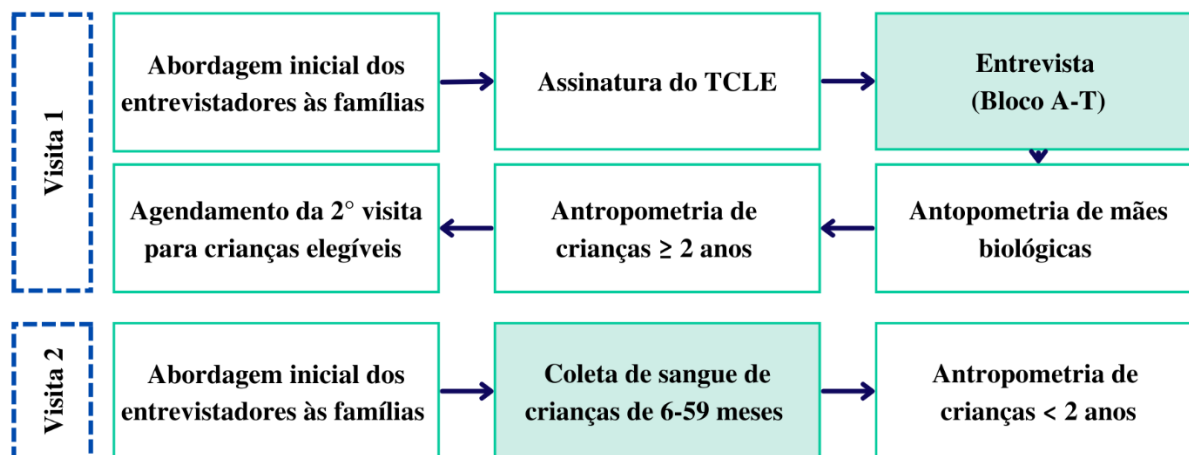


Figura 5. Etapas da coleta de dados ENANI-2019.

Fonte: Adaptado de (ALVES-SANTOS; CASTRO; ANJOS; LACERDA *et al.*, 2021).

Nota: TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido.

4.3 Variáveis de interesse

4.3.1 Desenvolvimento na primeira infância (DPI)

Para a avaliação do DPI foi utilizado o questionário Marcos de desenvolvimento do *Survey of Well-being of Young Children* versão brasileira (SWYC-BR). O instrumento original foi criado em 2011 e validado em 2013 para a população americana (SHELDRIK; PERRIN, 2013). O SWYC-BR foi traduzido, adaptado e validado para a população brasileira em 2019 (GUIMARÃES, 2020; MOREIRA, 2016; MOREIRA; MAGALHÃES; SIQUEIRA; ALVES, 2019).

Moreira et al. (2019) avaliaram a validade interna (Alfa de Cronbach = 0,97) e convergente (Variância Média Extraída – VME = 0,73) e a análise fatorial unidimensional (Kaiser-Meyer-Olkin - KMO = 0,97) do SWYC-BR e concluíram que o instrumento apresentava excelente validade interna (Alfa de Cronbach $\geq 0,9$), ajuste adequado para a análise fatorial (KMO $> 0,5$) e adequada validade convergente (VME $> 0,5$).

A avaliação da validade interna (Alfa de Cronbach=0,97) e a análise bifatorial foram executadas considerando a amostra representativa da população brasileira avaliada no ENANI-2019. O SWYC-BR apresentou excelente validade interna (Alfa de Cronbach $\geq 0,9$) (LANDIS; KOCH, 1977) e o modelo de dois fatores demonstrou melhor ajuste,

comparado ao modelo de um e três fatores. Esses resultados estão em consonância ao que foi observado no estudo de Sheldrick & Perrin (2013).

O SWYC é um questionário de triagem para alterações no desenvolvimento e comportamento infantil e projetado para ser respondido por pais/cuidadores. O instrumento é de fácil e rápida aplicação e conta com 10 perguntas curtas com três opções de resposta: Ainda não; um pouco; muito. Além disso, o SWCY-BR não necessita de kit de materiais ou especialistas para sua aplicação, permitindo a sua utilização em inquéritos populacionais, como o ENANI-2019. O questionário do SWCY-BR conta com 54 diferentes marcos de desenvolvimento, ou seja, atividades a serem alcançadas pela criança (**Anexo 1**). Para cada uma das 12 faixas etárias, um conjunto de 10 marcos são avaliados (**Anexo 1; Quadro 5**).

Quadro 5. Faixas etárias para o questionário de marcos do desenvolvimento do SWYC-BR.

Questionário SWYC-BR (meses)	Faixa etária (meses)
2	1 - 3
4	4 - 5
6	6 - 8
9	9 - 11
12	12 - 14
15	15 - 17
18	18 - 22
24	23 - 28
30	29 - 34
36	35 - 46
48	47 - 58
60	59 - 65

Fonte: Adaptado de “Survey of Well-being of Young Children (SWYC-BR): manual de aplicação e interpretação (ALVES, 2021).

A identificação da faixa etária adequada para cada criança avaliada no estudo era automaticamente selecionada pelo sistema de coleta de dados, a partir da idade das crianças do domicílio relatada antes da aplicação do questionário. Em caso de crianças nascidas prematuras (idade gestacional no parto <37 semanas) e menores de 24 meses, a idade cronológica era corrigida para a seleção do questionário apropriado, conforme feito em Sheldrick & Perrin (2013) e Sheldrick et al. (2019). A idade corrigida foi calculada subtraindo a idade gestacional no nascimento de 40 semanas (nascimento a termo). Em seguida, subtraía-se o resultado da idade cronológica da criança no dia da entrevista. Por

exemplo, para uma criança nascida com 32 semanas de gestação, com idade cronológica de 4 meses e 10 dias (132 dias) no momento da entrevista, subtraiu-se 8 semanas da idade cronológica da criança ($40-32 = 8$ semanas = 56 dias). Em seguida, o questionário foi definido de acordo com a idade corrigida ($132-56 = 76 \sim 2$ meses e 16 dias). O questionário foi aplicado pelo entrevistador, e o respondente era a mãe ou responsável pela criança com ou sem ajuda de outras pessoas, como babás e cuidadores.

A interpretação do resultado do SWYC-BR pode ser feita de duas formas: usando pontos de corte, previamente validados (GUIMARÃES, 2020), o que implica no uso da variável de forma categórica, ou estimando a idade de desenvolvimento. Nesse caso é necessário calcular o quociente de desenvolvimento (QD) que considera a divisão da idade de desenvolvimento pela idade cronológica. Essa forma de cálculo permite a avaliação da variável de forma contínua (SHELDRIK; SCHLICHTING; BERGER; CLYNE *et al.*, 2019). Em 2019, o QD foi proposto por Sheldrick et al. (2019) com o intuito de avaliar o DPI sem a necessidade de usar pontos de corte. Para implementar essa estratégia, a idade de desenvolvimento é estimada com base na idade em que a maioria das crianças atinge cada marco do desenvolvimento avaliado por meio do modelo de teoria de resposta ao item e o modelo de resposta gradual (SHELDRIK; SCHLICHTING; BERGER; CLYNE *et al.*, 2019). Esse método permite a avaliação de cada item e não apenas da pontuação final, que pode ser influenciada pelo conjunto de itens definidos para cada faixa etária. Dentre os diferentes conjuntos de itens pode haver uma desproporção no número de atividades mais facilmente realizadas e outras menos. Portanto, podendo tornar mais fácil atingir a pontuação máxima da escala para algumas faixas etárias. Além disso, a utilização de um escore permite que o desfecho seja analisado como uma variável contínua. Mais detalhes sobre os modelos estatísticos utilizados para a obtenção do QD foram descritos na seção de análise estatística (seção 4.5).

Frente ao exposto, optou-se por avaliar o DI por meio do cálculo do QD. Os autores também sugerem a sua interpretação, $QD=1$ indica a realização dos marcos esperados para a idade, valores < 1 e > 1 sugerem o alcance dos marcos esperados para a idade abaixo e acima das expectativas, respectivamente (SHELDRIK; SCHLICHTING; BERGER; CLYNE *et al.*, 2019).

4.3.2 Estado nutricional de vitamina B6, B9 e B12

No primeiro dia de coleta de dados, ao finalizar a aplicação dos blocos A-T (Quadro 4), o entrevistador realizava as orientações e o agendamento para a coleta de sangue em crianças entre 6 e 59 meses de idade.

As famílias eram orientadas sobre a dispensa do jejum, ou seja, as crianças não precisavam ficar sem comer ou beber água e outros líquidos e o consumo de medicamentos de uso regular deveriam ser mantidos. Além disso, os entrevistadores forneciam os esclarecimentos sobre o laboratório de análises clínicas e o material usado para a coleta de sangue, conforme sugestão de abordagem contida no manual de aplicação do questionário geral do ENANI-2019 (CASTRO; NORMANDO; ALVES-SANTOS; BEZERRA *et al.*, 2021; UFRJ, 2021a) (**Quadro 6**). Adicionalmente, os pais/cuidadores eram informados sobre os procedimentos para o acesso ao resultado dos exames pelo site do ENANI-2019 (www.enani.nutricao.ufrj.br), e-mail, redes sociais ou impresso via correio, quando solicitado no dia da entrevista.

Quadro 6. Orientação e esclarecimentos sobre a coleta de sangue.

Sugestão de abordagem para orientações para a coleta de sangue domiciliar

“Agora vou dar mais algumas informações sobre como será o exame de sangue. Como eu falei no início da entrevista, vamos coletar um pouco de sangue do braço do seu (sua) filho(a). Essa coleta será feita por um laboratório de análises clínicas, e a pessoa que vai coletar o sangue tem muita experiência em fazer exame de sangue em crianças. Todos os materiais usados na coleta do sangue são descartáveis. Seu (sua) filho(a) não precisa fazer jejum ou deixar de beber água e outros líquidos para fazer o exame. Se ele (ela) toma algum remédio, ele pode ser usado normalmente. No dia do exame de sangue eu venho a sua casa junto com o coletador de sangue. Nesse folheto (entregar o folder) estão todas as informações sobre como o exame de sangue vai ser feito e sobre como você vai receber os resultados dos exames de sangue e da avaliação do peso e altura”.

Fonte: (UFRJ, 2021a)

Em seguida, o entrevistador realizava o agendamento da coleta de sangue via telefone com o laboratório responsável na região. Os procedimentos para coleta de sangue foram executados por laboratórios parceiros do laboratório central de análises clínicas

Diagnóstico do Brasil (DB). Para isso, os laboratórios passaram por uma rigorosa seleção, que contava com itens como equipe treinada para a coleta de sangue em domicílio e para a coleta de sangue em crianças menores de cinco anos, possuir unidades próximas aos setores censitários estudados, horários de coleta flexíveis e realizar hemogramas em sua rotina, em equipamento que avaliasse 18 parâmetros (série vermelha, série branca e plaquetas) (UFRJ, 2021b).

Um dia antes da data agendada, o entrevistador confirmava a coleta de sangue com os responsáveis da criança por meio de contato telefônico. O entrevistador e a equipe do laboratório parceiro iam ao domicílio na data e hora previamente agendadas, com um intervalo de no máximo 48 horas da primeira visita.

Foram coletados 8 mL de sangue por meio de punção venosa com seringa, alocados em um tubo trace (6 mL) e um tubo EDTA (2 mL). Os tubos eram etiquetados com o código de barras com o registro da criança e o tubo trace envolvido em papel alumínio, a fim de garantir a estabilização da amostra para análises fotossensíveis. Quando não foi possível punccionar 8 mL o preenchimento do tubo EDTA (2 mL) era priorizado. O material era acondicionado a temperatura de 2-8° C em uma caixa térmica e levada até o laboratório parceiro.

No laboratório parceiro, as amostras eram cadastradas no sistema do DB (DB fácil) em até duas horas após a coleta. Em seguida o tubo trace era centrifugado e o soro aliquoteado em um novo tubo trace envolvido também com papel alumínio e acondicionado a temperatura de congelamento (-20°C). Uma alíquota de 0,5 mL também foi retirada do tubo EDTA e armazenada em tubo âmbar seco sob a mesma temperatura. O restante de sangue no tubo EDTA era destinado a avaliação do hemograma. Em seguida as amostras de sangue e soro eram transportadas até a unidade do DB em São José dos Pinhais, onde as análises foram realizadas. Em casos em que a estimativa de tempo de transporte do laboratório parceiro para São José dos Pinhais ultrapasse 24 horas, o hemograma foi realizado em umas das outras unidades produtivas do DB (Recife ou Sorocaba) ou pelo laboratório parceiro.

Para a avaliação do estado nutricional de B6 foi utilizado sangue total e dosado por meio da cromatografia líquida de alta performance (HPLC, sigla do inglês *High-performance liquid chromatography*) com detecção de fluorescência (HPLC, Chromsystems, Gräfelfing, Alemanha). Para avaliar B9 e B12 sérico foram usados ensaios imunozimáticos de quimiluminescência (DxI 800, Beckman Coulter, Brea, EUA).

O estado nutricional para os micronutrientes estudados foi classificado de acordo com o **Quadro 7**.

Quadro 7. Classificação do estado nutricional para os micronutrientes estudados.

Estado nutricional	Parâmetro laboratorial	Ponto de corte	Classificação
Vitamina B6 ¹ (nmol/L)	Piridoxal-5-Fosfato plasmático	< 93,06	1° tercil
		≥ 93,06 e < 144,04	2° tercil
		≥ 144,04	3° tercil
		< 20	Insuficiência
		≥ 20	Suficiência
Vitamina B9 ² (nmol/L)	Folato sérico	< 10	Deficiência
		≥ 10	Adequado
		< 45,3	Sem excesso
		≥ 45,3	Excesso
Vitamina B12 ³ (pmol/L)	B12 sérica	< 150	Deficiência
		≥ 150	Adequado

Fonte: ¹(ROSE; GYÖRGY; BUTLER; ANDRES *et al.*, 1976; TARR; TAMURA; STOKSTAD, 1981) ²(DE BENOIST, 2008); ³(WHO, 2015)

4.3.3 Uso de suplementos vitamínicos e/ou minerais

O uso de suplementos vitamínicos e/ou minerais foi avaliado nos blocos F e G, para uso atual e nos últimos seis meses, respectivamente. O uso de suplementos (sim/não), descrição (nome), a indicação, o tempo de uso (meses), a frequência semanal, a dose e o motivo de uso (doença, para ficar forte/saudável/crescer melhor) foram avaliados tanto para o consumo atual como nos últimos seis meses. Adicionalmente, a participação de programas nacionais como o de megadose de vitamina A e o NutriSUS também foram investigados.

4.3.4 Consumo de fontes dietéticas de vitamina B6, B12 e folato

O consumo alimentar foi avaliado por meio do recordatório de 24 horas (R24h). O R24h foi aplicado apenas uma vez devido a restrições logísticas e de custo. Os dados foram coletados por meio do Aplicativo Recordatório Alimentar de 24 horas (AppR24h) e do Manual Fotográfico de Quantificação Alimentar Infantil com fotos de 101 alimentos com porções elaboradas especificamente para avaliação da alimentação infantil

(CRISPIM; KAC; LACERDA; CASTRO, 2018), ambos desenvolvidos pela equipe de pesquisa do ENANI-2019.

A aplicação do R24h seguiu a abordagem da técnica de múltiplos passos recomendada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (MOSHFEGH; RHODES; BAER; MURAYI *et al.*, 2008). Essa abordagem consiste em cinco etapas na seguinte ordem: 1) relato da lista de alimentos consumidos pela criança no dia anterior; 2) questionamento sobre uma lista de alimentos comumente esquecidos (refrigerante, suco, leite materno, bala, biscoito, pão, açúcar, mel, entre outros); 3) preenchimento do horário e tipo de refeição para cada alimento citado nas etapas anteriores; 4) detalhamento de cada alimento (tipo de preparo, local onde foi feita a refeição e quantidade/unidade consumida); 5) Revisão das informações fornecidas pela mãe/cuidador.

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA) foi utilizada para definir o valor nutricional dos alimentos consumidos. A TBCA possui 34 componentes dietéticos de mais de 4.600 itens alimentares, incluindo alimentos in natura, preparações culinárias e alimentos industrializados. A confiabilidade dos dados do TBCA é assegurada pelo cumprimento das normas da *International Network of Food Data Systems* (Infoods) e da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO/ONU), que determinam diretrizes e critérios a serem utilizados na geração, compilação e uso de dados de composição de alimentos (INFOODS). A TBCA está disponível gratuitamente online em: <https://www.tbca.net.br/>.

A conversão das medidas caseiras e das unidades de alimentos consumidos em unidades de massa (g, mg, mcg) foi realizada por meio da Tabela de Medidas Referenciadas para o Consumo Alimentar no Brasil (PINHEIRO; LACERDA; BENZECRY; GOMES *et al.*, 2008) e da Tabela de Avaliação do Consumo Alimentar em Medidas Domésticas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011). Caso algumas medidas não fossem identificadas nessas referências, a equipe do ENANI-2019 pesava os alimentos de acordo com a medida caseira informada. Por fim, foi realizada análise de consistência das variáveis e limpeza do banco de dados para identificar dados faltantes e determinar os casos a serem corrigidos.

A ingestão dietética de vitaminas foi classificada como adequada e inadequada de acordo com as recomendações dietéticas e ingestão adequada para cada faixa etária (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998). Os seguintes pontos de corte foram usados: B6 (0,3, 0,5 e 0,6 mg para 6-11, 12-47 e 48-59 meses, respectivamente); B12 (0,5, 0,9 e 1,2

mcg para 6-11, 12-47 e 48-59 meses, respectivamente) e folato (80, 150 e 200 mcg para 6-11, 12-47 e 48-59 meses, respectivamente).

4.3.5 Consumo de alimentos ultraprocessados

O consumo de alimentos ultraprocessados foi avaliado a partir de um questionário estruturado com 40 itens sobre a alimentação da criança no dia anterior. Os itens selecionados para este questionário tinham o intuito de avaliar marcadores de consumo alimentar saudáveis e não saudáveis, de forma mais rápida, comparada ao tempo de processamento dos dados do recordatório de 24 horas. A lista de itens avaliados está contida no **Anexo 2**. A estrutura da pergunta era: “[nome da criança] comeu [tipo de alimento] ontem?” As opções de resposta foram: “sim”, “não” e “não sabe/não quis responder”. Mais detalhes sobre esse questionário podem ser encontrados em (LACERDA; BOCCOLINI; ALVES-SANTOS; CASTRO *et al.*, 2021).

O consumo de ultraprocessados foi considerado quando a criança recebeu um ou mais alimentos ultraprocessados no dia anterior à entrevista (BRASIL, 2014; 2016b). Os seguintes alimentos foram considerados ultraprocessados: refrigerantes; outras bebidas açucaradas (suco industrializado, suco de caixinha, água de coco de caixinha, guaraná natural ou xarope de guaraná, refrigerante de groselha, suco em pó ou suco de fruta natural com adição de açúcar); lanches embalados (incluindo batatas fritas); biscoito/bolacha doce ou salgado; guloseimas (bala, pirulito, outros); iogurtes; pão industrializado (pão de forma, pãozinho, pão de hambúrguer); farinhas instantâneas de arroz, milho, trigo ou aveia; carnes processadas (hambúrguer, presunto, mortadela, salame, nugget, linguiça); e macarrão instantâneo.

4.3.6 Variáveis socioeconômicas

As variáveis sociodemográficas foram obtidas por meio de questionário estruturado contidos nos blocos D, J, P e Q (**Quadro 4**). Variáveis maternas como situação conjugal (vive com o companheiro/não), ocupação (trabalhando/desempregada/dona de casa/estudante/outro) e escolaridade materna (0-7, 8-10, ≥ 11 anos), além de infantis como raça/ cor e sexo, foram avaliadas. Adicionalmente, a frequência com que as crianças usaram creches/pré-escolas e o seu tipo (particular/pública) também foram coletadas. Foram coletadas informações referentes a

condição de ocupação do domicílio (próprio/alugado/emprestado/outra condição) e acesso a serviços básicos, como tipo de abastecimento de água (rede de distribuição/poço ou nascente/outro) e esgotamento sanitário (rede de esgoto/fossa seca ou rudimentar/vala/outro).

A participação de programas de transferência de renda (sim/não) e o benefício (nome do programa) também foram avaliados. A renda familiar per capita (salários-mínimos) foi calculada a partir da renda familiar total do domicílio dividida pelo número de moradores do domicílio. Em seguida, a renda foi categorizada em $< 0,25$, $0,25-0,49$, $0,5-1$ e >1 salários-mínimos, segundo valores de maio de 2019 (R\$ 998,00). Em seguida, o valor de cada uma das categorias foi convertido para a cotação do dólar em 30 dezembro de 2019 (R\$ 4,013 = USD 1), para melhor entendimento dos leitores dos periódicos internacionais onde os resultados foram/ serão publicados.

4.3.7 Variáveis da gestação, nascimentos e saúde infantil

Informações do nascimento como idade gestacional (semanas), peso ao nascer (gramas) e tipo de parto (normal/cesariana agendada (eletiva)/cesariana de urgência), e acesso a serviço de saúde (público em unidade primária de saúde/público (outro nível)/particular/outro) foram coletadas por meio do bloco H do questionário estruturado, onde a mãe/ cuidador referia as informações referentes a gestação, nascimento e saúde da criança. O percentil do peso ao nascer de acordo com a idade gestacional ao nascer e o sexo foi calculado utilizando as recomendações do *International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century (Intergrowth-21st)*. Esses percentis foram classificados em pequenos para a idade gestacional (PIG $<$ percentil 10), adequados para a idade gestacional (AIG percentil 10-90) e grandes para a idade gestacional (AIG $>$ percentil 90) (VILLAR; CHEIKH ISMAIL; VICTORA; OHUMA *et al.*, 2014).

4.3.7 Variáveis antropométricas infantis

A avaliação antropométrica foi realizada por meio da aferição do comprimento/ altura e do peso da criança. Para a avaliação do peso de crianças menores de dois anos foram utilizadas balanças pediátricas (modelo SECA® 336, capacidade 15 kg e precisão de 5 a 10 g) e para crianças maiores de dois anos balanças de plataforma (modelo SECA® 813, capacidade 200 kg e precisão de 100 g). Para avaliação do comprimento/ estatura de

crianças menores de dois anos foram utilizados infantômetros (SECA® 417, capacidade 10 a 100 cm e precisão de 0,1 cm) e para crianças maiores de dois anos um estadiômetro (SECA® 213, capacidade 40 a 205 cm e precisão de 0,1 cm).

Os índices de altura para a idade e índice de massa corporal (IMC) para idade foram calculados considerando o sexo e a idade (dias) da criança no dia da avaliação antropométrica (escore-z). Os índices foram classificados de acordo as recomendações da OMS descritos no **Quadro 8**.

Quadro 8. Classificação do estado nutricional antropométrico.

Índice	Escore-Z	Classificação
Altura/idade	< -2	Baixa estatura
	≥ -2	Estatuta adequada
IMC/idade	< -2	Magreza
	$-2 \leq Z \leq 1$	Eutrofia
	$1 < Z \leq 2$	Risco de sobrepeso
	> 2	Excesso de peso

Fonte: (BRASIL, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006)

4.4 Questões éticas

O ENANI-2019 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) - CAAE 89798718.7.0000.5257. A participação do estudo foi condicionada a assinatura de um TCLE assinado pelo responsável da criança. Adicionalmente, toda a pesquisa está em acordo com os princípios éticos de não maleficência, beneficência, justiça e autonomia (resolução 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde).

4.5 Análises estatísticas

A análise estatística compreendeu três etapas: estimação da idade de desenvolvimento e cálculo do QD, análise descritiva e modelos múltiplos para a estimação da relação entre as variáveis de exposição com o QD.

A idade de desenvolvimento foi estimada usando a teoria de resposta ao item e o modelo de resposta gradual. Essa etapa foi realizada no software Mplus versão 7 (Los Angeles, EUA) (MUTHÉN, (1998-2015)), no qual o modelo de resposta gradual é

implementado com o método de *full information* (Muthén (1998-2015)). Esse modelo estima a resposta para marcos de desenvolvimento ausentes com base na idade cronológica e nos marcos avaliados, permitindo obter a curva característica do item (CCI) para cada marco, representando a mudança na probabilidade de uma determinada resposta (às vezes ou sempre) do nascimento aos 62 meses de idade, e estimar a idade de desenvolvimento.

O modelo resulta na CCI e dois parâmetros (α e β). α_1 e α_2 referem-se à idade provável em que a criança atinge cada marco do desenvolvimento, realizando-os algumas vezes (α_1) e sempre (α_2). β refere-se à discriminação de cada marco. CCI, α_1 , α_2 e β permitiram estimar a idade do desenvolvimento de acordo com os marcos do desenvolvimento alcançados por cada criança.

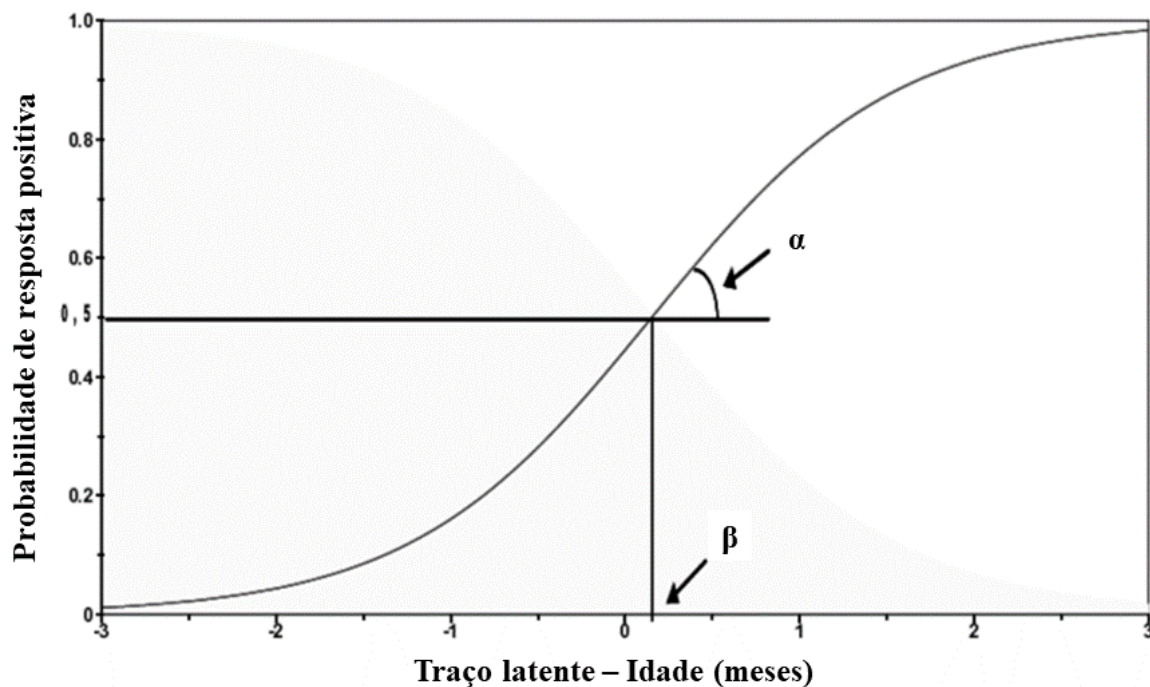


Figura 6. Curva característica do item (CCI).

Fonte: adaptado de (SARTES; SOUZA-FORMIGONI, 2012)

Nota: α : probabilidade de resposta positiva para cada item; β : discriminação de cada item avaliado.

A estimativa de idade de desenvolvimento foi realizada *offline* no Mplus para o banco de dados completo (n=14.309), excluindo apenas crianças menores de 1 mês que não eram elegíveis para responder o SWCY-BR e considerando o desenho do estudo e os pesos amostrais. Em seguida, essa variável foi incorporada ao arquivo R de dados do ENANI-2019 e o QD foi calculado. As demais análises foram realizadas de forma remota

na plataforma *Jupyter*, que permite acesso aos dados do ENANI-2019 armazenados no repositório e servidor do Observatório de Epidemiologia Nutricional da UFRJ. O software R, já inserido na plataforma do *Jupyter* e os pacotes *srvyr* e *survey* foram utilizados para essa etapa (ELLIS; SCHNEIDER, 2022; LUMLEY, 2020; R CORE TEAM, 2020).

A avaliação da normalidade das variáveis foi feita usando a inspeção gráfica. A análise descritiva foi realizada usando média do QD e intervalo de confiança de 95%. O coeficiente de variação (CV) foi utilizado para avaliar a homogeneidade do conjunto de dados. CV é uma medida de dispersão obtida pela razão entre o erro padrão e o valor estimado para cada indicador. $CV < 30\%$ foi estabelecido como nível de precisão adequado para indicadores e variáveis avaliados no ENANI-2019. Caso contrário, a interpretação dos resultados deve ser cautelosa. Todas as estimativas apresentadas neste trabalho tiveram $CV < 30\%$. Gráficos de barras, box-plots e dispersão foram usados para melhor visualização das variáveis estudadas.

Para os objetivos 1 e 2, a estrutura conceitual proposta por Black et al. (2017) (**Figura 1**) foi usada para aplicação do ajuste hierarquizado do modelo de regressão linear (VICTORA; HUTTLY; FUCHS; OLINTO, 1997). Essa técnica impede a subestimação dos efeitos de fatores de nível distal em um modelo teórico. As variáveis coletadas no ENANI-2019 foram dívidas em níveis proximais e distais do desfecho (DPI, medido pelo QD), conforme descrito no **Quadro 9**.

Quadro 9. Classificação das variáveis de acordo com o modelo conceitual¹.

Modelo hierarquizado para fatores associados ao desenvolvimento na primeira infância	
Nível proximal: <i>Nurturing care</i>	
- Peso ao nascer/ idade gestacional ²	Pequeno para idade gestacional (<P10) Adequado para idade gestacional (P10-P90) Grande para idade gestacional (>P90)
- Tipo de parto	Vaginal Parto cesárea planejado ou eletivo Parto cesárea de emergência
- Acesso a serviço de saúde	Público (unidade de atenção primária) Público (outro nível de atenção) Privado
- Consumo de ultraprocessados (alimentos) ³	Sim (≥ 1) Não (< 1)
- Baixa estatura/idade	Sim ($Z < -2$) Não ($Z \geq -2$)
- IMC/idade	Baixo peso ($Z < -2$) Eutrofia ($-2 \leq Z \leq 1$) Risco de sobrepeso ($1 < Z \leq 2$)

	Excesso de peso ($Z > 2$)
- Frequência em creches ou escolas	Pública Privada Não frequenta
Nível distal:	
Raça/cor	Branca Parda Preta
Sexo	Masculino Feminino
- Estado marital materno	Vive com o companheiro Vive sem o companheiro
- Escolaridade materna (anos)	0-7 8-10 ≥ 11
- Abastecimento de água	Rede de distribuição Poço, nascente, ou outro
- Tratamento de esgoto	Rede de esgoto Fossa séptica Vala, descartada em rios, lagos, mar ou outros
- Renda familiar per capita (salários-mínimos/ dólares dos Estados Unidos) ⁴	< 0,25 (< 62.2) 0,25 – 0,5 (62.2–124.4) 0,5 - 1 (124.5–248.7) >1 (> 248.7)
- Ocupação materna	Trabalhando Desempregada Dona de casa Estudante Outro
- Tipo de habitação	Casa própria Alugado Emprestada Outra condição
- Participação no programa Bolsa Família	Sim Não, recebe outro benefício Não, não recebe nenhum benefício

Nota: ¹ Proposto por Black et al. 2017. ² Peso ao nascer segundo percentis específicos de sexo e idade gestacional usando as tabelas INTERGROWTH-21st. FIG, Pequeno para idade gestacional (< P10); AIG, Adequado para idade gestacional (P10-P90); e GIG, Grande para idade gestacional (> P90). ³ Se a criança recebeu um ou mais alimentos ultraprocessados no dia anterior à entrevista. Foram considerados ultraprocessados os seguintes alimentos: refrigerantes, outras bebidas açucaradas (sucos industrializados em caixinha, água de coco em caixinha, guaraná natural ou xarope de guaraná, bebida de groselha, suco de fruta em pó, fruta natural, suco com adição de açúcar); salgadinhos embalados (incluindo batatas fritas); biscoitos, bolachas; doces, pirulitos e outros doces; pão industrializado; farinhas instantâneas (arroz, milho, trigo ou aveia); carnes processadas (hambúrguer, presunto, mortadela, salame, nuggets, salsicha, cachorro-quente); temperos industrializados; e macarrão instantâneo. ⁴ Estimado a partir do salário mínimo brasileiro em 2019 (R\$ 998,00) e convertido para a cotação do dólar (R\$ 4,013 = \$ 1) em 30 de dezembro de 2019.

Inicialmente, um modelo de regressão linear múltiplo foi executado para cada um dos níveis. As variáveis que apresentaram significância estatística $<0,20$ foram mantidas no modelo. Em seguida, essas variáveis ($p\text{-valor}<0,20$) de cada um dos níveis foi adicionada ao modelo geral em blocos, com base nos níveis: 1º distal, seguindo o 2º proximal: variáveis *Nurturing care*. Nessa etapa, os preditores associados ao QD com significância estatística $\leq 0,05$ foram mantidos no modelo para a inserção das variáveis do bloco seguinte, até que se atingisse o modelo final. A interpretação de cada um dos níveis foi feita antes da inserção do bloco de variáveis seguintes.

Para o objetivo 3 (artigo 2), referente a avaliação do estado nutricional de vitamina B6, B12 e folato, um banco de dados com peso amostral ajustado foi utilizado. No ENANI-2019, o ajuste nos pesos amostrais foi realizado para diferentes subconjuntos de biomarcadores, a fim de compensar a não resposta (para todos os biomarcadores) e parcial (para algum subconjunto de biomarcadores) (VASCONCELLOS; SILVA; CASTRO; BOCCOLINI *et al.*, 2021). Dessa forma, foram criados 25 grupos de crianças com diferentes subconjuntos de dados de biomarcadores sanguíneos com a implementação de pesos amostrais estimados para cada um desses subconjuntos (**Anexo 3**). Detalhes desse processo estão descritos em Vasconcellos *et al.* (2021) e no Relatório 1 do ENANI-2019 (UFRJ, 2021a). O subconjunto 9B, que compreende o ajuste do peso amostral para os biomarcadores: Ácido fólico, hemoglobina, ferritina, proteína C reativa (PCR), vitaminas B12, D, A, B1 e B6, zinco e selênio, foi utilizado para a análise de dados do artigo 2.

Para avaliar a associação entre idade cronológica e QD foi utilizada regressão linear. Interações entre idade cronológica e estado de vitamina B6, folato e vitamina B12 com o QD também foram avaliadas, buscando identificar comportamentos diferentes para o QD com a idade entre as diferentes categorias de estado nutricional. Regressões lineares múltiplas foram usadas para avaliar a associação entre concentrações de vitamina B6, B12 e folato e o QD.

O gráfico acíclico direcionado (DAG, do inglês *Directed Acyclic Graph*) foi utilizado para definir o melhor ajuste para a relação entre as vitaminas e o DI (TENNANT; MURRAY; ARNOLD; BERRIE *et al.*, 2021). As variáveis sugeridas no DAG para ajuste no modelo múltiplo foram estado materno para as vitaminas de interesse durante a gravidez e pós-parto, amamentação, escolaridade materna e fontes alimentares das vitaminas. O estado materno para as vitaminas não foi avaliado, e os dados de amamentação foram coletados apenas para as crianças de 0 a 23 meses. Portanto, todos

os modelos foram ajustados para escolaridade materna e fontes alimentares de vitaminas. Devido à importância da faixa etária no DI, a interação da concentração de vitamina e idade cronológica da criança (6-23 e 24-59 meses) também foi avaliada nas regressões das vitaminas B6, B12 e folato com o QD.

Os intervalos de confiança foram comparados para avaliar a diferença entre os grupos, e a significância estatística foi considerada quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

Artigo 1

Factors associated with early childhood development: Results from the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019)

Authors: Nathalia Cristina Freitas-Costa¹; Dayana Rodrigues Farias¹, Nadya Helena Alves-Santos², Raquel Machado Schincaglia³, Paula Normando¹; Inês Rugani Ribeiro de Castro⁴; Elisa Maria de Aquino Lacerda¹, Sandra Crispim⁵, Alexandra Valeria Maria Brentani⁶, Claudia Regina Lindgren Alves⁷, Gilberto Kac¹.

Affiliations

1- Nutritional Epidemiology Observatory, Institute of Nutrition Josué de Castro, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; 2- Institute of Health Sciences, Federal University of Pará, Belém, Brazil; 3- Faculty of Nutrition, Federal University of Goiás, Goiás, Brazil; 4- Institute of Nutrition, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; 5- Department of Nutrition, Federal University of Paraná, Paraná, Brazil; 6- Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil; 7- Department of Pediatrics, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the association between distal and proximal variables and developmental quotient (DQ).

Study design: This is a population-based household survey.

Methods: Data from 14,159 children <5 years were evaluated in the Brazilian National Survey on Child Nutrition. The Survey of Well-being of Young Children - Brazilian version milestones questionnaire was used to evaluate early childhood development. The developmental age was estimated using the graded response models. DQ was calculated by dividing developmental age and chronological age. The expected age milestones are attained when DQ=1. DQ predictors were defined considering distal and proximal levels/variables using a multiple linear regression model and a hierarchical approach.

Results: The DQ mean was significantly lower among children aged 36-59 months (0.91 [0.88-0.93]), boys (1.03[1.01-1.06]) and those from the North region (0.98[0.93-1.04]) compared to children aged 1-35 months (1.18[1.15-1.22]), girls (1.11[1.08-1.13]) and from the Southeast region (1.11[1.07-1.16]). For children aged 1-35 months, DQ was inversely associated with emergency C-section ($\beta=-0.08$; $p<0.01$), consumption of ultra-processed food ($\beta=-0.33$; $p<0.01$), and positively associated with attendance at daycare/school (private: $\beta=0.09$; $p=0.02$; No: $\beta=0.12$; $p<0.01$). For children aged 36-59 months, attendance to private daycare/school ($\beta=0.08$; $p<0.01$) was positively associated with DQ, and small for gestational age at birth ($\beta=-0.05$; $p=0.01$), access to public health services (no- primary care) ($\beta=-0.07$; $p<0.01$) were inversely associated with DQ.

Conclusions: The ECD was predicted for adverse health, nutrition, and learning factors, that demonstrate an inequitable environment. These findings indicate a need for public policies to ensure social and health equity in early childhood.

KEYWORDS

Early childhood development; neurodevelopment; SWYC; children; lower-middle-income countries; national survey.

BACKGROUND

Early childhood development (ECD) is a complex process that comprises physical, cognitive, motor, and socioemotional growth of children up to 8 years of age. It is considered the critical basis for lifelong development, impacting educational performance, productivity at work, physical and mental health, and social well-being into adulthood¹⁻⁵. Children should be exposed to an environment sensitive to their health and nutritional needs. Besides, this environment should provide emotional support, stimulus, and responsiveness and be developmentally appropriate. In addition, there should be opportunities for play and exploration, as well as protection from adversity, to fully achieve the ECD⁵. This set of conditions is defined as the Nurturing Care Framework (NCF) by the World Health Organization (WHO) and is recommended as the focus for planning government actions and improving the development of children under five years as a society⁶. Moreover, the WHO recognizes that achieving full ECD potential is a human right and a requirement for global sustainable development⁶.

Children exposed to adversities in early childhood, such as poverty, inadequate nutrition, recurring illnesses, stunting, abuse, violence, lack of learning opportunities, such as no access to books, toys, and child daycare centers/preschools, and with no or insufficient access to health services may not reach their full ECD potential⁷⁻⁹. In low- and middle-income countries, children are at greater risk of not reaching their developmental potential. McCoy et al. estimated that 80.8 million children aged 36-59 months from 35 LMICs as part of the Multiple Indicator Cluster Survey (MICS) and Demographic and Health Surveys (DHS) programs had low cognitive and socioemotional development between 2005 and 2015¹⁰. Furthermore, the authors demonstrated associations between low development scores and stunting, poverty, male sex, rural residence, and lack of cognitive stimulation¹⁰. It is especially important, considering the

impact of social inequalities in the Nurturing Care dimensions, such as health, nutrition, security and safety, responsive caring and early learning.

The Brazilian children developmental status and its regional differences for the Brazilian population remain unknown. Local or non-representative studies of the Brazilian population with different approaches to assess child development have revealed a prevalence of development below expectations between 20-50%, varying with the location and age group evaluated ¹¹⁻¹⁷. Therefore, this manuscript aims to describe the developmental quotient (DQ) in a nationally representative sample of Brazilian children under five years according to the distal and proximal variables considering NCF, and examine the association between these variables and DQ.

METHODS

Study design and participants

This is a cross-sectional study developed with data from the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019), the first Brazilian household-based survey with national representation carried out to generate evidence on the diet and nutritional status of children under the age of 5 years¹⁸. Details and the steps for the sample calculation can be found in Vasconcelos et al. (2021).

Households with at least one child under five years of age were eligible to be included in the ENANI-2019 study population. The following were not eligible: (1) households with indigenous people who lived in villages; (2) households where foreigners reside, and Portuguese was not spoken; (3) children with conditions that disable them for anthropometric measurement; and (4) children residing in collective households such as hotels, pensions, orphanages, and hospitals.

The ENANI-2019 was conducted in a probabilistic sample of 12,524 households between February 2019 and March 2020. A total of 14,558 children under five years of age were evaluated. For the present study, data from 14,159 children were used, considering the ECD assessment does not apply to children <1 month (n= 279) and that 149 missing anthropometric data (n= 5 for height/length and 145 for weight) (**Figure S1**).

Early childhood development assessment

The Survey of Well-being of Young Children Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire was used to evaluate the ECD^{19,20}. The Brazilian version has been translated, adapted, and validated for use in Brazilian children^{20,21}. SWYC-BR is a questionnaire designed to screen for child developmental delays and behavioral problems based on reports from parents/caregivers. Its administration is easy and quick. The

SWYC-BR questionnaire has 10 short questions by age range with three answer options: not yet, somewhat, or very much. Overall, 54 milestones were evaluated through twelve sets of 10 age-specific items. Some of these items are repeated among the nearby age groups. Age range milestones set was applied to each age group, and data interpretation was defined by Sheldrick and Perrin (2013).

The ENANI-2019 data collection system automatically selected the appropriate developmental milestones set according to the child's age, which was obtained previously using the date of birth. For children under two years born prematurely (< 37 weeks of gestation), the corrected age was considered in selecting the appropriate questionnaire. The corrected age was calculated by subtracting the child's gestational age at birth from 40 weeks (full-term) and then subtracting the result from the child's chronological age at the moment of assessment. More details can be found in Freitas-Costa et al. (2023)²².

Developmental quotient

The developmental age was estimated using the item response theory and graded response models²³, using the Mplus software version 7 (Los Angeles, EUA), with the full information method and incorporating the complex sample design²⁴. The estimated model allowed the construction of an item characteristic curve (ICC) for each milestone, representing the change in the probability of a given response (sometimes or always) from birth to 62 months of age and estimating the developmental age. The analysis was extended to the chronological age of 62 months because the dataset has five children aged 59-62 months. This was due to the difference between the general interview and child development assessment dates. The graded response model generated an ICC and two parameters (α and β). The α_1 and α_2 parameters refer to the probable age at which children reach each developmental milestone, performing them sometimes (α_1) or always (α_2),

respectively. The β refers to the discrimination power of each milestone. It describes the curve slope, indicating the probability of reaching the developmental milestone, which increases with the child's chronological age. ICC, α_1 , α_2 , and β made it possible to estimate developmental age according to the milestones reached by each child. This methodology has been previously used to assess ECD with the SWYC^{19, 22, 25} and the Denver Test²⁶.

The developmental quotient (DQ) was calculated by dividing the developmental age by the chronological age²⁵. DQ equals 1 suggest the milestones expected for age were attained. Values < 1 and > 1 suggest that attaining milestones were below and above expectations for age, respectively.

Predictors of early childhood development

The predictors of ECD were defined according to the conceptual model proposed by Black et al. (2017). The authors proposed a conceptual framework comprised of three levels - nurturing care, environmental and context factors - that directly and indirectly impact full ECD potential and may influence development into adulthood³. The ENANI-2019 variables were allocated as distal and proximal levels. The variables referring to Nurturing Care Framework (good health, adequate nutrition, opportunities for early learning, security and safety, and responsive caregiving) were considered at the proximal level.

Proximal level variables

Mode of delivery (vaginal, planned or elective c-section, and emergency c-section), access to health services (public–primary care unit, public–no-primary care and

private practice or clinic), and attendance at child daycare centers or schools (public, private, or no daycare/school) were assessed through a structured questionnaire.

The birth gestational age and weight were reported by the mother/caregiver, and the International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century (Intergrowth-21st) recommendations were used to define birth weight percentile. These percentiles were classified as small for gestational age (SGA < 10th percentile), adequate for gestational age (AGA 10-90 percentile), and large for gestational age (AGA > 90th percentile) ²⁷.

The anthropometric assessment was carried out by measuring the child's length/height and weight. To assess the weight of children under two years of age, pediatric scales were used (model SECA® 336), and for children over two years of age, platform scales (model SECA® 813). To assess the length/height of children under two years old, infantometers were used (SECA® 417), and for children over two years old a stadiometer (SECA® 213). BMI-for-age and length/height-for-age z-scores were calculated and classified considering the child's age (in days) and sex according to WHO standards ²⁸.

Food markers consumed the day before the interview were assessed using a structured questionnaire with 40 items ²⁹. The structure of the questions was: "Did [child name] eat [type of food] yesterday?" The answer options were: "yes," "no", and "does not know/did not want to answer." More details about this questionnaire can be found in Lacerda et al. (2021).

Consumption of ultra-processed food (UPF) was considered when the child received one or more UPF the day before the interview ³⁰⁻³³, such as soda, other sweetened beverages (industrialized juices in cartons, coconut water in cartons, natural guarana or guarana syrup, currant drink, powdered fruit juice, natural fruit, juice with added sugar);

packaged snacks (including crisps); cookies, crackers; candy, lollipops, and other sweets; industrialized bread; instant flours (rice, corn, wheat, or oat); processed meats (hamburger, ham, baloney, salami, nuggets, sausage, hotdogs); industrialized seasonings; and instant noodles.

Distal level variables

The following variables were considered at the distal level: sex, skin color (white, brown, b

lack), Brazilian macro-region (Southeast, North, Northeast, South, Midwest), maternal/caregiver occupation (working, unemployed, housewife, student), habitation condition (home ownership, rented, borrowed), maternal/caregiver marital status (lives with a partner, lives without a partner), maternal/caregiver education (0-7, 8-10, ≥ 11 years), water supply (distribution network and well or spring, other), sanitation (sewage system, septic tank and ditch, discarded in rivers, lake, sea, or other), the families' access to income transfer programs ('Bolsa Familia' cash transfer program, another benefit, does not receive any benefit), and per-capita family income categories in USD (0–62.2, 62.2–124.4, 124.5–248.7, >248.7–8,281.4). The family income was estimated from the Brazilian minimum wage (R\$ 998.00) and converted to the US dollar exchange rate (R\$ 4.013 = US\$ 1) on December 30th, 2019.

Statistical analyses

The statistical analyses were performed in the R language using “srvyr” and “survey” packages, considering the complex sample design of the study, so the sample weights were incorporated into the design object R. Descriptive analysis was performed using mean DQ and 95% confidence interval (CI). The coefficient of variation (CV) was

used to assess the level of precision for variables evaluated in ENANI-2019. CV is a dispersion measure obtained from the ratio between the standard error and the estimated value for each indicator. $CV < 30\%$ was established as an adequate level. All estimates presented in this paper show a $CV < 30\%$. The lack of overlap in the 95% CI and p -value < 0.05 were considered statistical significance.

ECD predictors were classified into distal and proximal considering the conceptual framework proposed by Black et al. (2017). Then, the hierarchical approach technique was applied to prevent underestimating the effects of distal level factors in a theoretical model. A multiple linear regression model was initially performed for each level (distal and proximal variables). Variables that showed statistical significance considering p -value < 0.20 were kept in the model. Then, the variables (p -value < 0.20) were added to the general model in blocks: 1st: distal variables; and 2nd: proximal variables. At this stage, the distal predictors associated with the DQ with a statistical significance considering p -value < 0.05 were kept in the model to include the variables in the proximal block until the final model was reached. Additionally, different models by age group (1-35 and 36-59 months) were implemented, and forest plots were used to present the regression model coefficients.

Ethical approval

The ENANI-2019 was approved by the research ethics committee of the Clementino Fraga Filho University Hospital of the Federal University of Rio de Janeiro (CAAE:89798718.7.0000.5257). Research participation occurred after signing the free and informed consent form by the child's parents or caregivers and after hearing an explanation of all the ethical issues of the study.

RESULTS

The mean (95% CI) DQ for Brazilian children was 1.07 (1.04;1.09) (**Figure 1**), and 53.7% of children assessed were $DQ < 1$, suggesting that attaining milestones was below expectations for age. Lower mean DQ was observed among children aged 36-59 months (0.91 [0.88-0.93]) than 1-35 months (1.18 [1.15-1.22]), and for boys (1.03 [1.01-1.06]) compared to girls 1.11 (1.08-1.13) independently of the age group (**Figure 1 and Table 1**). The mean DQ for children from the Northern region (0.98 [0.93-1.04]) was statistically lower than those from the Southeast region (1.11 [1.07-1.16]) between 1-59 months. The same happened for children aged 1-35 months, but no regional differences were observed for mean DQ in the 36-59 months age group (**Figure 1**). The prevalence of $DQ < 1$ differed by age group (1-35: 44.4 [41.4;47.4]; 36-59: 67.1 [63.8;70.4]) and Brazilian macro-region (North: 63.1 [57.8;68.3] vs Southeast: 49.6 [44.3;54.9]) (results not showed).

Lower DQ means were observed for children whose mother/caregiver had 0-7 years of education, residing in households with inadequate sanitation, with waste discarded in ditches, rivers, lakes, seas, and other unsanitary conditions, living in households with a ditch, discarded in rivers, lakes, sea, or other sanitation, with lower per-capita family income categories, and who participated in the 'Bolsa Familia' program (**Table 1**). In the proximal level, children who did not consume UPF on the previous day had higher mean DQ than those who did consume. Likewise, higher mean DQ was observed among children who did not attend any daycare/school between the ages of 1-59 months and 1-35 months. On the other hand, among children aged 36-59 months, the mean DQ was higher for those who attended private daycare/school compared who other categories (public or did not attend daycare/ school) (**Table 2**).

The multiple models revealed the role of several proximal variables in DQ. Attendance at daycare/schools was positively associated with DQ for all age groups (private: 1-59 months: $\beta=0.081$; $p=0.001$; 1-35 months: $\beta=-0.090$; $p=0.025$; 36-59 months: $\beta=0.084$; $p<0.001$; No attendance: 1-59 months: $\beta=0.160$; $p=0.001$; 1-35 months: $\beta=0.117$; $p<0.001$). In contrast, consumption of UPF (yes: 1-59 months: $\beta=-0.317$; $p<0.001$; 1-35 months: $\beta=-0.333$; $p<0.001$), mode of delivery (emergency C-section: 1-59 months: $\beta=-0.044$; $p=0.007$; 1-35 months: $\beta=-0.079$; $p=0.002$), birth weight for gestational age (SGA: 36-59 months: $\beta=-0.046$; $p=0.009$) and access to health services (36-59 months: Public (no-primary care): $\beta=-0.072$; $p=0.002$) were inversely associated with DQ (**Figure 2 and Table S1**).

In the distal level, the habitation condition (rented: 36-59 months: $\beta=-0.043$; $p=0.021$), family income (1-59 months: 62.2–124.4 USD: $\beta=-0.069$; $p=0.008$), and caregiver/maternal education (1-59 months: 0-7 years: $\beta=-0.100$; $p<0.001$; 1-35 months: 0-7 years: $\beta=-0.101$; $p<0.001$; 36-59 months: 0-7 years: $\beta=-0.085$; $p<0.001$) were inversely associated with DQ. The mother/caregiver marital status (lives without a partner: 1-59 months: $\beta=0.041$; $p=0.045$; 1-35 months: $\beta=0.073$; $p=0.014$), non-participation in ‘Bolsa Família’ cash transfer program (1-59 months: $\beta=0.067$; $p=0.031$; 1-35 months: $\beta=-0.092$; $p=0.013$; 36-59 months: $\beta=0.064$; $p<0.001$), and sex (female: 1-59 months: $\beta=0.072$; $p<0.001$; 1-35 months: $\beta=-0.070$; $p<0.001$; 36-59 months: $\beta=0.074$; $p<0.001$) was positively associated with DQ. Additionally, the Brazilian macro-region of the household was inversely associated with DQ in the age groups of 1-59 (North: $\beta=-0.118$; $p<0.001$; South: $\beta=-0.067$; $p=0.032$) and 1-35 (North: $\beta=-0.162$; $p<0.001$; Midwest: $\beta=-0.097$; $p=0.020$; South: $\beta=-0.120$; $p=0.005$), but not for the 36-59 months (**Figure 2 and Table S1**).

DISCUSSION

The ENANI-2019 results revealed that girls, children aged between 1-35 months, and those living in the Southeast region of Brazil had higher mean DQ than boys, children aged between 36-59 months, and the other Brazilian regions, especially the North. We also observed that distal variables, such as living in North, Midwest or south region a rented household, less educated child's mother or caregiver, and having lower family income were inversely associated with ECD, while to be a girl, mothers or caregivers living without a partner, and no- cash transfer program participation was positively associated. In proximal level, for children between 1-35 months, emergency C-section birth, and consumption of UPF were inversely associated, and no attendance or private daycare/schools were positively associated with ECD. Among children 36-59 months, SGA birth, and access to public health services different from primary care were inversely associated, and attendance private daycare/schools was positively associated with ECD.

Several studies have reported that girls tend to have better ECD compared to boys, which is consistent with the current study findings for both age groups^{8,34-37}. Some theories have attempted to explain this sex difference, involving biological and social factors. According to biological theory, sexual hormones such as estrogen and testosterone, and the genetic variables, principally the holding of an XX versus an XY genotype, play a role in the brain structure and function^{38,39}. In addition, societal factors and gender norms impact how girls and boys are raised, influencing their language, cognitive, and behavioral development, which can contribute to it⁴⁰⁻⁴². It has been observed that girls tend to acquire a variety of language skills earlier than boys⁴³⁻⁴⁵. One possible explanation is the way that parents speak and play differently with sons and daughters. With daughters, parents tend to talk more and use their sounds using a

supportive conversation with them, which in turn affords daughters potentially allowing for greater exposure to the language ⁴⁴. For games, a study showed that parents prefer symbolic play with daughters while with sons it is an action-oriented one, this tends to affect different abilities between boys and girls ⁴⁶.

The 36-59 months age group has been reported to be at higher risk of ECD delay ^{34, 47}. Our previous work revealed an inverse association between chronological age and ECD, i.e., a significant drop in the mean DQ occurred after 36 months ²². ECD is a continuous and cumulative process; therefore, changes/delays at the beginning of early childhood tend to prevent the following milestones from being fully achieved, adding to the longer period of harmful exposure to developmental determinants ^{48, 49}.

This is the first study that evaluates ECD and considered regional differences, in a representative Brazilian sample. Brazil has continental dimensions and regions with unique cultural and socioeconomic characteristics. The Human Development Index (HDI) is higher in the regions characterized by higher socioeconomic development and access to health services, such as, South, Southeast, and Mid-West, e.g., with values of 0.754, 0.766, and 0.757, respectively. In contrast, the North and Northeast have lower HDI values of 0.667 and 0.663, respectively, and regions with lower socioeconomic development and lower access to health services ^{50, 51}. Thus, social and health inequalities and cultural behaviors may explain differences in ECD according to Brazilian regions.

Social inequalities have been reported with significant imprints in the ECD in the short and long term ^{9, 52, 53}. Barros & Ewerling (2016) evaluated the prevalence of ECD index adequacy according to the wealth quintile using data from 44 MICS studies between 2010-2014. The authors revealed a difference of almost 20% in the ECD index adequacy prevalence between the highest and the lowest wealth quintile for children aged 36–59 months in the Latin American and Caribbean regions ⁵². Access to educational

programs such as daycare centers/preschools and to activities that promote early learning and development at home also appears to be lower in low- and middle-income countries, where the disparity between income quintiles was 33.7% for access to early care and education programs and 26.5% for home stimulation activities⁵³. Johnson et al. (2022) evaluated 28,761 American children who were exposed to low socioeconomic status during prenatal period and experienced improvement throughout early childhood. These children had a high cognitive development at age seven, only when there is a substantial increase in family income⁹. Several studies have associated family income or socioeconomic status with ECD^{8, 9, 47, 52}. Our findings corroborate this literature. We found that the lowest family income categories, and habitation conditions (rented compared with home ownership) were inversely associated with DQ. We also found a direct association between non-participation in any cash transfer program, i.e., a proxy of socioeconomically vulnerability, and ECD.

In our study, the caregiver/mother education was inversely associated with DQ, i.e., children from mothers/caregivers with lower schooling presented lower DQ. In a meta-analysis of 21 studies representing 20,882 children, maternal and paternal education were associated with child development's motor, cognitive, and language domains. The authors observed a dose-response to the parental education level; stronger and direct associations were observed with increasing education⁵⁴. Children of mothers with more education tend to benefit from greater stimulation of ECD at home, better feeding and hygiene practices, and access to health services and immunization, which will also positively impact ECD⁵⁵⁻⁵⁷. The literature has yet to fully investigate the significance of paternal education. However, with the increasing involvement of fathers in raising children, it is only logical to anticipate a comparable impact to that of maternal education.

Achieving health and nutrition indicators is essential to reaching the ECD potential. We revealed that emergency cesarean section was inversely associated with DQ in children aged 1-35 months, and SGA was inversely associated with DQ in children aged 36-59 months. Both indicators may reflect the health situation during the prenatal period and appear to have long-term consequences^{58, 59}. Birth weight/gestational age is a fetal growth indicator that could affect ECD. In developing countries like Brazil, it has been reported to be a good ECD predictor^{8, 34, 35, 60, 61}. In contrast, in a recent meta-analysis of 21 studies representing 20,882 children, SGA was not associated with ECD⁵⁴. The lack of association of SGA on ECD in this meta-analysis may be due to the extensive age variation (1-8 years), assuming that ECD predictors differ by age group. Furthermore, the authors suggest that ECD of children born SGA can be compensated with adequate nutrition. This is a more difficult task in adverse contexts and environmental situations. The emergency cesarean section indicates an unhealthy condition that limits the continuation of the pregnancy, requiring surgical intervention. Other Brazilian studies have revealed the relationship between the mode of delivery and ECD, which agrees with our findings^{62, 63}.

We observed that consumption of UPF was inversely associated with ECD among children 1-35 months. UPF are industrial formulations rich in sodium, refined sugars, and saturated fats, including hydrogenated and trans fatty acids^{32, 33}. In children, data on UPF intake and its negative consequences are still scarce in the literature. A birth cohort in Spain with 2,377 mother-child pairs revealed that maternal UPF consumption in the third trimester of pregnancy was inversely associated with children's verbal function at 4-5 years of age⁶⁴. The consumption of UPF appears to affect the brain through two mechanisms: neuroinflammation and/or via the gut-brain axis. Excess trans and saturated fat produce oxidative stress and consequently neuroinflammation, therefore

impairing adequate neurodevelopment^{65,66}. Dysbiosis (imbalance between beneficial and pathogenic bacteria) is a consequence of high consumption of simple carbohydrates and saturated and trans fats^{67,68}. This condition leads to activation of the immune system, and this impacts the central nervous system and neurodevelopment. Furthermore, UPF consumption may also be associated with nutritional deficiencies that also contribute to lower ECD levels^{69,70}.

Notably, attendance at daycare/schools was associated with ECD. For all age groups, no attendance or private daycare/schools was positively associated with ECD, compared to public daycare/schools. Daycare/schools are essential settings for early learning opportunities. Furthermore, daycare/schools are also crucial for maintaining/improving nutritional status and ensuring food security once some meals are eaten at these places⁷¹⁻⁷³. In Brazil, enrollment in daycare centers is optional for ages 0-3 and mandatory in preschools for children aged > 3, since 2013⁷⁴. The quality of the activities, the class size, and the number of children per educator, and teacher qualifications are essential for the success of the learning process^{75,76}. Two meta-analyses revealed positive correlations between daycare quality and staff education with social skills, vocabulary, and word recognition among children aged 30-72 months^{77,78}. Lovison et al. (2021) evaluated 104 children 6-15 months enrolled in 30 municipal early childhood education centers in Cascavel, Brazil. They observed a direct relationship between daycare quality and the psychomotor development of children aged 6-15 months⁷⁹. On the other hand, children who did not attend daycare are exposed to parental or family care. This can allow for a more intimate relationship with the caregiver and greater interaction and stimulation⁸⁰. Barros et al. (2010) demonstrated that child stimulation at home or by any adult caregiver (e.g., someone reads or tells a story, uses the playground, goes to someone else house, watches TV, or has a storybook) is associated with ECD at

24 months⁸¹. Besides, ECD improvement is higher for low-schooling mothers' stimuli than for high-schooling mothers at 24 months⁸¹.

Some strengths of the ENANI-2019 survey are related to evidence of data-driven results for the ECD discussion on the national and global scene. This is the first time that ECD estimates for Brazilian children under five years of age have been evaluated in a nationally representative sample. All Brazilian children's ECD estimates published in global reports come from anthropometric and indirect assessments of child development. We also used the nurturing care model to assess the associated factors to ECD, a model recommended by the WHO since 2018. These findings will potentially contribute in developing and reviewing public policies for early childhood. This includes ensuring a suitable environment without social and health inequities, promoting quality nurturing care, access to quality healthcare throughout life, and providing early learning opportunities through high-quality daycare centers/schools. There are limitations to consider. The data is from a Brazilian National Survey on Child Nutrition. Since it is a cross-sectional study, we can only make limited inferences about the direction of the associations. Furthermore, we did not have data on responsive caregiving but sought to allocate the best available study variables to all domains of nurturing care, as proximal variables.

In conclusion, distal variables such as Brazilian macro-region, sex, lower mother/caregiver education, and family income were inversely associated with ECD. The non-participation in the cash transfer program was positively associated with ECD. Children born through emergency cesarean section, among children aged 1-35 months, and SGA, among children aged 36-59 months, were associated with lower ECD. Non-attendance and attendance private daycare/schools was directly associated with ECD for all age groups evaluated. Public policies for early childhood are essential, especially to

create a stable environment and address social and economic differences while also offering good learning opportunities.

FUNDING

Financial support for this study was provided by the Brazilian Ministry of Health and the Brazilian National Research Council (CPNq) on process n. 440890/2017-9. We also thank the Rio de Janeiro State Research Support Foundation—FAPERJ, and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Phd's fellowship for Freitas-Costa), for funding this study.

COMPETING INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

DATA SHARING

Data described and code book in the manuscript will be made publicly and freely available without restriction at <https://enani.nutricao.ufrj.br>. Analytic code will be made available upon request via corresponding Author's email.

REFERENCES

1. Shonkoff JP, Richter L, van der Gaag J, Bhutta ZA. An Integrated Scientific Framework for Child Survival and Early Childhood Development. *Pediatrics*. 2012; 129:e460-e72.
 2. Fleming TP, Watkins AJ, Velazquez MA, Mathers JC, Prentice AM, Stephenson J, et al. Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences. *The Lancet*. 2018; 391:1842-52.
 3. Black MM, Walker SP, Fernald LCH, Andersen CT, DiGirolamo AM, Lu C, et al. Early childhood development coming of age: science through the life course. *Lancet (London, England)*. 2017; 389:77-90.
 4. Richter LM, Daelmans B, Lombardi J, Heymann J, Boo FL, Behrman JR, et al. Advancing Early Childhood Development: From Science to Scale 3: Investing in the foundation of sustainable development: Pathways to scale up for early childhood development. *The Lancet*. 2017; 389:103-18.
 5. Britto PR, Lye SJ, Proulx K, Yousafzai AK, Matthews SG, Vaivada T, et al. Nurturing care: promoting early childhood development. *Lancet (London, England)*. 2017; 389:91-102.
 6. WHO. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Improving Early Childhood Development: WHO Guideline. Geneva: World Health Organization
- © World Health Organization 2020.; 2020.
7. Lu C, Black MM, Richter LM. Risk of poor development in young children in low-income and middle-income countries: an estimation and analysis at the global, regional, and country level. *The Lancet Global health*. 2016; 4:e916-e22.
 8. Camargo-Figuera FA, Barros AJ, Santos IS, Matijasevich A, Barros FC. Early life determinants of low IQ at age 6 in children from the 2004 Pelotas Birth Cohort: a predictive approach. *BMC pediatrics*. 2014; 14:308.
 9. Johnson SB, Raghunathan RS, Li M, Nair D, Matson PA. Moving up but not getting ahead: Family socioeconomic position in pregnancy, social mobility, and child cognitive development in the first seven years of life. *SSM - population health*. 2022; 17:101064.
 10. McCoy DC, Peet ED, Ezzati M, Danaei G, Black MM, Sudfeld CR, et al. Early Childhood Developmental Status in Low- and Middle-Income Countries: National, Regional, and Global Prevalence Estimates Using Predictive Modeling. *PLoS medicine*. 2016; 13:e1002034.
 11. Boo FL, Mateus MC, Duryea S. Analysis of socioeconomic gradients in the development of children aged 0-3 years in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Revista de saude publica*. 2018; 52:84.
 12. Valentini NC, Coutinho MTC, Pansera SM, dos Santos VAP, Vieira JLL, Ramalho MH, et al. Prevalência de déficits motores e desordem coordenativa desenvolvimental em crianças da região Sul do Brasil. *Revista Paulista de Pediatria [online]*. 2012; 30:377-84.
 13. Zago JTdC, Pinto PAF, Leite HR, Santos JN, Moraes RLdS. Associação entre o desenvolvimento neuropsicomotor e fatores de risco biológico e ambientais em crianças na primeira infância. *Revista CEFAC [online]* 2017; 19:320-9.
 14. Rocha PRH, Saraiva M, Barbieri MA, Ferraro AA, Bettiol H. Association of preterm birth and intrauterine growth restriction with childhood motor development: Brisa cohort, Brazil. *Infant behavior & development*. 2020; 58:101429.
 15. Silva ÂCDd, Engstron EM, Miranda CTd. Fatores associados ao desenvolvimento neuropsicomotor em crianças de 6-18 meses de vida inseridas em creches públicas do Município de João Pessoa, Paraíba, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública [online]* 2015; 31: 1881-93.
 16. Delgado DA, Michelon RC, Gerzson LR, Almeida CSd, Alexandre MdG. Avaliação do desenvolvimento motor infantil e sua associação com a vulnerabilidade social. *Fisioter Pesqui (Online)*. 2020; 27:48-56.

17. Zanardi DM, Santos JP, Pacagnella RC, Parpinelli MA, Silveira C, Andreucci CB, et al. Long-Term Consequences of Severe Maternal Morbidity on Infant Growth and Development. *Maternal and child health journal*. 2021; 25:487-96.
18. Alves-Santos NH, Castro IRR, Anjos LAD, Lacerda EMA, Normando P, Freitas MB, et al. General methodological aspects in the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. *Cadernos de saude publica*. 2021; 37:e00300020.
19. Sheldrick RC, Perrin EC. Evidence-based milestones for surveillance of cognitive, language, and motor development. *Acad Pediatr*. 2013; 13:577-86.
20. Moreira RS, Magalhães LdC, Siqueira CM, Alves CRL. Cross-cultural adaptation of the child development surveillance instrument "Survey of Wellbeing of Young Children (SWYC)" in the Brazilian context. *Journal of Human Growth and Development*. 2019; 29:28-38.
21. Guimarães MAP, Magalhães LdC, Moreira RS, Bessa FR, Alves CRL. Survey of Well-Being of Young Children (SWYC): Preliminary Norms for Screening for Developmental Delay in Brazilian Children Younger than 65 Months. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*. 2022; 43.
22. Freitas-Costa NC, Andrade PG, Normando P, Nunes KSS, Raymundo CE, Castro IRRd, et al. Association of development quotient with nutritional status of vitamins B6, B12, and folate in 6–59-month-old children: Results from the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019). *The American journal of clinical nutrition*. 2023; 118:162-73.
23. Samejima F. Graded Response Model. Edtion ed. In: van der Linden WJ, Hambleton RK, eds. *Handbook of Modern Item Response Theory*. New York, NY: Springer New York. 1997.
24. Muthén LKam, B.O. . *Mplus User's Guide*. . Los Angeles, CA.(1998-2015). .
25. Sheldrick RC, Schlichting LE, Berger B, Clyne A, Ni P, Perrin EC, et al. Establishing New Norms for Developmental Milestones. *Pediatrics*. 2019; 144.
26. Drachler Mde L, Marshall T, de Carvalho Leite JC. A continuous-scale measure of child development for population-based epidemiological surveys: a preliminary study using Item Response Theory for the Denver Test. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2007; 21:138-53.
27. Villar J, Cheikh Ismail L, Victora CG, Ohuma EO, Bertino E, Altman DG, et al. International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet (London, England)*. 2014; 384:857-68.
28. World Health Organization. *WHO child growth standards : length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight -for-height and body mass index-for-age : methods and development*. Geneva: World Health Organization; 2006.
29. Lacerda EMA, Boccolini CS, Alves-Santos NH, Castro IRR, Anjos LAD, Crispim SP, et al. Methodological aspects of the assessment of dietary intake in the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. *Cadernos de saude publica*. 2021; 37:e00301420.
30. Brasil. *Guia alimentar para a população brasileira*. . Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
31. Brasil. *Orientações para avaliação de marcadores de consumo alimentar na atenção básica*. Brasília: Ministério da Saúde; 2016.
32. Monteiro CA, Cannon G, Levy RB, Moubarac JC, Louzada ML, Rauber F, et al. Ultra-processed foods: what they are and how to identify them. *Public health nutrition*. 2019; 22:936-41.
33. Monteiro CA RC, Calixto G, Machado P, Martins C, Steele EM, Baraldi LG, Garzillo JMF, Sattamini I, Cannon G, Levy RB, Moubarac JC, Jaime PC, Martins AP, Canella DS, Louzada ML da C, Parra D. . NOVA. The star shines bright [Internet]. *World Nutrition*. 2016; 7:28-38.
34. Venancio SI, Teixeira JA, de Bortoli MC, Bernal RTI. Factors associated with early childhood development in municipalities of Ceará, Brazil: a hierarchical model of contexts, environments, and nurturing care domains in a cross-sectional study. *The Lancet Regional Health - Americas*. 2022; 5:100139.

35. Neves PAR, Gatica-Domínguez G, Santos IS, Bertoldi AD, Domingues M, Murray J, et al. Poor maternal nutritional status before and during pregnancy is associated with suspected child developmental delay in 2-year old Brazilian children. *Scientific Reports*. 2020; 10:1851.
36. Nahar B, Hossain M, Mahfuz M, Islam MM, Hossain MI, Murray-Kolb LE, et al. Early childhood development and stunting: Findings from the MAL-ED birth cohort study in Bangladesh. *Maternal & child nutrition*. 2020; 16:e12864.
37. Haq I, Hossain MI, Zinnia MA, Hasan MR, Chowdhury IA. Determinants of the Early Childhood Development Index among children aged < 5 years in Bangladesh, Costa Rica and Ghana: a comparative study. *Eastern Mediterranean health journal = La revue de sante de la Mediterranee orientale = al-Majallah al-sihhiyah li-sharq al-mutawassit*. 2021; 27:1069-77.
38. Zhang X, Liang M, Qin W, Wan B, Yu C, Ming D. Gender Differences Are Encoded Differently in the Structure and Function of the Human Brain Revealed by Multimodal MRI. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2020; 14.
39. Tseng Y-C, Lai D-C, Guo H-R. Gender and geographic differences in the prevalence of reportable childhood speech and language disability in Taiwan. *Research in Developmental Disabilities*. 2015; 40:11-8.
40. Alexander GM, Wilcox T. Sex Differences in Early Infancy. *Child Development Perspectives*. 2012; 6:400-6.
41. Kumpulainen V, Merisaari H, Silver E, Copeland A, Pulli EP, Lewis JD, et al. Sex differences, asymmetry, and age-related white matter development in infants and 5-year-olds as assessed with tract-based spatial statistics. *Human Brain Mapping*. 2023; 44:2712-25.
42. Adani S, Cepanec M. Sex differences in early communication development: behavioral and neurobiological indicators of more vulnerable communication system development in boys. *Croatian medical journal*. 2019; 60:141-9.
43. Kung KTF, Browne WV, Constantinescu M, Noorderhaven RM, Hines M. Early postnatal testosterone predicts sex-related differences in early expressive vocabulary. *Psychoneuroendocrinology*. 2016; 68:111-6.
44. Schild CE, Meigen C, Kappelt J, Kiess W, Poulain T. Associations between sociodemographic and behavioural parameters and child development depending on age and sex: a cross-sectional analysis. *BMJ Open*. 2022; 12:e065936.
45. Rinaldi P, Pasqualetti P, Volterra V, Caselli MC. Gender differences in early stages of language development. Some evidence and possible explanations. *Journal of Neuroscience Research*. 2023; 101:643-53.
46. Bleses D, Vach W, Dale PS. Self-reported parental vocabulary input frequency for young children. *Journal of Child Language*. 2018; 45:1073-90.
47. Correia LL, Rocha HAL, Sudfeld CR, Rocha S, Leite Á JM, Campos JS, et al. Prevalence and socioeconomic determinants of development delay among children in Ceará, Brazil: A population-based study. *PloS one*. 2019; 14:e0215343.
48. Hadders-Algra M. Social and biological determinants of growth and development in underprivileged societies. *Jornal de pediatria*. 2016; 92:217-9.
49. Ertem IO, Krishnamurthy V, Mulaudzi MC, Sguassero Y, Balta H, Gulumser O, et al. Similarities and differences in child development from birth to age 3 years by sex and across four countries: a cross-sectional, observational study. *The Lancet Global Health*. 2018; 6:e279-e91.
50. Viana ALDÁ, Bousquat A, Pereira APCdM, Uchimura LYT, Albuquerque MVd, Mota PHdS, et al. Tipologia das regiões de saúde: condicionantes estruturais para a regionalização no Brasil. *Saúde e Sociedade*. 2015; 24.
51. Pinto LF, Quesada LA, D'Avila OP, Hauser L, Gonçalves MR, Harzheim E. Primary Care Assessment Tool: diferenças regionais a partir da Pesquisa Nacional de Saúde do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2021; 26.
52. Barros AJ, Ewerling F. Early childhood development: a new challenge for the SDG era. *The Lancet Global health*. 2016; 4:e873-e4.

53. Lu C, Cuartas J, Fink G, McCoy D, Liu K, Li Z, et al. Inequalities in early childhood care and development in low/middle-income countries: 2010–2018. *BMJ Global Health*. 2020; 5:e002314.
54. Ayesha S, Christopher RS, Goodarz D, Günther F, Dana CM, Zhaozhong Z, et al. Early life risk factors of motor, cognitive and language development: a pooled analysis of studies from low/middle-income countries. *BMJ Open*. 2019; 9:e026449.
55. Parey M, Carneiro P, Meghir C. Maternal Education, Home Environments, and the Development of Children and Adolescents. *Journal of the European Economic Association*. 2013; 11:123–60.
56. Fein SB, Labiner-Wolfe J, Scanlon KS, Grummer-Strawn LM. Selected complementary feeding practices and their association with maternal education. *Pediatrics*. 2008; 122 Suppl 2:S91-7.
57. Simkhada B, Teijlingen ER, Porter M, Simkhada P. Factors affecting the utilization of antenatal care in developing countries: systematic review of the literature. *Journal of advanced nursing*. 2008; 61:244-60.
58. Bertolo RF, McBreaity LE. The nutritional burden of methylation reactions. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2013; 16:102-8.
59. Darmasseelane K, Hyde MJ, Santhakumaran S, Gale C, Modi N. Mode of delivery and offspring body mass index, overweight and obesity in adult life: a systematic review and meta-analysis. *PLoS one*. 2014; 9:e87896.
60. Rocha HAL, Sudfeld CR, Leite ÁJM, Machado MMT, Rocha SGMO, Campos JS, et al. Maternal and neonatal factors associated with child development in Ceará, Brazil: a population-based study. *BMC pediatrics*. 2021; 21:163.
61. Halpern R, Barros AJ, Matijasevich A, Santos IS, Victora CG, Barros FC. Developmental status at age 12 months according to birth weight and family income: a comparison of two Brazilian birth cohorts. *Cadernos de saude publica*. 2008; 24 Suppl 3:S444-50.
62. Severiano AAdO, Dantas DdS, Oliveira VLCd, Lopes JM, Souza DEd, Magalhães AG. Association between breastfeeding, obstetric factors and child development in northeast Brazil. *Journal of Human Growth and Development*. 2017; 27:158-65.
63. Cavaggioni APM, Martins MdCF, Benincasa MB. Influence of type of birth on child development: a comparison by Bayley- III Scale. *Journal of Human Growth and Development*. 2020; 30:301-10.
64. Puig-Vallverdú J, Romaguera D, Fernández-Barrés S, Gignac F, Ibarluzea J, Santa-Maria L, et al. The association between maternal ultra-processed food consumption during pregnancy and child neuropsychological development: A population-based birth cohort study. *Clinical Nutrition*. 2022; 41:2275-83.
65. Won E, Kim YK. Neuroinflammation-Associated Alterations of the Brain as Potential Neural Biomarkers in Anxiety Disorders. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21.
66. Troubat R, Barone P, Leman S, Desmidt T, Cressant A, Atanasova B, et al. Neuroinflammation and depression: A review. *The European journal of neuroscience*. 2021; 53:151-71.
67. Martínez Leo EE, Segura Campos MR. Effect of ultra-processed diet on gut microbiota and thus its role in neurodegenerative diseases. *Nutrition*. 2020; 71.
68. Okamura T, Hashimoto Y, Majima S, Senmaru T, Ushigome E, Nakanishi N, et al. Trans Fatty Acid Intake Induces Intestinal Inflammation and Impaired Glucose Tolerance. *Frontiers in immunology*. 2021; 12:669672.
69. Georgieff MK, Ramel SE, Cusick SE. Nutritional influences on brain development. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2018; 107:1310-21.
70. Yakoob MY, Lo CW. Nutrition (Micronutrients) in Child Growth and Development: A Systematic Review on Current Evidence, Recommendations and Opportunities for Further Research. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*. 2017; 38:665-79.

71. Souza MMd, Pedraza DF, Menezes TNd. Estado nutricional de crianças assistidas em creches e situação de (in)segurança alimentar de suas famílias. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2012; 17.
72. Pedraza DF. Preditores de riscos nutricionais de crianças assistidas em creches em município de porte médio do Brasil. *Cadernos Saúde Coletiva*. 2017; 25.
73. Stavski M, Monteiro F, Retondario A. Insegurança alimentar em crianças que frequentam creches públicas em Ponta Grossa, PR. *Segurança Alimentar e Nutricional*. 2022; 29:e022003.
74. BRASIL. Lei n. 12.796, de 4 de abril de 2013. Altera a Lei no 9.394, de 20 de dezembro de 1996, que estabelece as diretrizes e bases da educação nacional, para dispor sobre a formação dos profissionais da educação e dar outras providências. . In: *Jurídicos*. PdRCCSpA, editor. Brasília, DF.: Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato20112014/2013/lei/l12796.htm; 2013.
75. Yoshikawa H, Leyva D, Snow CE, Treviño E, Barata MC, Weiland C, et al. Experimental impacts of a teacher professional development program in Chile on preschool classroom quality and child outcomes. *Developmental psychology*. 2015; 51:309-22.
76. Bernal R, Ramírez SM. Improving the quality of early childhood care at scale: The effects of “From Zero to Forever”. *World Development*. 2019; 118:91-105.
77. Perlman M, Falenchuk O, Fletcher B, McMullen E, Beyene J, Shah PS. A Systematic Review and Meta-Analysis of a Measure of Staff/Child Interaction Quality (the Classroom Assessment Scoring System) in Early Childhood Education and Care Settings and Child Outcomes. *PloS one*. 2016; 11:e0167660.
78. Falenchuk O, Perlman M, McMullen E, Fletcher B, Shah PS. Education of staff in preschool aged classrooms in child care centers and child outcomes: A meta-analysis and systematic review. *PloS one*. 2017; 12:e0183673.
79. Lovison K, Moreira HSB, Silva Jd, Scorzafave LGDS, Mello DFd. The influence of the quality in daycare environments on children’s motor development between six to 15 months old. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. 2021; 21.
80. Elizabeth T, Zoia P. Apontamentos sobre educação de bebês e de crianças pequenas. *Teoria e Prática da Educação*. 2019; 22.
81. Barros AJ, Matijasevich A, Santos IS, Halpern R. Child development in a birth cohort: effect of child stimulation is stronger in less educated mothers. *International journal of epidemiology*. 2010; 39:285-94.

Table 1. Mean developmental quotient according to distal level variables by age groups for children 1-59 months evaluated in ENANI-2019 (n=14,159).

Variables	All children				Age groups (months)					
	(%)	Mean	95% CI		1-35		36-59		Mean	95% CI
			Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI		
Zone										
Urban	96.2	1.07	1.05	1.10	1.19	1.15	1.22	0.91	0.88	0.93
Rural	3.8	1.04	0.98	1.10	1.11	1.03	1.19	0.86	0.77	0.95
Sex										
Male	51.2	1.03 ^a	1.01	1.06	1.15 ^a	1.11	1.19	0.87 ^a	0.84	0.90
Female	48.8	1.11 ^a	1.08	1.13	1.22 ^a	1.18	1.26	0.94 ^a	0.91	0.97
Skin color*										
White	41.2	1.10	1.07	1.12	1.21	1.17	1.24	0.93	0.89	0.96
Brown	51.7	1.05	1.02	1.08	1.16	1.12	1.20	0.89	0.86	0.91
Black	6.5	1.09	1.02	1.15	1.21	1.12	1.30	0.93	0.87	1.00
Caregiver/Maternal occupation										
Working	42.1	1.08	1.05	1.10	1.20	1.16	1.23	0.93	0.90	0.97
Unemployed	24.9	1.05	1.02	1.09	1.16	1.12	1.21	0.88	0.84	0.91
Housewife	30.6	1.06	1.03	1.09	1.16	1.12	1.21	0.89	0.85	0.92
Student or other	2.4	1.17	1.02	1.32	1.34	1.09	1.58	0.88	0.82	0.94
Habitation*										
Home ownership	62.6	1.07	1.04	1.11	1.19	1.14	1.23	0.92	0.89	0.94
Rented	27.1	1.07	1.03	1.10	1.19	1.14	1.23	0.87	0.83	0.91
Borrowed	9.8	1.04	1.00	1.09	1.14	1.08	1.20	0.91	0.85	0.97
Caregiver marital status										
Lives with partner	72.7	1.06	1.04	1.09	1.17	1.13	1.21	0.90	0.88	0.93
Lives without partner	27.3	1.08	1.05	1.12	1.22	1.17	1.27	0.91	0.87	0.95
Maternal/caregiver education (years)										

0-7	22.4	0.98 ^a	0.95	1.01	1.09 ^a	1.06	1.13	0.84 ^a	0.80	0.88
8-10	21.2	1.06	1.01	1.10	1.15	1.09	1.21	0.89	0.85	0.93
≥11	56.4	1.11 ^a	1.08	1.14	1.23 ^a	1.18	1.27	0.94 ^a	0.91	0.97
Water supply										
Network distribution	93.3	1.07	1.05	1.10	1.19	1.15	1.23	0.91	0.88	0.93
Will, spring or other	6.7	1.00	0.94	1.06	1.08	1.02	1.14	0.85	0.76	0.94
Sanitation										
Sewage system	74.5	1.09 ^a	1.06	1.12	1.20 ^a	1.16	1.25	0.92	0.89	0.95
Septic tank	23.0	1.02	0.99	1.06	1.12	1.08	1.16	0.87	0.83	0.91
Ditch, discarded in rivers, lakes, sea, or other	2.5	0.96 ^a	0.90	1.03	1.08 ^a	0.99	1.17	0.83	0.73	0.93
Per-capita family income (USD) ¹										
< 62.2	28.1	1.05	1.00	1.09	1.16	1.11	1.22	0.88 ^a	0.84	0.91
62.2–124.4	32.9	1.03	1.00	1.05	1.14 ^a	1.10	1.18	0.86 ^a	0.82	0.89
124.5–248.7	25.8	1.12	1.08	1.15	1.24 ^a	1.19	1.29	0.94	0.91	0.98
> 248.7	13.2	1.14	1.09	1.18	1.22	1.16	1.28	1.01 ^a	0.96	1.05
‘Bolsa Familia’ cash transfer program										
Yes	37.3	1.01 ^a	0.98	1.04	1.11 ^a	1.08	1.15	0.86 ^a	0.83	0.89
Receive other benefit	5.7	1.03	0.97	1.09	1.19	1.11	1.28	0.87	0.80	0.94
Does not receive any benefit	57.0	1.11 ^a	1.07	1.15	1.23 ^a	1.17	1.28	0.94 ^a	0.91	0.97

Note: *A category of "other" represents < 1% of the population and was not shown in the results. ¹: estimated from the Brazilian minimum wage (R\$ 998.00) and converted to the dollar exchange rate (R\$ 4.013 = \$ 1) in December 30th, 2019. USD: United States Dollar; 95% CI: 95% confidence interval. Developmental quotient (DQ) was calculated using the Survey of Well-being of Young Children's - Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire. The developmental age was estimated considering the child's age at the developmental milestones were achieved. DQ = developmental age ÷ chronological age (Sheldrick et al., 2019). DQ = 1 indicates that expected age milestones have been attained; DQ < 1 and > 1 suggest that the attainment of specific age milestones happened below or above expectations, respectively. ^a Upper script letters represent differences in mean DQ between the variable categories considering the lack of 95% CI overlap within the age range.

Table 2. Mean developmental quotient according to proximal levels variables and age groups for children 1-59 months evaluated in ENANI-2019 (n= 14,159).

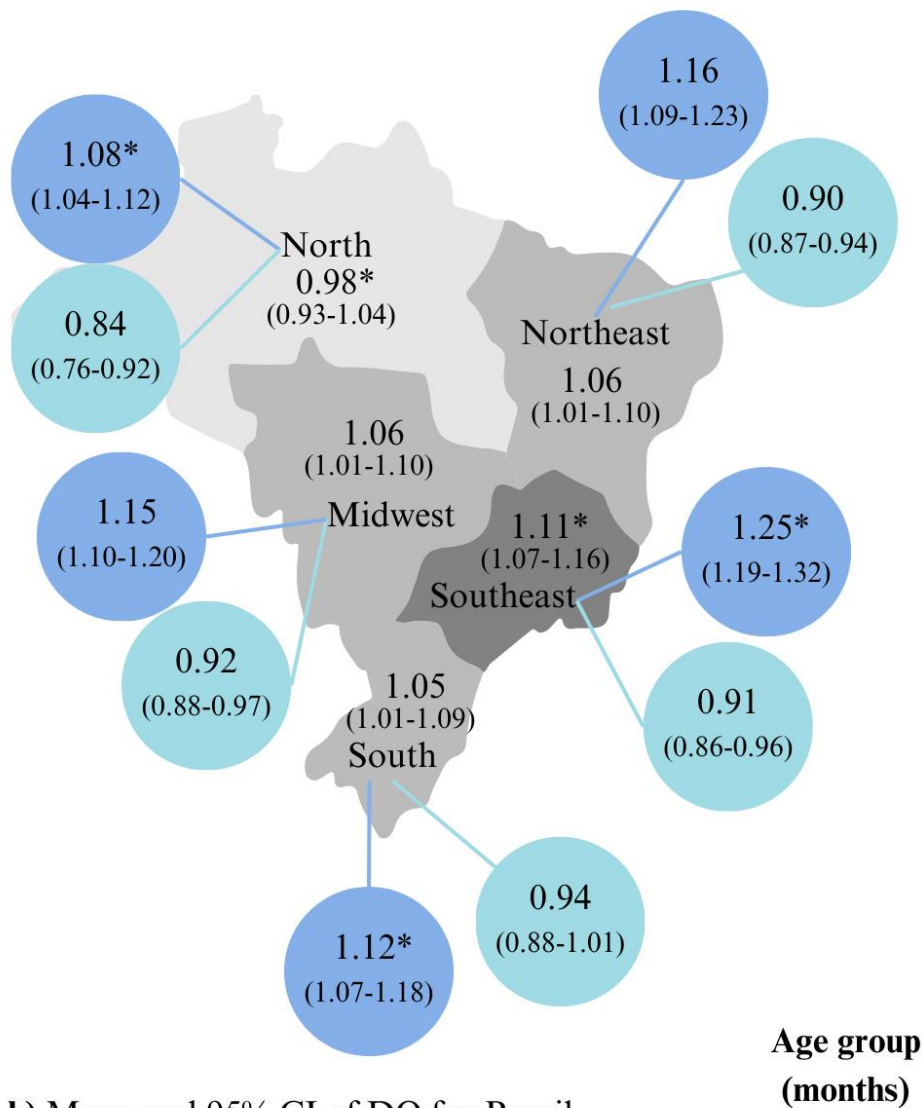
Variables	All children				Age groups (months)					
	(%)	Mean	95% CI		1-35		36-59		Mean	95% CI
					Mean	95% CI	Mean	95% CI		
Birth weight for gestational age ¹										
SGA (< P10)	11.8	1.03	0.98	1.08	1.17	1.09	1.24	0.86	0.82	0.91
AGA (P10-P90)	71.5	1.09	1.06	1.11	1.19	1.16	1.23	0.92	0.90	0.94
LGA (> P90)	16.4	1.02	0.98	1.06	1.14	1.09	1.18	0.88	0.83	0.93
Mode of delivery										
Vaginal	51.7	1.07	1.04	1.10	1.19	1.15	1.23	0.89	0.87	0.92
Planned or elective C-section	21.7	1.10	1.06	1.14	1.23	1.18	1.28	0.94	0.90	0.99
Emergency C-section	26.6	1.04	1.00	1.07	1.13	1.08	1.17	0.89	0.86	0.92
Access to health services*										
Public (primary care unit)	73.2	1.06	1.03	1.09	1.18	1.14	1.22	0.90	0.87	0.92
Public (no-primary care)	6.7	1.01	0.94	1.07	1.13	1.04	1.22	0.84	0.80	0.88
Private practice or clinic	19.1	1.12	1.08	1.15	1.22	1.17	1.27	0.96	0.92	1.00
Length/height-for-age (Z-score <-2)										
Yes	6.8	1.08	1.00	1.16	1.16	1.06	1.25	0.87	0.81	0.93
No	93.2	1.07	1.04	1.09	1.18	1.15	1.22	0.91	0.88	0.93
Body mass index for-age (Z-score)										
Underweight (Z < -2)	2.9	1.12	1.03	1.21	1.25	1.14	1.36	0.89	0.80	0.98
Eutrophic (-2 ≤ Z ≤ 1)	68.6	1.07	1.04	1.10	1.20	1.16	1.24	0.90	0.88	0.93
Overweight risk (1 < Z ≤ 2)	18.3	1.07	1.03	1.11	1.15	1.10	1.20	0.92	0.87	0.96
Overweight (Z > 2)	10.2	1.06	1.00	1.12	1.13	1.05	1.21	0.92	0.85	1.00
Consumption of ultra-processed foods ²										
No	17.4	1.37 ^a	1.29	1.45	1.45 ^a	1.36	1.54	0.92	0.85	0.99
Yes	82.6	1.01 ^a	0.98	1.03	1.09 ^a	1.07	1.12	0.90	0.88	0.93

Daycare or school

Public daycare or school	31.2	0.95 ^{ab}	0.92	0.97	1.06 ^a	1.03	1.10	0.90 ^a	0.87	0.93
Private daycare or school	9.8	1.05 ^{bc}	1.01	1.09	1.17	1.10	1.24	1.00 ^{ab}	0.96	1.04
No	59.0	1.14 ^{ac}	1.10	1.17	1.21 ^a	1.17	1.25	0.86 ^b	0.83	0.90

Note: *A category of "other" represents < 1% of the population and was not shown in the results. ¹: Birth weight according to sex and gestational age-specific percentiles using the INTERGROWTH-21st charts. SGA, Small for gestational age (< P10); AGA, Adequate for gestational age (P10-P90); and LGA, Large for gestational age (> P90). The information is missing for 0.91% of the sample, referring to children born at 43 weeks of gestation and cannot be classified by the intergrowth-21st curves. ²: If the child received one or more ultra-processed foods the day before the interview. The following foods were considered ultra-processed: soda, other sweetened beverages (industrialized juices in cartons, coconut water in cartons, natural guarana or guarana syrup, currant drink, powdered fruit juice, natural fruit, juice with added sugar); packaged snacks (including crisps); cookies, crackers; candy, lollipops, and other sweets; industrialized bread; instant flours (rice, corn, wheat, or oat); processed meats (hamburger, ham, baloney, salami, nuggets, sausage, hotdogs); industrialized seasonings; and instant noodles. 95% CI: 95% confidence interval. Developmental quotient (DQ) was calculated using the Survey of Well-being of Young Children's - Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire. The developmental age was estimated considering the child's age at the developmental milestones were achieved. DQ = developmental age ÷ chronological age (Sheldrick et al., 2019). DQ = 1 indicates that expected age milestones have been attained; DQ < 1 and > 1 suggest the attainment of specific age milestones happened below or above expectations, respectively. ^{a,b} and ^c Difference between variable categories. The means were different between age groups for all variables.

a) Mean and 95% CI of DQ according macro-region



b) Mean and 95% CI of DQ for Brazil

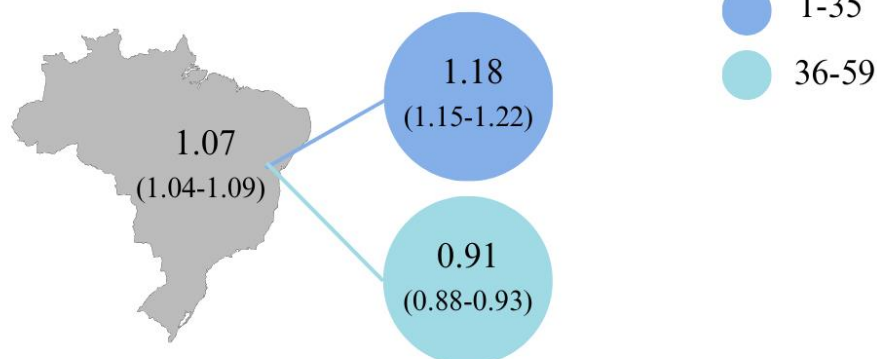
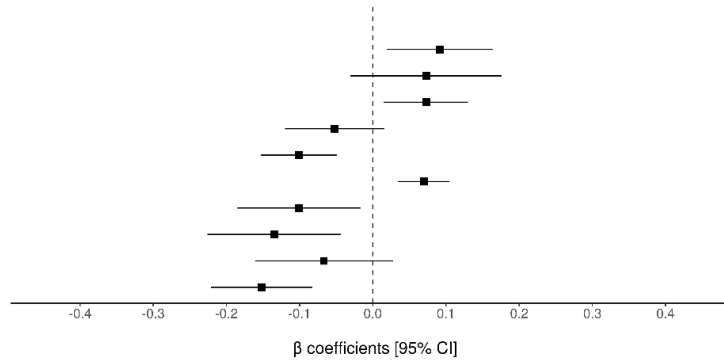


Figure 1. Developmental quotient (DQ) mean and 95% CI according to Brazilian macro-region (A) and for Brazil (B) according to age group: 1-59, 1-35, and 36-59-months children evaluated in ENANI-2019 (n= 14,159).

Note: 95% CI: 95% confidence interval; * differences between mean DQ according to the Brazilian macro-region in the same age group consider the lack 95% CI overlap. Developmental quotient (DQ) was calculated using the Survey of Well-being of Young Children's - Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire. The developmental age was estimated considering the child's age at the developmental milestones were achieved. $DQ = \text{developmental age} \div \text{chronological age}$ (Sheldrick et al., 2019). $DQ = 1$ indicates that expected age milestones have been attained; $DQ < 1$ and > 1 suggest the attainment of specific age milestones happened below or above expectations, respectively.

a) 1-35 months: Distal level

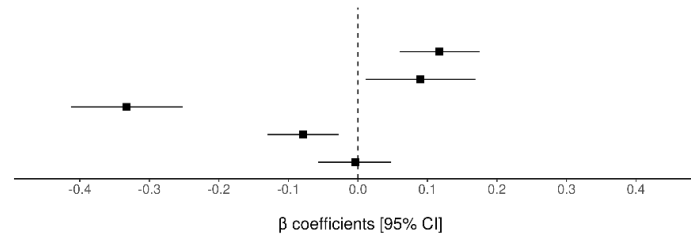
Variables	β coefficients [95% CI]
'Bolsa Familia' cash transfer program: Does not receive any benefit	0.092 [0.019, 0.164]
'Bolsa Familia' cash transfer program: Receive other benefit	0.073 [-0.031, 0.176]
Caregiver marital status: Lives without partner	0.073 [0.015, 0.13]
Maternal/caregiver education (years): 8-10	-0.052 [-0.12, 0.016]
Maternal/caregiver education (years): 0-7	-0.101 [-0.153, -0.049]
Sex: Female	0.07 [0.034, 0.105]
Brazilian macro-region: Midwest	-0.101 [-0.185, -0.017]
Brazilian macro-region: South	-0.135 [-0.226, -0.044]
Brazilian macro-region: Northeast	-0.067 [-0.161, 0.028]
Brazilian macro-region: North	-0.152 [-0.221, -0.083]



p-value
0.013*
0.167
0.014*
0.133
<0.001***
<0.001***
0.018*
0.004**
0.167
<0.001***

Proximal level

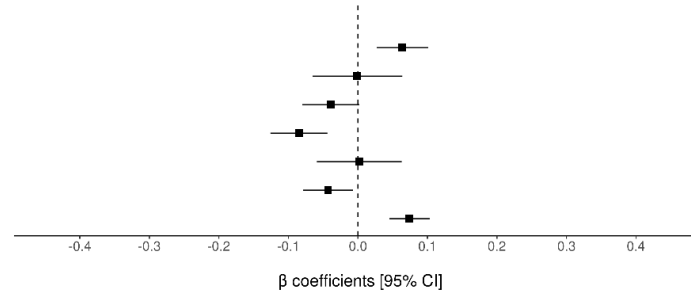
Variables	β coefficients [95% CI]
Daycare or school: No	0.117 [0.06, 0.175]
Daycare or school: Private daycare or school	0.09 [0.011, 0.169]
Consumption of ultra-processed foods: Yes	-0.333 [-0.413, -0.252]
Mode of delivery: Emergency C-section	-0.079 [-0.13, -0.028]
Mode of delivery: Planned or elective C-section	-0.004 [-0.057, 0.048]



p-value
<0.001***
0.025*
<0.001***
0.002**
0.866

b) 36-59 months: Distal level

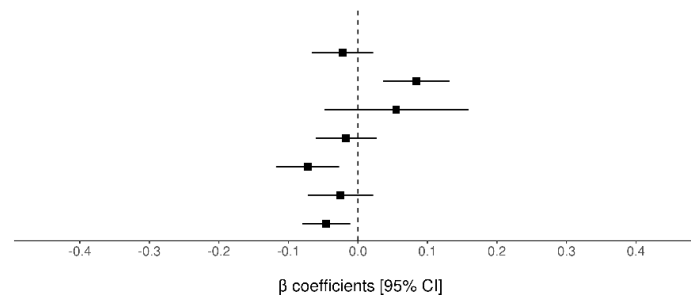
Variables	β coefficients [95% CI]
'Bolsa Familia' cash transfer program: Does not receive any benefit	0.064 [0.027, 0.101]
'Bolsa Familia' cash transfer program: Receive other benefit	-0.001 [-0.065, 0.064]
Maternal/caregiver education (years): 8-10	-0.039 [-0.08, 0.002]
Maternal/caregiver education (years): 0-7	-0.085 [-0.126, -0.044]
Habitation: Borrowed	0.002 [-0.059, 0.063]
Habitation: Rented	-0.043 [-0.079, -0.007]
Sex: Female	0.074 [0.045, 0.103]



p-value
<0.001***
0.977
0.060*
<0.001***
0.191
0.021*
<0.001***

Proximal level

Variables	β coefficients [95% CI]
Daycare or school: No	-0.022 [-0.066, 0.022]
Daycare or school: Private daycare or school	0.084 [0.036, 0.132]
Access to health services: No access	0.055 [-0.048, 0.159]
Access to health services: Private practice or clinic	-0.017 [-0.061, 0.027]
Access to health services: Public (no-primary care)	-0.072 [-0.118, -0.027]
Birth weight for gestational age: LGA	-0.025 [-0.072, 0.022]
Birth weight for gestational age: SGA	-0.046 [-0.08, -0.011]



p-value
0.331
<0.001***
0.292
0.440
0.002**
0.303
0.009**

Figure 2. Association between developmental quotient (DQ) and distal and proximal variables according to age groups for children (A) 1-35 and (B) 36-59 months evaluated in ENANI-2019 (n= 14,159).

Note: Multiple linear regression adjusted according to the hierarchical model. Individual models were developed for each group (1-35 and 36-59 months). Therefore, the variables included in the multiple models varied between age groups. The following steps were implemented for all age groups: 1) A individual model for each hierarchical category (distal and proximal levels) was performed. The variables with statistical significance of $p < 0.20$ were kept for the subsequent level of the hierarchical model. 2) The variables of the previous level were added in the hierarchical order. First the distal level variables with statistical significance of $p < 0.05$ were kept in the model. Then, the proximal level variables were added to the model, and those with statistical significance ($p < 0.05$) were kept for the final model. 3) The multiple models was performed. Family income: estimated from the Brazilian minimum wage (R\$ 998.00) and converted to the dollar exchange rate (R\$ 4.013 = \$ 1) in December 30th, 2019. Birth weight according to sex and gestational age-specific percentiles using the INTERGROWTH-21st charts. SGA, Small for gestational age (< P10); AGA, Adequate for gestational age (P10-P90); and LGA, Large for gestational age (> P90). Consumption of ultra-processed foods: The following foods were considered ultra-processed: soda, other sweetened beverages (industrialized juices in cartons, coconut water in cartons, natural guarana or guarana syrup, currant drink, powdered fruit juice, natural fruit, juice with added sugar); packaged snacks (including crisps); cookies, crackers; candy, lollipops, and other sweets; industrialized bread; instant flours (rice, corn, wheat, or oat); processed meats (hamburger, ham, baloney, salami, nuggets, sausage, hotdogs); industrialized seasonings; and instant noodles. USD: United States Dollar; β : coefficient; 95% CI: 95% confidence interval. Developmental quotient (DQ) was calculated using the Survey of Well-being of Young Children's - Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire. The developmental age was estimated considering the child's age at the developmental milestones were achieved. $DQ = \text{developmental age} \div \text{chronological age}$ (Sheldrick et al., 2019). $DQ = 1$ indicates that expected age milestones have been attained; $DQ < 1$ and > 1 suggest the attainment of specific age milestones happened below or above expectations, respectively.

SUPPLEMENTARY DATA

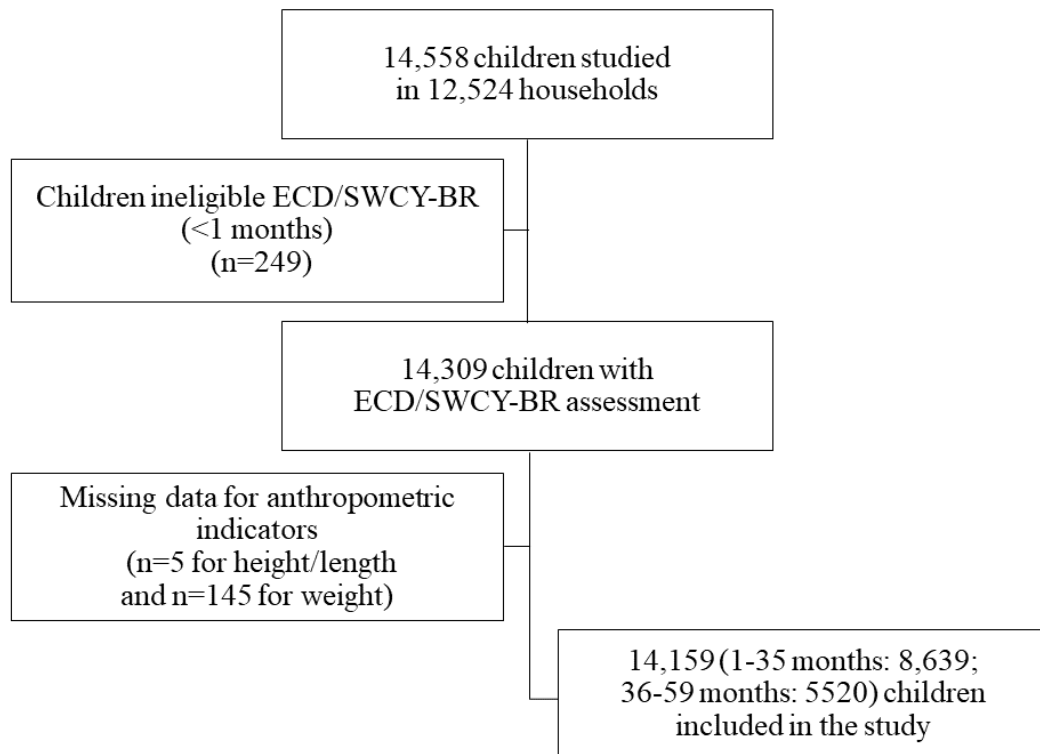


Figure S1. Flow diagram of children evaluated in ENANI-2019.

Note: ECD: early childhood development; SWCY-BR: Survey of Well-being of Young Children Brazilian version.

Table S1. Association between developmental quotient (DQ) and environmental, context, and nurturing care variables for children 1-59 months evaluated in ENANI-2019 (n= 14,159).

Variables	1-59 months			P-value
	β	95% IC		
Distal level				
Brazilian macro-region				
Southeast		(reference)		
North	-0.113	-0.181	-0.046	<0.001
Northeast	-0.033	-0.098	0.032	0.320
South	-0.069	-0.133	-0.005	0.034
Midwest	-0.051	-0.116	0.013	0.120
Sex				
Male		(reference)		
Female	0.072	0.047	0.096	<0.001
Maternal/caregiver education (years)				
0-7	-0.100	-0.135	-0.065	<0.001
8-10	-0.031	-0.075	0.013	0.163
≥ 11		(reference)		
Caregiver marital status				
Lives with partner		(reference)		
Lives without partner	0.041	0.001	0.082	0.045
Family income/per capita (USD) ¹				
< 62.2	-0.021	-0.086	0.043	0.052
62.2–124.4	-0.069	-0.121	-0.018	0.008
124.4–248.7	-0.005	-0.054	0.044	0.842
> 248.7		(reference)		
'Bolsa Familia' cash transfer program				
Yes		(reference)		
Receive other benefit	0.001	-0.074	0.076	0.984
Does not receive any benefit	0.067	0.006	0.128	0.031
Proximal level				
Mode of delivery				
Vaginal		(reference)		
Planned or elective C-section	0.003	-0.034	0.039	0.889
Emergency C-section	-0.044	-0.076	-0.012	0.007
Consumption of ultra-processed foods ³				
No		(reference)		
Yes	-0.317	-0.387	-0.247	<0.001
Daycare or school				
Public daycare or school		(reference)		
Private daycare or school	0.081	0.035	0.128	0.001

No	0.160	0.125	0.195	<0.001
----	-------	-------	-------	--------

Note: Multiple linear regression adjusted according to the hierarchical model. Individual models were developed for each group (all, 1-35 and 36-59 months). Therefore, the variables included in the multiple models varied between age groups. The "-" symbol that variable did not enter the multiple models. The following steps were implemented for all age groups: 1) A individual model for each hierarchical category (contextual, environmental, and nurturing care levels) was performed. The variables with statistical significance of $p < 0.20$ were kept for the subsequent level of the hierarchical model. 2) The variables of the previous level were added in the hierarchical order. First the contextual level variables with statistical significance of $p < 0.05$ were kept in the model. Then, the environment level variables were added to the model, and those with statistical significance ($p < 0.05$) were kept in the model. The nurturing care level variables were included in the model, and those with statistical significance ($p < 0.05$) were kept for the final model 3). The multiple model was performed. ¹: estimated from the Brazilian minimum wage (R\$ 998.00) and converted to the dollar exchange rate (R\$ 4.013 = \$ 1) in December 30th, 2019. ² Birth weight according to sex and gestational age-specific percentiles using the INTERGROWTH-21st charts. SGA, Small for gestational age (< P10); AGA, Adequate for gestational age (P10-P90); and LGA, Large for gestational age (> P90). ³: If the child received one or more ultra-processed foods the day before the interview. The following foods were considered ultra-processed: soda, other sweetened beverages (industrialized juices in cartons, coconut water in cartons, natural guarana or guarana syrup, currant drink, powdered fruit juice, natural fruit, juice with added sugar); packaged snacks (including crisps); cookies, crackers; candy, lollipops, and other sweets; industrialized bread; instant flours (rice, corn, wheat, or oat); processed meats (hamburger, ham, baloney, salami, nuggets, sausage, hotdogs); industrialized seasonings; and instant noodles. USD: United States Dollar; β : coefficient; SE: Standard error; R: Reference category; SE: Standard error. Developmental quotient (DQ) was calculated using the Survey of Well-being of Young Children's - Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire. The developmental age was estimated considering the child's age at the developmental milestones were achieved. $DQ = \text{developmental age} \div \text{chronological age}$ (Sheldrick et al., 2019). $DQ = 1$ indicates that expected age milestones have been attained; $DQ < 1$ and > 1 suggest the attainment of specific age milestones happened below or above expectations, respectively.

Artigo 2

FREITAS-COSTA *et al.* Association of development quotient with nutritional status of vitamins B6, B12, and folate in 6–59-month-old children: Results from the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2023.

FREITAS-COSTA *et al.* Associação do quociente de desenvolvimento com o estado nutricional de vitamina B6, B12 e folato em crianças de 6-59 meses: Resultados do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2023.

Abstract

Background: Vitamins B6, B12, and folate are essential for the formation and maintenance of the human brain, but studies evaluating these vitamins with early childhood development (ECD) in children under five are limited and controversial.

Objective: To evaluate the association between vitamins B6, B12, and folate concentrations/status and ECD.

Methods: Data regarding 6,520 children aged 6–59 months (from the Brazilian National Survey on Child Nutrition [ENANI-2019]) were analyzed. ECD was assessed using the Survey of Well-being of Young Children's milestones questionnaire. Vitamin B6 concentration (nmol/L) was classified according to the tertile of the distribution and with the cutoff <20 nmol/L. Folate concentrations >45.3 nmol/L were classified as high, and vitamin B12 <150 pmol/L as deficient. The graded response model was used to estimate developmental age, and the developmental quotient (DQ) was calculated as the developmental age divided by chronological age. Multiple linear regression models were adjusted for confounders.

Results: The DQ mean (95% confidence interval) for Brazilian children was 0.99 (0.97–1.01). Children aged 6–23 months (1.13 [1.10–1.16]) had a higher DQ mean than those aged 24–35 (0.99 [0.95–1.03]) and 36–59 months (0.89 [0.86–0.92]). Child age was inversely associated with DQ ($\beta=-0.007$; $p<0.001$). An interaction between child age and vitamin B12 deficiency in the DQ ($\beta=-0.005$; $p<0.001$) indicated that, in children aged 36–59 months, the DQ was markedly lower in children with B12 deficiency than in those without B12 deficiency. Vitamin B6 concentrations were directly associated with the DQ ($\beta=0.0004$; $p=0.031$) among children aged 24–59 months in the adjusted model. No association was observed between folate status and DQ.

Conclusions: In Brazil, the DQ is lower among older children, and those with vitamin B12 deficiency. Vitamin B6 status was directly associated with the DQ in children aged 24–59 months.

Keywords: Early child development; B vitamins; Vitamin B6; folate; cobalamin; vitamin B12; neurodevelopment; SWCY; children; low-income countries.

Introduction

Early childhood development (ECD) encompasses cognitive, physical, language, temperament, socio-environmental, and motor development, which begins at conception and extends to eight years of age (1). Achieving the full potential of development is a human right and a requirement for sustainable development (1).

Coping with malnourished children under five years of age has been a considerable public health challenge worldwide. Data from the United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF) indicate that, after major global efforts, from 2000 to 2020, the prevalence of stunting (Z-score of height for age < -2) has decreased by a third, but it still affects 55 million children (2). Despite this improvement, the micronutrient status of children remains a problem. In 2020, it was estimated that one in two children suffered from deficiencies of vitamins and minerals, including vitamin A and nutrients related to anemia, such as iron, vitamin B12, and folate (3), especially in low- and middle-income countries, such as Brazil (2).

Micronutrient inadequacy is associated with stunting and poor cognitive performance, limiting short- and long-term ECD (4). Most of the central nervous system formation happens in the prenatal period; however, in the postnatal period and during childhood part of the brain formation continues, e.g., the proliferation and migration of glial cells, an essential process for the functional organization of neuronal circuits (5). B vitamins and nutritional biomarkers participating in 1-carbon metabolism have been investigated as critical limiting factors in fetal and infant development. In addition, 1-carbon metabolism involves multiple physiological processes, including methylation of nucleic acids, myelination, and synthesis of neurotransmitters, purines, thymidine, and phospholipids (6, 7). Therefore, the 1-carbon metabolism is essential for the formation and maintenance of the human brain. These metabolic reactions are dependent on the dietary supply of methyl donors, including folate (vitamin B9) and methionine (8), as well as essential cofactors such as vitamins B12, B6, and riboflavin (9).

Folate and vitamin B12 supplementation during pregnancy has short- and long-term effects on ECD. Most studies indicate a positive effect on ECD (10-13), although some have found no effect (14, 15) whereas others suggest adverse effects of high-dose folate (> 1,000 µg/day) (16, 17). Vitamin B6, B12, and folate inadequacy in early childhood can adversely affect central nervous system homeostasis (5). This can limit long-term child development, as this is a continuous process in which previous stages limit the following phases. Studies regarding the association between vitamin B6, B12, and folate status in children under five years of age and ECD are limited, and their results remain controversial (18-25). Some authors have observed a direct association (18, 19, 21-23), whereas others have not observed or described an inverse association between these vitamins and ECD (20, 24, 25). Furthermore, no known epidemiological studies have assessed the relationship between these biomarkers and ECD in Brazilian children under five years of age or in other countries experiencing a similar nutritional transition process.

This study evaluated the association between vitamins B6, B12, and folate status and ECD in Brazilian children. We also assessed this association in different age groups to identify different behaviors, as the extent of brain development varies throughout early childhood.

Methods

Study design and participants

This study used data from the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019). The ENANI-2019 study population consisted of households with at least one child under five years of age. The following households were not eligible: (1) indigenous people who lived in villages; (2) foreigners residing in households where Portuguese was not spoken; (3) children with some condition that would disable them for anthropometric measurement; and (4) children living in hotels, pensions, orphanages, and hospitals.

The ENANI-2019 sample was calculated as 15,000 households in 123 municipalities and 26 states, and the Federal District. A sample size of 3,000 households per Brazilian macro-region was defined, considering a minimum proportion of 2%, a relative error estimate of 35%, a confidence level of 95%, and a sampling and design effect set at 2. More details on the sample design, the selection process of the households, and other methodological aspects can be found elsewhere (26, 27).

The ENANI-2019 is a population-based household survey conducted in a probability sample of 12,524 households between February 2019 and March 2020. A total of 14,558 children under five years of age were evaluated. In the study protocol, only children ≥ 6 months of age were eligible for drawing blood samples ($n = 12,598$ children). Among these, 8,829 (70.1%) had their blood samples collected. Adjustments to sample weights were made considering micronutrient analyses referring to a subset of the population surveyed by ENANI-2019 and the occurrence of non-response (lack of measures for one or more biomarkers) (26, 28). The subset used for analysis consisted of all children with complete vitamins B6, B12, and folate data ($n = 6,532$). The study sample comprised 6,520 children with information on vitamins B6, B12, folate, and ECD assessment (**Figure 1**).

Early childhood development assessment

ECD was assessed using the Survey of Well-being of Young Children (SWYC) milestones questionnaire, developed and validated by Sheldrick and Perrin (2013). A version of the SWYC has been translated, adapted, and validated for use in Brazilian children (29). We evaluated the internal consistency of the SWYC milestones questionnaire using the ENANI-2019 data and Cronbach's alpha. The results showed adequate performance (0.965 [95% confidence interval (CI), 0.963–0.968]). We also used confirmatory factor analysis to assess the unidimensionality of the questionnaire. The two-factor model showed a better fit than the one- and three-factor models. This result was consistent with the findings of Sheldrick and Perrin (2013).

The SWYC milestones questionnaire consists of 54 different developmental milestones that form 12 different sets of 10 age-specific items for the following age ranges: 0–3, 4–5, 6–8, 9–11, 12–14, 15–17, 18–22, 23–28, 29–34, 35–46, 47–58, and 59–65 months. It has quick and easy-to-read questions about daily activities for each age group, indicating the progress of one or more dimensions of child development. For example, in the 0–3 months age group, the development milestones include: “Follows a moving toy with his or her eyes” and “Looks when you call his or her name”. For children aged 35–46 months, some examples comprise: “Talks so other people can understand him or her most of the time” and “Tells you a story from a book or tv”. There were three response options: not at all, somewhat, or very much.

The ENANI-2019 data collection system automatically selected the appropriate set of developmental milestones according to the child's age, which was previously registered at the beginning of the interview. In cases where a child was under two years of age at the assessment and was born preterm (< 37 weeks of gestation), the corrected age was considered in selecting the appropriate questionnaire. The corrected age was calculated by subtracting the child's gestational age at birth from 40 weeks (full-term) and then subtracting the result from the child's

chronological age at the time of testing. For example, for a child born at 32 weeks of gestation who had a chronological age of 4 months and 10 days (132 days), it was subtracted from the child's chronological age of 8 weeks (56 days), and the set of items was established according to the corrected age (2 months and 16 days). Using a corrected age is a recommendation from the scientists that developed the SWYC. The main rationale argues that preterm children have a shorter development time, in the uterus, than those born at term. The expected differences tend to reduce over the first two years of life and are no longer critical from two years onward, so the correction is performed only for children under two years. The interviewers administered the questionnaire, and the respondent was the child's mother or caregiver with or without the help of other people, such as nannies.

Although we intended to study children aged up to 59 months, three children were older than 59 months on the day the questionnaire was administered. This was due to the differences between the date the household was selected and the day the SWYC questionnaire was administered. Therefore, we chose not to exclude these children to avoid bias, as the sample weight was adjusted based on these observations.

Blood collection and vitamin analyses

A trained professional performed children's blood collection at the household, and no fasting was needed. More details on procedures adopted for blood collection and processing and laboratory analyses are described in Castro et al. (2021).

Briefly, 8 mL of blood was collected and distributed in a trace tube (6 mL) and an ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tube (2 mL). The trace tube was wrapped in aluminum foil to stabilize the sample for photosensitive analyses. The samples were transported under refrigeration (2–8 °C) to a local laboratory, where the trace tubes were centrifuged for serum separation. Whole blood (0.5 mL) was transferred from an EDTA tube to an empty amber tube.

All samples were stored at freezing temperature (-20 °C) until laboratory analyses were performed in a central clinical test laboratory.

Vitamin B6 status (pyridoxal phosphate) was analyzed using whole blood and high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection equipment (HPLC; Chromsystems, Gräfelfing, Germany). Serum folate and vitamin B12 concentrations were analyzed using chemiluminescence enzyme immunoassays (DxI 800; Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Folate deficiency was classified as concentrations < 10 nmol/L, high folate status were classified as serum concentrations > 45.3 nmol/L (30), and vitamin B12 deficiency was classified as concentrations < 150 pmol/L (31). Vitamin B6 was assessed using the cutoff for insufficiency (<20 nmol/L) (32, 33) and the following tertile distribution: 1st: 10.92–93.06; 2nd: 93.06–144.03; and 3rd: 144.04–1531.41 nmol/L.

Co-variables

Dietary intake was assessed using a 24-hour recall (R24h). The R24h was applied only once due to logistical, and cost constraints. The data was collected using the 24-hour Food Recall Application (AppR24h), and the Infant Food Quantification Photographic Manual with photos of 101 foods with portions designed specifically for infant feeding assessment (34), both developed by the ENANI-2019 research team.

The R24h administration followed the approach of the multiple pass technique recommended by the United States Department of Agriculture (USDA) (35). This approach consists of five steps in the following order: 1) reporting the list of foods consumed by the child on the previous day; 2) questioning the list of commonly forgotten foods (soda, juice, breast milk, candy, cookies, bread, sugar, honey, among others); 3) filling the time and meal type for each food mentioned in the previous steps; 4) detailing of each food (type of preparation, place

where the meal was taken, and quantity/unit consumed); 5) Review of information provided by the mother/caregiver.

The Brazilian Food Composition Table (TBCA) was used to define the nutritional value of consumed foods (36). The TBCA has 34 dietary components of more than 4,600 food items, including in natura foods, culinary preparations, and industrialized foods. The reliability of the TBCA data is ensured by its compliance with the rules of the International Network of Food Data Systems (Infoods) and the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO/UN), that determine guidelines and criteria to be used in the generation, compilation and use of food composition data (37). The TBCA is freely available online at: <http://www.fcf.usp.br/tbca>.

The conversion of home measurements and units of food consumed into units of mass (g, mg, mcg) was performed using the Table of Referenced Measurements for Food Consumption in Brazil (38), and the Table of Evaluation of Food Consumption in Home Measurements (39). If some measurements were not identified in these references, the ENANI-2019 team weighed the food according to the reported home measurement. Finally, consistency analysis of the variables and database cleaning were performed to identify missing data and determine the cases to be corrected.

The vitamins dietary intake was classified as adequate and inadequate according to the Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes for each age group (40). The following cutoffs were used: B6 (0.3, 0.5, and 0.6 mg for 6-11, 12-47, and 48-59 months, respectively); B12 (0.5, 0.9, and 1.2 mcg for 6-11, 12-47, and 48-59 months, respectively), and folate (80, 150, and 200 mcg for 6-11, 12-47, and 48-59 months, respectively).

The use of micronutrient supplements (yes or no) at the time of the study and in the previous six months was investigated. We identified those that contained vitamins B6, B12, and folate. Details regarding supplement use for children in ENANI-2019 are available elsewhere

(41). Body mass index for age (BMI/age) and length/height-for-age z-scores were calculated considering the sex and age (days) of the child on the day of the anthropometric assessment according to WHO recommendations (42).

Chronological child age (months), attendance at daycare centers or schools (public, private, or no daycare/school), maternal/caregiver education (0–7, 8–10, or ≥ 11 years), and per-capita family income categories (0–62.2, 62.2–124.4, 124.4–248.7, or > 248.7 –33.000) were estimated from the Brazilian minimum wage (R\$ 998.00) and converted to the US dollar exchange rate (R\$ 4.013 = US\$ 1) in 2019.

Developmental quotient

Developmental age refers to the child's age of achievement of specific developmental milestones. This variable was estimated using the item response theory and graded response models (43), using the Mplus software version 7 (Los Angeles, EUA), with the full information method and incorporating the complex sample design (44). This method allows the evaluation of each responding item and not only the final score, as the item set can be biased—that is, there may be a disproportion in the number of activities more or less commonly achieved among the specified items. Therefore, reaching the maximum score on the scale may be easier in some age groups.

This procedure allowed estimation in all the 12 age groups listed before, including milestones that did not apply and using chronological age as one of the estimators. The SWYC comprises 54 developmental milestones; each child's mother/caregiver answered 10; thus, there are 44 milestones due to non-application for each age group. The estimated model allowed the construction of an item characteristic curve (ICC) for each milestone, representing the change in the probability of a given response (sometimes or always) from birth to 62 months of age and estimating the age of development. In addition, this method enables the analysis of

outcomes as a continuous variable. The item response theory model has been previously used to assess ECD with the SWCY (45, 46) and Denver Test (47).

The graded response model generated ICC and two parameters (α and β). α_1 and α_2 refer to the probable age at which children reach each developmental milestone, performing them sometimes (α_1) or always (α_2), respectively. β refers to the discrimination of each milestone. It describes the curve slope, indicating the probability of reaching the developmental milestone, which increases with the child's chronological age. ICC, α_1 , α_2 , and β made it possible to estimate developmental age according to the developmental milestones reached by each child.

The developmental quotient (DQ) was calculated by dividing developmental age by chronological age (45). The expected age milestones are attained when DQ equals 1. Values < 1 and > 1 suggest attaining age milestones below and above expectations, respectively.

Statistical analyses

The descriptive analysis comprised the estimation of the mean of DQ with 95% confidence intervals (95% CI). The coefficient of variation (CV) was used to assess the data homogeneity. CV is a dispersion measure obtained from the ratio between the standard error and estimated value for each indicator. $CV < 30\%$ was established as an adequate precision level for the indicators and variables evaluated in the ENANI-2019. Otherwise, the results should be interpreted with caution. All estimates presented in this manuscript show a $CV < 30\%$. For descriptive analyses, the child's chronological age was categorized as 6–23, 24–35, and 36–59 months. After graphical visualization of the different behaviors of the DQ in the age groups, we combined this variable in the multiple analyses into two categories: 6–23 and 24–59 months.

A Directed Acyclic Graph (DAG) (48) was used to better define the operating model for vitamins associated with ECD. The DAG was constructed considering factors related to

exposure (vitamin status) and outcome (ECD) based on the literature. The variables suggested by the DAG for adjustment of the models were maternal vitamin status during pregnancy and postpartum, breastfeeding practices, maternal/caregiver education, and dietary vitamin sources (**Figure 2**). Maternal vitamin status was not assessed, and indicators of breastfeeding practice data were collected only for children aged 0–23 months. The dietary vitamin sources were obtained from the 24-hour recall. However, the regression models did not consider these estimates because only one 24-hour recall was administered. Therefore, all models were adjusted to maternal/caregiver education and age group.

Linear regression analysis was performed to evaluate the association between chronological age and DQ. The independent interactions of chronological age in months and vitamins B6, B12, and folate status with the DQ were also evaluated. Multiple linear regression was used to assess the association between vitamins B6, B12, folate, and DQ adjusting for confounders identified through the DAG. Due to the importance of chronological age in child development, the interaction of vitamin concentration and child chronological age (6–23 and 24–59 months) was also evaluated using vitamins B6, B12, and DQ regression. The regression results were presented as the beta coefficient (β), standard error (SE), and p -value.

Pearson's correlation was used to assess the relationship between blood/serum concentration and dietary vitamins B6, B12, and folate intake. The analyses were performed considering the complex sample design of the study in the R language using *srvyr* and *survey* packages. The differences between the mean DQ and frequencies according to selected variables were considered statistically significant when there was no overlap between 95% CI. Statistical significance was considered when $p < 0.05$ for all other analyses.

Ethical approval

The ENANI-2019 was approved by the research ethics committee of the Clementino Fraga Filho University Hospital of the Federal University of Rio de Janeiro (CAAE:89798718.7.0000.5257). Research participation occurred after signing the free and informed consent form by the child's parents or caregivers and after hearing an explanation of all the ethical issues of the study.

Results

Six thousand five hundred and twenty children were evaluated in this analysis. The majority were aged between 36–59 (44.5%), followed by the 6–23 months age group (33.3%). Fifty-one percent were boys. Eighteen percent of the children were at risk of overweight, and 9.9% presented excessive weight. The prevalence of stunting was 6.1%. Most children lived in households with a per capita monthly income of US\$62.2–124.4 (35.3%), and their maternal/caregiver had ≥ 11 years of education (54.1%) (**Table 1**).

The prevalence of inadequate vitamin B6, B12, and folate dietary intake was 53.5, 14.5 and 20.6%, respectively. The prevalence of supplement use was 12.6% for vitamin B6, 8.1% for B12, and 5% for folate. The prevalence of vitamin B6 blood insufficiency was 2.6%, and vitamin B12 deficiency was 14.1%. We observed a prevalence of folate deficiency of 1.1% and high folate of 37.0% (**Table 1**). Weak correlations were observed between the dietary intake of vitamins B6, B12, and folate and serum/blood concentrations of vitamins B6, B12, and folate (**Table S1**).

The DQ mean (95% CI) for Brazilian children was 0.99 (0.97–1.01). Children aged 6–23 months (1.13 [1.10–1.16]) had a higher DQ mean than those aged 24–35 (0.99 [0.95–1.03]) and 36–59 months (0.89 [0.86–0.92]) (**Table 2**). The child's chronological age (months) was inversely associated with the DQ ($\beta = -0.007$; $SE = 0.0006$; $p < 0.001$) (**Figure 3**).

No differences were observed in the mean DQ between children with and those without adequate dietary intake for the three micronutrients evaluated. No statistical differences were observed in the DQ mean according to vitamin B6 blood status (tertiles or < 20 nmol/L) and age groups. Children with vitamin B12 deficiency had a higher DQ mean than those without deficiency (1.06 [1.01–1.12]; 0.98 [0.96–1.00]) when all age groups were evaluated, but no differences were observed for the age groups. No statistical differences were found in folate status and chronological age groups (**Table 2**).

Associations between vitamin B12 and folate serum concentrations, and DQ were not observed (**Table 3**). However, an interaction between chronological child age and DQ was observed when vitamin B12 groups were considered ($\beta = -0.005$; $SE = 0.001$; $p < 0.001$), indicating that among children with B12 deficiency, the DQ decreased more markedly with increasing chronological age compared with those without B12 deficiency (**Figure 4**).

The interaction between chronological child age and the vitamin B6 < 20 nmol/L ($\beta = 0.00157$; $SE = 0.00418$; $p = 0.707$); and tertiles (2nd tertile: $\beta = 0.001$; $SE = 0.001$; $p = 0.437$. 3rd tertile: $\beta = 0.001$; $SE = 0.001$; $p = 0.575$), and folate status groups ($\beta = -0.001$; $SE = 0.0011$; $p = 0.482$) with DQ were not statistically significant (**Supplementary Figures 1A, 1B, and 2**). Vitamin B6 blood concentration (nmol/L) were not associated with DQ when analyzed as a main independent factor. This variable needed interaction with the child's age (24–59 months) to express its association. The interaction indicated that vitamin B6 blood concentrations are directly associated with DQ ($\beta = 0.0004$; $SE = 0.002$; $p = 0.031$) in the adjusted models for this group. Among children aged 6–23 months, we did not observe a statistically significant association, indicating that vitamin B6 concentration is a DQ determinant only in the 24–59 months age group (**Figure 5, Table 3**).

Discussion

We found that the mean DQ was inversely associated with chronological age, indicating a potential delay in ECD ($DQ < 1$) when Brazilian children reach 36–59 months. This association was even more intense among children with vitamin B12 deficiency in this age group. Vitamin B6 status was directly associated with DQ in children aged 24–59 months, but no statistically significant association was observed between folate status and DQ.

Our findings are consistent with Brazilian studies showing lower ECD status among older children (49-51). Venancio et al. (2022) showed a lower prevalence of the attainment of expected age-specific developmental milestones among children aged 36–59 months compared with younger children (0–36 months) in a cross-sectional study in 16 municipalities in Ceará State (Brazil), with 6,447 children aged 0–59 months (50). Correia et al. (2019) conducted a population-based survey in Ceará State (Brazil) that included 3,566 children aged 0–6 years and observed a higher prevalence of ECD delay in communication, fine and gross motor skills, problem resolution, and personal-social domains among children aged 36–66 months than among those aged 2–35 months (51).

The difference in the attainment of developmental milestones according to age can be explained by different determinants, including a longer time of harmful exposure to development determinants, such as micronutrient inadequacy (52) and environmental aspects, such as access to health, opportunities for early learning, stressful situations, such as violence and poverty, and adequate food and cultural habits (53). The achievement of milestones in the first 12 months appeared to be less influenced by these factors. A previous study showed that children aged 0–42 months from Argentina, India, South Africa, and Turkey presented similar ages when reaching milestones until the first year of life (53). Subsequently, differences in attaining the milestones were observed between countries, especially for children older than 36

months, a period in which the environment and cultural factors seem to have a stronger influence on ECD.

Vitamin B12 is essential for the formation and maintenance of the central nervous system. A systematic literature review found a direct association between vitamin B12 status, mental and cognitive development, and school performance in school-aged children (≥ 5 years) and adolescents (54). Our results revealed that vitamin B12 deficiency was associated with a worse ECD status. Studies in India, Norway, China, and Nepal also observed a direct association between vitamin B12 status and ECD in children under five years of age (18, 21, 23, 25, 55). In contrast, some studies have shown inverse associations between vitamin B12 markers, such as homocysteine and methylmalonic acid, with development (19, 22) or did not find a statistically significant relationship (20, 24). Notably, these studies are still limited to populations with specific characteristics, such as restricted consumption of dietary vitamin B12 sources (21, 22), hospitalized or very young children (6 months) (19, 24), and limited sample size (< 200 children) (18, 19).

We observed a direct association between vitamin B6 concentrations and DQ among children aged 24–59 months but not in those aged 6–23 months. The absence of a significant association in the younger age group can be explained by the variation in vitamin B6 (pyridoxal phosphate) concentrations in this period; B6 concentrations are higher in the first few months after birth and decrease after six months of life (56). In addition, the development of older children is more influenced by environmental factors, such as health and adequate nutrition, than that of younger children. To the best of our knowledge, a unique cross-sectional study carried out with 321 children aged five years in Nepal observed a direct association between plasma vitamin B6 concentration and ECD test results (25). The relationship between vitamin B6 and ECD has also been demonstrated in studies that evaluated vitamin B6 concentration in

breast milk (57, 58). Breast milk is the main dietary source of vitamin B6 in infants and is directly related to vitamin B6 status (59).

Folate plays a vital role in brain development. During pregnancy, folate deficiency has been established as a cause of neural tube defects (60). Although the data are sparse during childhood, low folate status are associated with lower linear growth rates (61). A positive effect on ECD was observed when children aged 5–9 months with malaria were supplemented with folate/iron/zinc (62) and healthy children aged 6–30 months received vitamin B12 supplementation (63). No statistically significant association was found between folate status and ECD in children under five years of age in Taiwan (24) and Nepal (25). This result is consistent with our finding of no association between folate nutritional status and ECD assessed by the DQ. In contrast, in an Indian cohort of 650 children aged 12–18 months, folate status was directly associated with ECD only in the group with serum B12 concentrations below the 25th percentile (> 145 pmol/L) (23). In our study, no statistically significant difference was found in the means of the DQ between children with or without high folate levels. We are unaware of other studies that evaluated high folate levels and ECD in this age group.

We found that vitamin B12 sufficiency and higher vitamin B6 concentrations were related to improved ECD. This indicates that interventions that improve nutrient concentrations are essential to achieve full child development. Interventions in ECD have short- and long-term benefits for learning, productivity, health, and social cohesion (1). From this perspective, Sustainable Development Goal 4.2 proposes to ensure that all children have access to quality care and pre-primary education for ECD (64). Similarly, the Lancet series “Advancing ECD: from science to scale” coined the term “nurturing care,” which deals with a stable environment for child development; adequate nutrition is a component of this care (65).

This study had some limitations. The study was cross-sectional, which prevents us from making temporal conclusions regarding the effects of vitamin B12 deficiency and vitamin B6

concentration on ECD. We measured serum folate that reflects the recent status and not chronic nutritional status, in contrast to the erythrocyte folate assessment. We also did not have access to the data on the maternal nutritional status during pregnancy. Moreover, the breastfeeding practices to which children were exposed were available only for children under two years of age. These are essential variables that impact both the nutritional status of these nutrients and ECD in the short- and long-term (66).

Among the strengths of the study is the use of the DQ to assess ECD, a continuous parameter that considers each developmental milestone response and the child's chronological age at its achievement, and not a summed score and cutoff points, like most child development scales and studies. This allowed us to capture more variability in the outcome occurrence. This is a population-based survey of children under five years of age, pioneering the collection of biological samples to assess the nutritional status of this population in Brazil. Unlike most studies that have evaluated the association between the nutritional status of vitamins B6, B12, folate, and ECD, this is the first such study in Latin America. Our study reinforces the need to integrate public policies on nutrition and child development, as suggested by the World Health Organization (1). Therefore, they serve as vital evidence to support public policies in Brazil and other countries undergoing the same stage of nutritional transition.

In summary, the ECD of Brazilian children was lower among older children, and this association was even more intense among those with vitamin B12 deficiency. Furthermore, vitamin B6 status was directly associated with the DQ in children aged 24–59 months. Children are at risk of nutritional deficiencies in early childhood, and public policies must focus on this age group as these deficiencies tend to impede full development.

References

1. WHO. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Edition ed. Improving Early Childhood Development: WHO Guideline. Geneva: World Health Organization, 2020.
2. United Nations Children's Fund (UNICEF). Nutrition, for Every Child: UNICEF Nutrition Strategy 2020–2030. In: UNICEF U, ed. New York.
3. WHO. Department of Nutrition and Food Safety key achievements 2021. Edition ed. Geneva: World Health Organization, 2022.
4. Yakoob MY, Lo CW. Nutrition (Micronutrients) in Child Growth and Development: A Systematic Review on Current Evidence, Recommendations and Opportunities for Further Research. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP* 2017;38(8):665-79. doi: 10.1097/dbp.0000000000000482.
5. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychology review* 2010;20(4):327-48. doi: 10.1007/s11065-010-9148-4.
6. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell metabolism* 2017;25(1):27-42. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.009.
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. *The Journal of nutrition* 2015;145(7):1636s-80s. doi: 10.3945/jn.114.206599.
8. Fox JT, Stover PJ. Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitamins and hormones* 2008;79:1-44. doi: 10.1016/s0083-6729(08)00401-9.
9. Bertolo RF, McBreaarty LE. The nutritional burden of methylation reactions. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2013;16(1):102-8. doi: 10.1097/MCO.0b013e32835ad2ee.
10. D'Souza N, Behere RV, Patni B, Deshpande M, Bhat D, Bhalerao A, Sonawane S, Shah R, Ladkat R, Yajnik P, et al. Pre-conceptional Maternal Vitamin B12 Supplementation Improves Offspring Neurodevelopment at 2 Years of Age: PRIYA Trial. *Frontiers in pediatrics* 2021;9:755977. doi: 10.3389/fped.2021.755977.
11. Thomas S, Thomas T, Bosch RJ, Ramthal A, Bellinger DC, Kurpad AV, Duggan CP, Srinivasan K. Effect of Maternal Vitamin B12 Supplementation on Cognitive Outcomes in South Indian Children: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Maternal and child health journal* 2019;23(2):155-63. doi: 10.1007/s10995-018-2605-z.

12. Caffrey A, McNulty H, Rollins M, Prasad G, Gaur P, Talcott JB, Witton C, Cassidy T, Marshall B, Dornan J, et al. Effects of maternal folic acid supplementation during the second and third trimesters of pregnancy on neurocognitive development in the child: an 11-year follow-up from a randomised controlled trial. *BMC medicine* 2021;19(1):73. doi: 10.1186/s12916-021-01914-9.
13. Yan J, Zhu Y, Cao LJ, Liu YY, Zheng YZ, Li W, Huang GW. Effects of maternal folic acid supplementation during pregnancy on infant neurodevelopment at 1 month of age: a birth cohort study in China. *European journal of nutrition* 2020;59(4):1345-56. doi: 10.1007/s00394-019-01986-7.
14. Srinivasan K, Thomas S, Anand S, Jayachandra M, Thomas T, Strand TA, Kurpad AV, Duggan CP. Vitamin B-12 Supplementation during Pregnancy and Early Lactation Does Not Affect Neurophysiologic Outcomes in Children Aged 6 Years. *The Journal of nutrition* 2020;150(7):1951-7. doi: 10.1093/jn/nxaa123.
15. Srinivasan K, Thomas T, Kapanee AR, Ramthal A, Bellinger DC, Bosch RJ, Kurpad AV, Duggan C. Effects of maternal vitamin B12 supplementation on early infant neurocognitive outcomes: a randomized controlled clinical trial. *Maternal & child nutrition* 2017;13(2). doi: 10.1111/mcn.12325.
16. Valera-Gran D, García de la Hera M, Navarrete-Muñoz EM, Fernandez-Somoano A, Tardón A, Julvez J, Forns J, Lertxundi N, Ibarluzea JM, Murcia M, et al. Folic acid supplements during pregnancy and child psychomotor development after the first year of life. *JAMA pediatrics* 2014;168(11):e142611. doi: 10.1001/jamapediatrics.2014.2611.
17. Valera-Gran D, Navarrete-Muñoz EM, Garcia de la Hera M, Fernández-Somoano A, Tardón A, Ibarluzea J, Balluerka N, Murcia M, González-Safont L, Romaguera D, et al. Effect of maternal high dosages of folic acid supplements on neurocognitive development in children at 4-5 y of age: the prospective birth cohort Infancia y Medio Ambiente (INMA) study. *The American journal of clinical nutrition* 2017;106(3):878-87. doi: 10.3945/ajcn.117.152769.
18. Azad C, Jat KR, Kaur J, Guglani V, Palta A, Tiwari A, Bansal D. Vitamin B(12) status and neurodevelopmental delay in Indian infants: a hospital-based cross-sectional study. *Paediatrics and international child health* 2020;40(2):78-84. doi: 10.1080/20469047.2019.1638130.
19. Torsvik IK, Ueland PM, Markestad T, Midttun Ø, Bjørke Monsen AL. Motor development related to duration of exclusive breastfeeding, B vitamin status and B12

- supplementation in infants with a birth weight between 2000-3000 g, results from a randomized intervention trial. *BMC pediatrics* 2015;15:218. doi: 10.1186/s12887-015-0533-2.
20. Metwally AM, Salah El- Din EM, Shehata MA, Shaalan A, El Etreby LA, Kandeel WA, Shaaban SY, Rabah TM. Early Life Predictors of Socio-Emotional Development in a Sample of Egyptian Infants. *PloS one* 2016;11(7):e0158086. doi: 10.1371/journal.pone.0158086.
 21. Sheng X, Wang J, Li F, Ouyang F, Ma J. Effects of dietary intervention on vitamin B(12) status and cognitive level of 18-month-old toddlers in high-poverty areas: a cluster-randomized controlled trial. *BMC pediatrics* 2019;19(1):334. doi: 10.1186/s12887-019-1716-z.
 22. Kvestad I, Hysing M, Shrestha M, Ulak M, Thorne-Lyman AL, Henjum S, Ueland PM, Midttun Ø, Fawzi W, Chandyo RK, et al. Vitamin B-12 status in infancy is positively associated with development and cognitive functioning 5 y later in Nepalese children. *The American journal of clinical nutrition* 2017;105(5):1122-31. doi: 10.3945/ajcn.116.144931.
 23. Strand TA, Taneja S, Ueland PM, Refsum H, Bahl R, Schneede J, Sommerfelt H, Bhandari N. Cobalamin and folate status predicts mental development scores in North Indian children 12-18 mo of age. *The American journal of clinical nutrition* 2013;97(2):310-7. doi: 10.3945/ajcn.111.032268.
 24. Lin YC, Chung CJ, Huang YL, Hsieh RL, Huang PT, Wu MY, Ao PL, Shiue HS, Huang SR, Su CT, et al. Association of plasma folate, vitamin B12 levels, and arsenic methylation capacity with developmental delay in preschool children in Taiwan. *Arch Toxicol* 2019;93(9):2535-44. doi: 10.1007/s00204-019-02540-4.
 25. Kvestad I, McCann A, Chandyo RK, Giil LM, Shrestha M, Ulak M, Hysing M, Ueland PM, Strand TA. One-Carbon Metabolism in Nepalese Infant-Mother Pairs and Child Cognition at 5 Years Old. *The Journal of nutrition* 2021;151(4):883-91. doi: 10.1093/jn/nxaa403.
 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. *Cadernos de saude publica* 2021;37(8):e00037221. doi: 10.1590/0102-311x00037221.
 27. UFRJ. Aspectos Metodológicos: Descrição geral do estudo 1: ENANI 2019. - Documento eletrônico. Rio de Janeiro, RJ: UFRJ, 2021. Disponível em:

- <https://enani.nutricao.ufrj.br/index.php/relatorios/>: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, 2021.
28. Castro IRR, Normando P, Alves-Santos NH, Bezerra FF, Citelli M, Pedrosa LFC, Jordão 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. *Cadernos de saude publica* 2021;3737(8):e00301120. doi: 10.1590/0102-311x00301120.
 29. Moreira RS, Magalhães LdC, Siqueira CM, Alves CRL. Cross-cultural adaptation of the child development surveillance instrument "Survey of Wellbeing of Young Children (SWYC)" in the Brazilian context. *Journal of Human Growth and Development* 2019;29:28-38.
 30. WHO. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. Geneva: World Health Organization, 2015.
 31. de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food and nutrition bulletin* 2008;29(2 Suppl):S238-44. doi: 10.1177/15648265080292s129.
 32. Rose CS, György P, Butler M, Andres R, Norris AH, Shock NW, Tobin J, Brin M, Spiegel H. Age differences in vitamin B6 status of 617 men. *The American journal of clinical nutrition* 1976;29(8):847-53. doi: 10.1093/ajcn/29.8.847.
 33. Tarr JB, Tamura T, Stokstad EL. Availability of vitamin B6 and pantothenate in an average American diet in man. *The American journal of clinical nutrition* 1981;34(7):1328-37. doi: 10.1093/ajcn/34.7.1328.
 34. Crispim SP, Kac G, Lacerda EMA, Castro IRR. Manual fotográfico de quantificação alimentar infantil. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2018.
 35. Moshfegh AJ, Rhodes DG, Baer DJ, Murayi T, Clemens JC, Rumpler WV, Paul DR, Sebastian RS, Kuczynski KJ, Ingwersen LA, et al. The US Department of Agriculture Automated Multiple-Pass Method reduces bias in the collection of energy intakes. *The American journal of clinical nutrition* 2008;88(2):324-32. doi: 10.1093/ajcn/88.2.324.
 36. USP. Internet: <http://www.fcf.usp.br/tbca>. (accessed March 13th 2023).
 37. INFOODS. Internet: <https://www.fao.org/infoods/infoods/en/> (accessed March 13th 2023).
 38. Pinheiro A LE, Benzecry E, Gomes M, Costa V. Tabela de avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

39. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: tabela de medidas referidas para os alimentos consumidos no Brasil. In: (IBGE) IBdGeE, ed. Rio de Janeiro, 2011.
40. Institute of Medicine. Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114310/> doi: 10.17226/6015: Washington (DC): National Academies Press (US), 1998.
41. Freitas MB, Castro IRR, Schincaglia RM, Carneiro LBV, Alves-Santos NH, Normando P, Andrade PG, G K. Characterization of the use of micronutrient supplements by Brazilian children from 6 to 59 months of age-ENANI-2019. *Cadernos de Saúde Pública*, 2023, in press.
42. World Health Organization. WHO child growth standards : length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight -for-height and body mass index-for-age : methods and development. Geneva: World Health Organization, 2006.
43. Samejima F. Graded Response Model. Edtion ed. In: van der Linden WJ, Hambleton RK, eds. *Handbook of Modern Item Response Theory*. New York, NY: Springer New York, 1997:85-100.
44. Muthén L, Muthén B. *Mplus User's Guide*. Seventh Edition. ed. Los Angeles, CA, 1998-2015.
45. Sheldrick RC, Schlichting LE, Berger B, Clyne A, Ni P, Perrin EC, Vivier PM. Establishing New Norms for Developmental Milestones. *Pediatrics* 2019;144(6). doi: 10.1542/peds.2019-0374.
46. Sheldrick RC, Perrin EC. Evidence-based milestones for surveillance of cognitive, language, and motor development. *Acad Pediatr* 2013;13(6):577-86. doi: 10.1016/j.acap.2013.07.001.
47. Drachler Mde L, Marshall T, de Carvalho Leite JC. A continuous-scale measure of child development for population-based epidemiological surveys: a preliminary study using Item Response Theory for the Denver Test. *Paediatric and perinatal epidemiology* 2007;21(2):138-53. doi: 10.1111/j.1365-3016.2007.00787.x.
48. Tennant PWG, Murray EJ, Arnold KF, Berrie L, Fox MP, Gadd SC, Harrison WJ, Keeble C, Ranker LR, Textor J, et al. Use of directed acyclic graphs (DAGs) to identify confounders in applied health research: review and recommendations. *International journal of epidemiology* 2021;50(2):620-32. doi: 10.1093/ije/dyaa213.

49. Rocha HAL, Sudfeld CR, Leite ÁJM, Machado MMT, Rocha SGM, Campos JS, Silva ACE, Correia LL. Maternal and neonatal factors associated with child development in Ceará, Brazil: a population-based study. *BMC pediatrics* 2021;21(1):163. doi: 10.1186/s12887-021-02623-1.
50. Venancio SI, Teixeira JA, de Bortoli MC, Bernal RTI. Factors associated with early childhood development in municipalities of Ceará, Brazil: a hierarchical model of contexts, environments, and nurturing care domains in a cross-sectional study. *The Lancet Regional Health - Americas* 2022;5:100139. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.100139>.
51. Correia LL, Rocha HAL, Sudfeld CR, Rocha S, Leite Á JM, Campos JS, Silva ACE. Prevalence and socioeconomic determinants of development delay among children in Ceará, Brazil: A population-based study. *PloS one* 2019;14(11):e0215343. doi: 10.1371/journal.pone.0215343.
52. Hadders-Algra M. Social and biological determinants of growth and development in underprivileged societies. *Jornal de pediatria* 2016;92(3):217-9. doi: 10.1016/j.jpmed.2016.02.001.
53. Ertem IO, Krishnamurthy V, Mulaudzi MC, Sguassero Y, Balta H, Gulumser O, Bilik B, Srinivasan R, Johnson B, Gan G, et al. Similarities and differences in child development from birth to age 3 years by sex and across four countries: a cross-sectional, observational study. *The Lancet Global Health* 2018;6(3):e279-e91. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30003-2.
54. Venkatramanan S, Armata IE, Strupp BJ, Finkelstein JL. Vitamin B-12 and Cognition in Children. *Advances in nutrition (Bethesda, Md)* 2016;7(5):879-88. doi: 10.3945/an.115.012021.
55. Torsvik I, Ueland PM, Markestad T, Bjørke-Monsen AL. Cobalamin supplementation improves motor development and regurgitations in infants: results from a randomized intervention study. *The American journal of clinical nutrition* 2013;98(5):1233-40. doi: 10.3945/ajcn.113.061549.
56. Borschel M. Vitamin B-6 in infancy: Requirements and current feeding practices. Edition ed. In: DL. e, ed. *Vitamin B-6 metabolism in pregnancy, lactation and infancy*. Boca Raton, London: Tokyo: CRC Press, 1995:p. 109-24.
57. Lockyer F, McCann S, Moore SE. Breast Milk Micronutrients and Infant Neurodevelopmental Outcomes: A Systematic Review. *Nutrients* 2021;13(11). doi: 10.3390/nu13113848.

58. Boylan LM, Hart S, Porter KB, Driskell JA. Vitamin B-6 content of breast milk and neonatal behavioral functioning. *Journal of the American Dietetic Association* 2002;102(10):1433-8. doi: 10.1016/s0002-8223(02)90317-2.
59. Ueland PM, Ulvik A, Rios-Avila L, Middtun Ø, Gregory JF. Direct and Functional Biomarkers of Vitamin B6 Status. *Annual review of nutrition* 2015;35:33-70. doi: 10.1146/annurev-nutr-071714-034330.
60. Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *The American journal of clinical nutrition* 2000;71(5 Suppl):1295s-303s. doi: 10.1093/ajcn/71.5.1295s.
61. Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *The Lancet Neurology* 2006;5(11):949-60. doi: 10.1016/s1474-4422(06)70598-1.
62. Olney DK, Kariger PK, Stoltzfus RJ, Khalfan SS, Ali NS, Tielsch JM, Sazawal S, Black R, Allen LH, Pollitt E. Developmental effects of micronutrient supplementation and malaria in Zanzibari children. *Early Human Development* 2013;89(9):667-74. doi: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2013.04.013>.
63. Kvestad I, Taneja S, Kumar T, Hysing M, Refsum H, Yajnik CS, Bhandari N, Strand TA. Vitamin B12 and Folic Acid Improve Gross Motor and Problem-Solving Skills in Young North Indian Children: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *PloS one* 2015;10(6):e0129915. doi: 10.1371/journal.pone.0129915.
64. Griggs D, Stafford-Smith M, Gaffney O, Rockström J, Öhman MC, Shyamsundar P, Steffen W, Glaser G, Kanie N, Noble I. Sustainable development goals for people and planet. *Nature* 2013;495(7441):305-7. doi: 10.1038/495305a.
65. Black MM, Walker SP, Fernald LCH, Andersen CT, DiGirolamo AM, Lu C, McCoy DC, Fink G, Shawar YR, Shiffman J, et al. Early childhood development coming of age: science through the life course. *Lancet (London, England)* 2017;389(10064):77-90. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31389-7.
66. Neves PAR, Gatica-Domínguez G, Santos IS, Bertoldi AD, Domingues M, Murray J, Silveira MF. Poor maternal nutritional status before and during pregnancy is associated with suspected child developmental delay in 2-year old Brazilian children. *Scientific Reports* 2020;10(1):1851. doi: 10.1038/s41598-020-59034-y.

TABLES

Table 1. Characteristics of children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).

Variables	Frequency (%)	95% CI
Age group (months)		
6-23	33.3	33.2; 33.4
24-35	22.2	22.2; 22.2
36-59	44.5	44.4; 44.6
Sex		
Male	51.1	51.0; 51.2
Female	48.9	48.8; 49.0
Body mass index for age (Z-score)		
Underweight ($Z < -2$)	1.9	1.2; 2.7
Normal ($-2 \leq Z \leq 1$)	69.4	66.7; 71.7
Overweight risk ($1 < Z \leq 2$)	18.8	17.0; 20.5
Excessive weight ($Z > 2$)	9.9	8.3; 11.5
Length/height-for-age (Z-score < -2)		
Yes	6.1	4.8; 7.3
No	93.9	92.4; 95.0
Per-capita family income (USD) ¹		
< 62.2	27.5	23.7; 31.4
62.2–124.4	35.3	32.6; 37.9
124.5–248.7	24.3	21.5; 27.0
> 248.7	12.9	10.7; 15.2
Maternal/ caregiver education (years)		
0-7	23.9	21.8; 26.0
8-10	22.0	19.7; 24.2
≥ 11	54.1	51.4; 56.9
Vitamin B6 dietary intake ²		
Adequate	46.5	43.3; 49.7
Inadequate	53.5	50.3; 56.7
Vitamin B6 supplement use		
Yes	12.6	10.3; 15.0
No	87.4	85.0; 89.7
Vitamin B6 blood insufficiency ³		
Yes	2.6	0.9; 4.3
No	97.4	95.7; 99.1
Vitamin B6 blood (tertile) ³		
1 st	33.3	29.9; 36.6
2 ^{sd}	33.3	30.9; 35.8
3 rd	33.4	30.2; 36.7
Vitamin B12 dietary intake ²		
Adequate	85.5	83.5; 87.6
Inadequate	14.5	12.4; 16.5
Vitamin B12 supplement use		
Yes	8.1	6.4; 9.9
No	91.9	90.1; 93.6
Vitamin B12 serum deficiency ⁴		

Yes	14.1	11.9; 16.3
No	85.9	83.7; 88.1
Folate dietary intake ²		
Adequate	79.4	77.1; 81.6
Inadequate	20.6	18.4; 22.9
Folic acid supplement use		
Yes	5.0	3.4; 6.6
No	95.0	93.4; 96.6
Folate serum deficiency ⁵		
Yes	1.1	0.5; 1.7
No	98.9	98.3; 99.5
Folate serum (high) ⁵		
Yes	37.0	33.4; 40.5
No	63.0	59.5; 66.6

Notes: 95% CI: 95% confidence interval; ¹Estimated from the Brazilian minimum wage (R\$ 998.00) and converted to the U.S. dollar exchange rate (R\$ 4.013 = US\$ 1) in 2019. ²Vitamin B6, folate, and B12 dietary intake adequacy were defined according to Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes: B6 (0.3, 0.5, and 0.6 mg for 6-11, 12-47, and 48-59 months, respectively); B12 (0.5, 0.9, and 1.2 mcg for 6-11, 12-47, and 48-59 months, respectively), and folate (80, 150, and 200 mcg for 6-11, 12-47, and 48-59 months, respectively). ³Vitamin B6 blood insufficiency was defined as < 20 nmol/L and vitamin B6 blood tertiles were defined as: 1st ≤ 93.1; 2nd = 93.1–144.03; and 3rd ≥ 144.04 nmol/L. ⁴Vitamin B12 serum deficiency was defined as < 150 pmol/L. ⁵Folate serum deficiency and high folate level were defined as < 10 and > 45.3 nmol/L, respectively.

Table 2. Developmental quotient (DQ) means and 95% confidence intervals according to vitamin B6, B12 and folate variables, and age group for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).

Variables	Child chronological age (months)											
	All			6-23		24-35		36-59				
	Mean	95% CI		Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI			
Brazil	0.99	0.97	1.01	1.13 ^{ab}	1.10	1.16	0.99 ^{ac}	0.95	1.03	0.89 ^{bc}	0.86	0.92
Vitamin B6 dietary intake ¹												
Adequate	1.01	0.98	1.03	1.16	1.11	1.21	1.01	0.95	1.07	0.91	0.87	0.95
Inadequate	0.98	0.95	1.01	1.11	1.07	1.15	0.97	0.92	1.02	0.87	0.83	0.90
Vitamin B6 supplement use												
Yes	1.00	0.94	1.05	1.20	1.08	1.31	0.99	0.91	1.08	0.90	0.85	0.96
No	0.99	0.97	1.01	1.13	1.10	1.15	0.99	0.95	1.03	0.89	0.86	0.91
Vitamin B6 serum insufficiency ²												
Yes	1.03	0.96	1.09	1.19	0.96	1.41	0.90	0.78	1.03	0.93	0.80	1.05
No	0.99	0.97	1.01	1.13	1.10	1.16	0.99	0.95	1.03	0.89	0.86	0.91
Vitamin B6 blood (tertile) ²												
1 st	0.97	0.94	1.00	1.14	1.09	1.19	0.96	0.89	1.02	0.86	0.82	0.90
2 ^{sd}	0.98	0.96	1.01	1.11	1.06	1.17	1.01	0.94	1.07	0.90	0.86	0.93
3 rd	1.02	0.98	1.06	1.14	1.08	1.20	1.01	0.95	1.06	0.91	0.87	0.94
Vitamin B12 dietary intake ¹												
Adequate	0.99	0.97	1.00	1.12	1.09	1.15	1.00	0.95	1.04	0.89	0.86	0.91
Inadequate	1.03	0.98	1.09	1.20	1.12	1.27	0.94	0.86	1.03	0.90	0.84	0.95
Vitamin B12 supplement use												

Yes	0.98	0.93	1.03	1.14	1.05	1.24	0.96	0.87	1.05	0.89	0.83	0.95
No	0.99	0.97	1.01	1.13	1.10	1.16	0.99	0.95	1.03	0.89	0.86	0.92
Vitamin B12 serum deficiency ³												
Yes	1.06 ^a	1.01	1.12	1.20	1.14	1.25	0.88	0.78	0.99	0.86	0.79	0.93
No	0.98 ^a	0.96	1.00	1.11	1.08	1.14	1.00	0.96	1.04	0.89	0.86	0.92
Folate dietary intake ¹												
Adequate	0.99	0.97	1.02	1.15	1.12	1.18	0.99	0.94	1.04	0.88	0.85	0.91
Inadequate	0.99	0.95	1.02	1.07	1.00	1.14	0.99	0.91	1.06	0.92	0.88	0.96
Folic acid supplement use												
Yes	0.99	0.91	1.07	1.10	0.96	1.23	0.91	0.83	1.00	0.96	0.86	1.05
No	0.99	0.97	1.01	1.13	1.10	1.16	0.99	0.95	1.03	0.88	0.86	0.91
Folate serum deficiency ⁴												
Yes	0.92	0.83	1.00	1.12	1.03	1.21	0.95	0.80	1.11	0.86	0.74	0.98
No	0.99	0.97	1.01	1.13	1.10	1.16	0.99	0.95	1.03	0.89	0.86	0.92
Folate serum (high) ³												
Yes	1.01	0.98	1.04	1.14	1.09	1.18	0.98	0.92	1.03	0.88	0.85	0.90
No	0.98	0.95	1.01	1.13	1.09	1.16	0.99	0.94	1.05	0.89	0.86	0.93

Notes: 95% CI: 95% confidence interval; ^{a,b, and c} Upper script letters represent differences between mean DQ between the variables categories using lack of overlapping 95% CI. The developmental quotient (DQ) was calculated using the Survey of Well-being of Young Children - Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire. Developmental age was estimated considering the child's age, and developmental milestones were achieved. Development Quotient (DQ) = developmental age ÷ chronological age, (45). DQ = 1 indicates that expected age milestones have been attained; DQ < 1 and > 1 suggest that the attainment of specific age milestones occurred below or above expectations, respectively. ¹ Vitamin B6, folate, and B12 dietary intake adequacy were defined according to Recommended Dietary Allowances and Adequate

Intakes: B6 (0.3, 0.5, and 0.6 mg for 6-11, 12-47, and 48-59 months, respectively); B12 (0.5, 0.9, and 1.2 mcg for 6-11, 12-47, and 48-59 months, respectively), and folate (80, 150, and 200 mcg for 6-11, 12-47, and 48-59 months, respectively). ²Vitamin B6 blood insufficiency was defined as < 20 nmol/L and vitamin B6 blood tertiles were defined as: 1st = < 93.1 ; 2nd = $93.1-144.03$; and 3rd = ≥ 144.04 nmol/L. ³ Vitamin B12 serum deficiency was defined as < 150 pmol/L. ⁴ Folate serum deficiency and high folate concentrations were defined as < 10 and > 45.3 nmol/L, respectively.

Table 3. Association between developmental quotient (DQ) and vitamin B6, B12, and folate with chronological age interaction for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520)¹.

Variables	Coefficient	Standard error	p-value
Vitamin B6 blood concentrations (nmol/L)			
Vitamin B6 (nmol/L)	-0.0002	0.0002	0.334
Vitamin B6 (nmol/L): Age - 24-59 months ²	0.0004	0.0002	0.031
Vitamin B12 serum concentrations (pmol/L)			
Vitamin B12 (pmol/L)	-0.0001	0.0001	0.240
Vitamin B12 (pmol/L): Age - 24-59 months ²	0.0001	0.0001	0.116
Folate serum concentrations (nmol/L)			
Folate (nmol/L)	0.0005	0.0006	0.382
Folate (nmol/L): Age - 24-59 months ²	-0.0008	0.0007	0.243

Notes: ²Multiple linear regression adjusted for maternal/caregiver education and age group. The developmental quotient (DQ) was calculated using the Survey of Well-being of Young Children - Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire. Developmental age was estimated considering the child's age, and developmental milestones were achieved. Development Quotient (DQ) = developmental age ÷ chronological age, (45). DQ = 1 indicates that expected age milestones have been attained; DQ < 1 and > 1 suggest that the attainment of specific age milestones occurred below or above expectations, respectively.

FIGURE TITLES AND LEGENDS

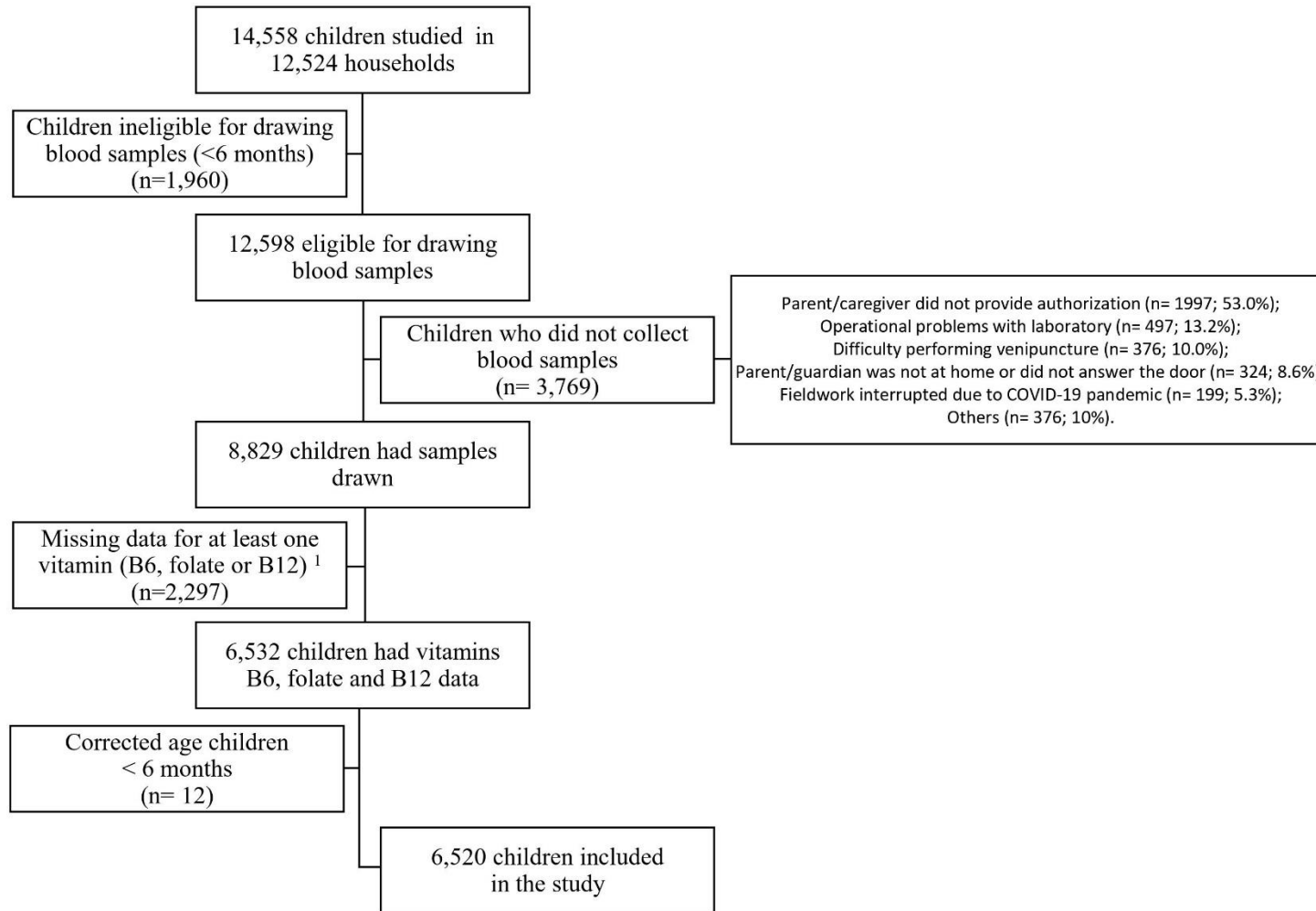


Figure 1. Flow diagram of children with blood samples and early childhood development data evaluated in ENANI-2019.

Note: ¹ Children without complete data for vitamins B6, B12, and folate blood/serum biomarkers. The difference is due to the different matrices (whole blood, serum, or plasma) used for nutritional status assessment and the prioritization of the material collected for some biomarkers, considering the main objectives of ENANI-2019.

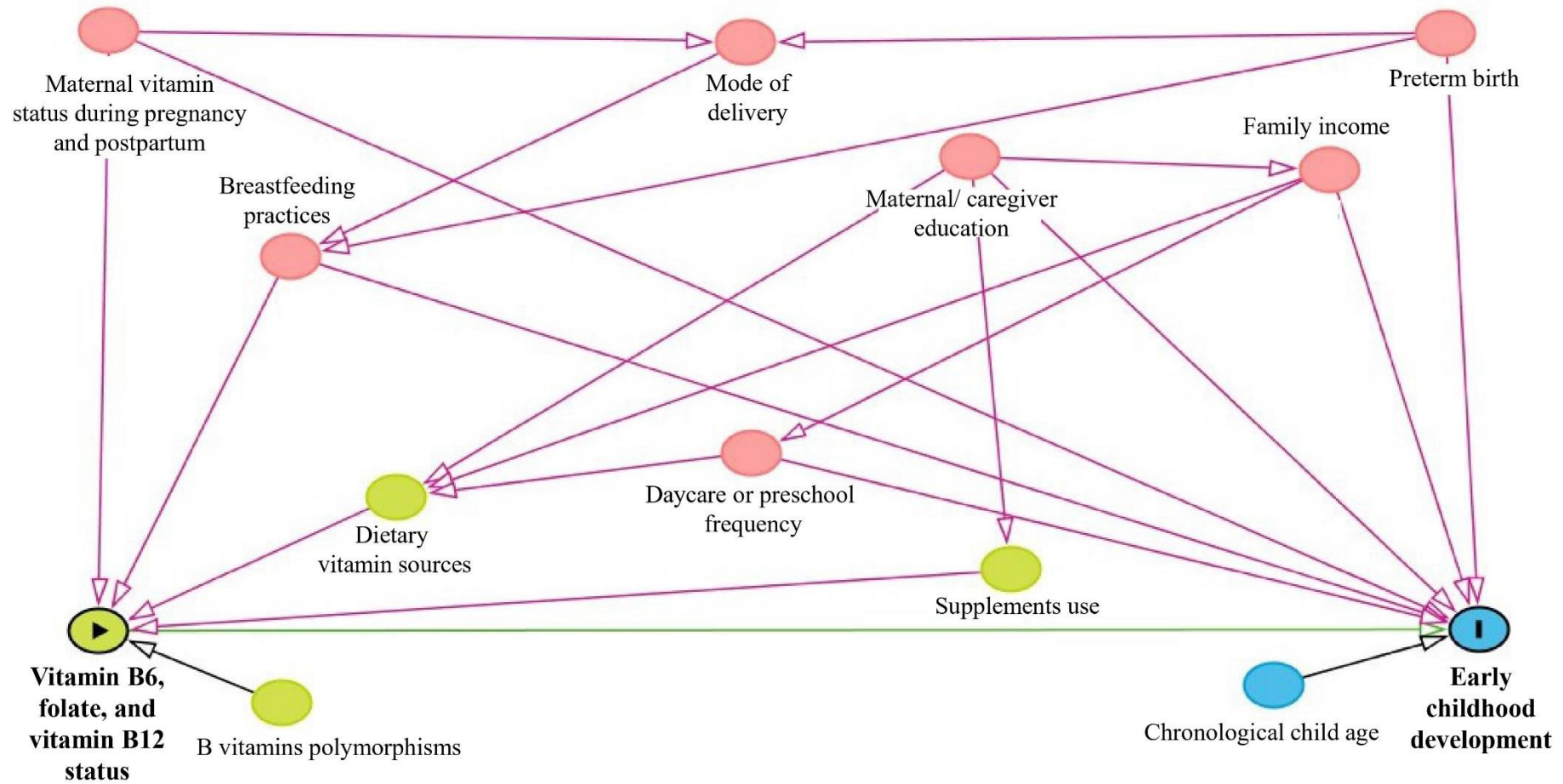


Figure 2. Directed acyclic graph of the association between B6, folate, and B12 vitamin status and early childhood development.

Notes: Breastfeeding practices refer to breastfeeding in the first hour of life, exclusive until six months and/or complemented until two years. All breastfeeding practices are associated with vitamin B status and early childhood development. Minimum adjustments suggested by the DAG: maternal vitamin status during pregnancy and postpartum, breastfeeding practices, maternal/caregiver education, and dietary vitamin sources. Green circle: ancestor of the exposure; Blue circle: ancestor of the outcome; Pink circle: ancestor of exposure and outcome.

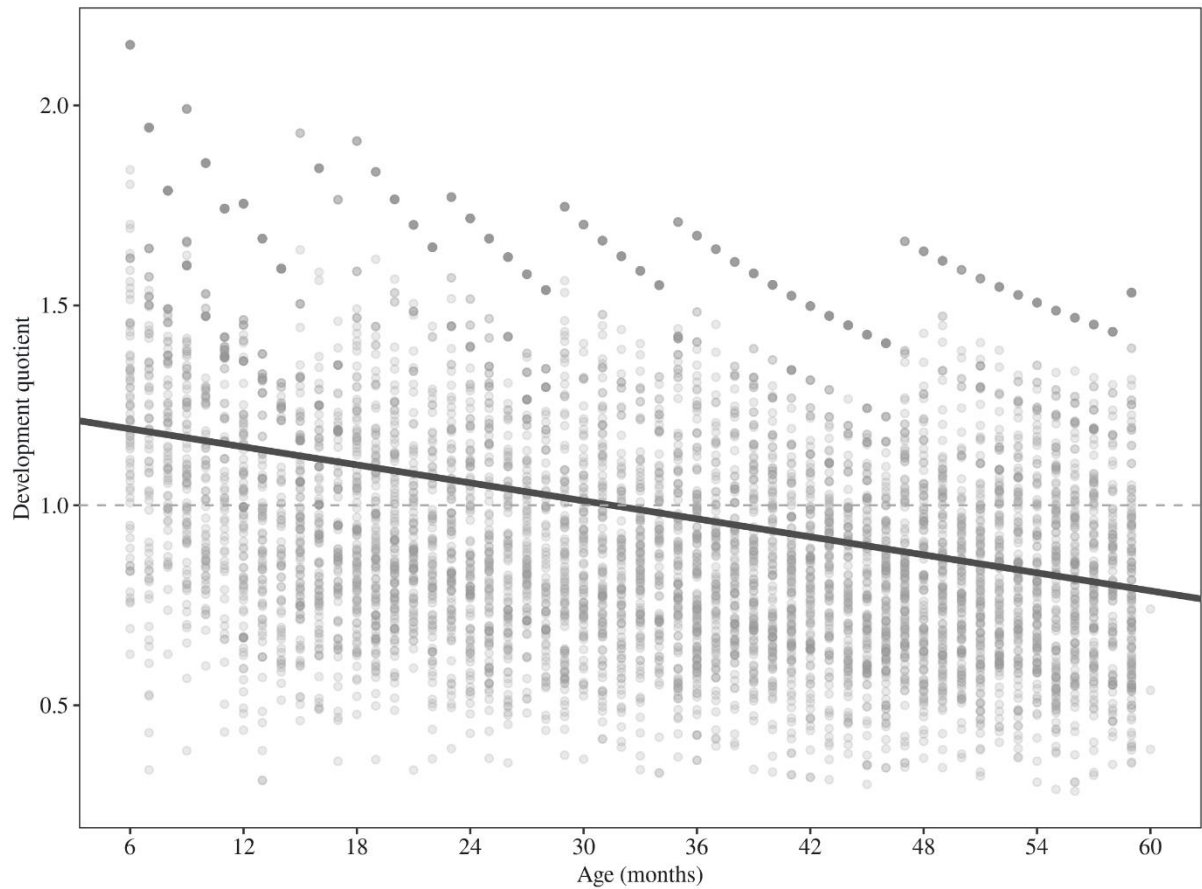


Figure 3. Simple linear regression between developmental quotient (DQ) and age (months) for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).

Notes: Dashed line indicates $DQ=1$. The developmental quotient (DQ) was calculated using the Survey of Well-being of Young Children - Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire. Developmental age was estimated considering the child's age, and developmental milestones were achieved. Development Quotient (DQ) = developmental age \div chronological age, (45). $DQ = 1$ indicates that expected age milestones have been attained; $DQ < 1$ and > 1 suggest that the attainment of specific age milestones occurred below or above expectations, respectively.

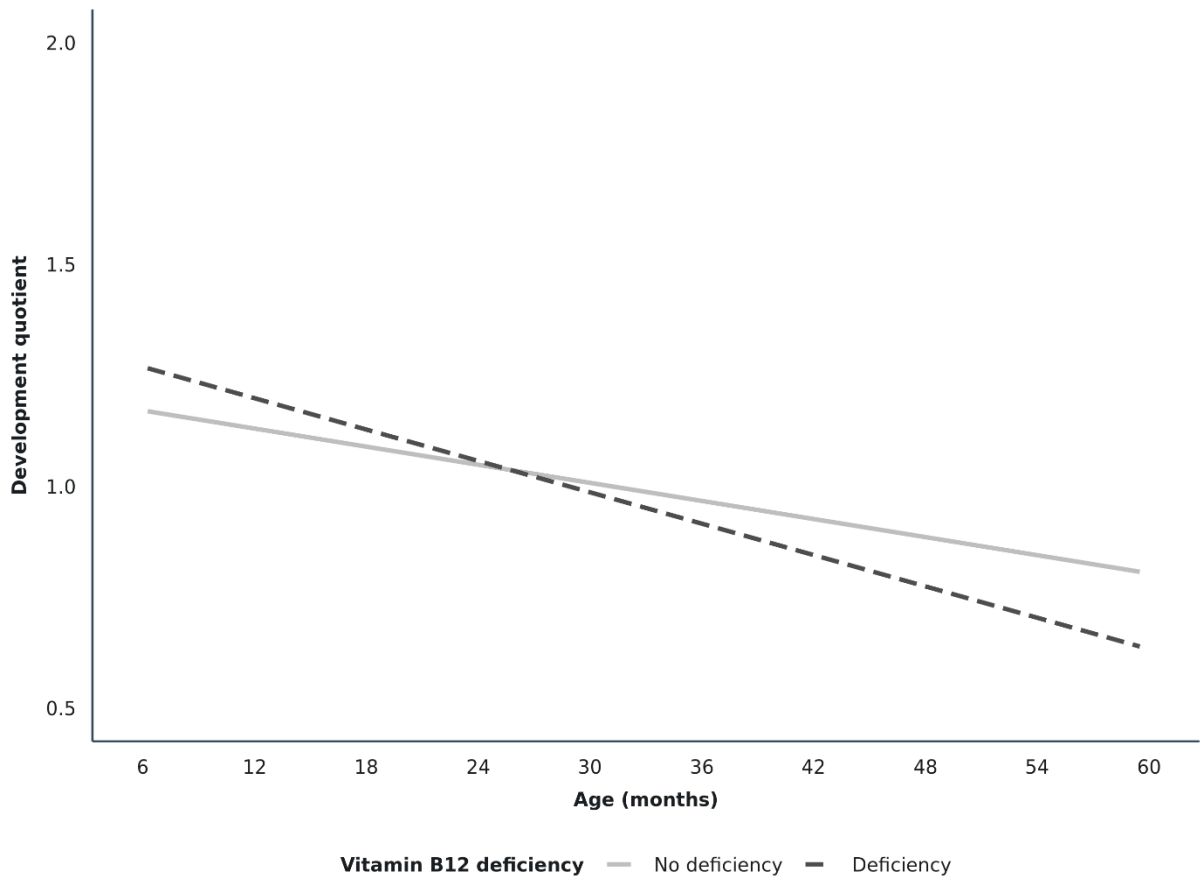


Figure 4. Association between developmental quotient (DQ) and chronological age with vitamin B12 deficiency interaction for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).

Notes: Simple linear regression with vitamin B12 deficiency interaction: β : -0.005; SE = 0.001; $p < 0.001$. The developmental quotient (DQ) was calculated using the Survey of Well-being of Young Children - Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire. Developmental age was estimated considering the child's age, and developmental milestones were achieved. Development Quotient (DQ) = developmental age \div chronological age (45). DQ = 1 indicates that expected age milestones have been attained; DQ < 1 and > 1 suggest that the attainment of specific age milestones occurred below or above expectations, respectively. Vitamin B12 deficiency was defined as < 150 pmol/L.

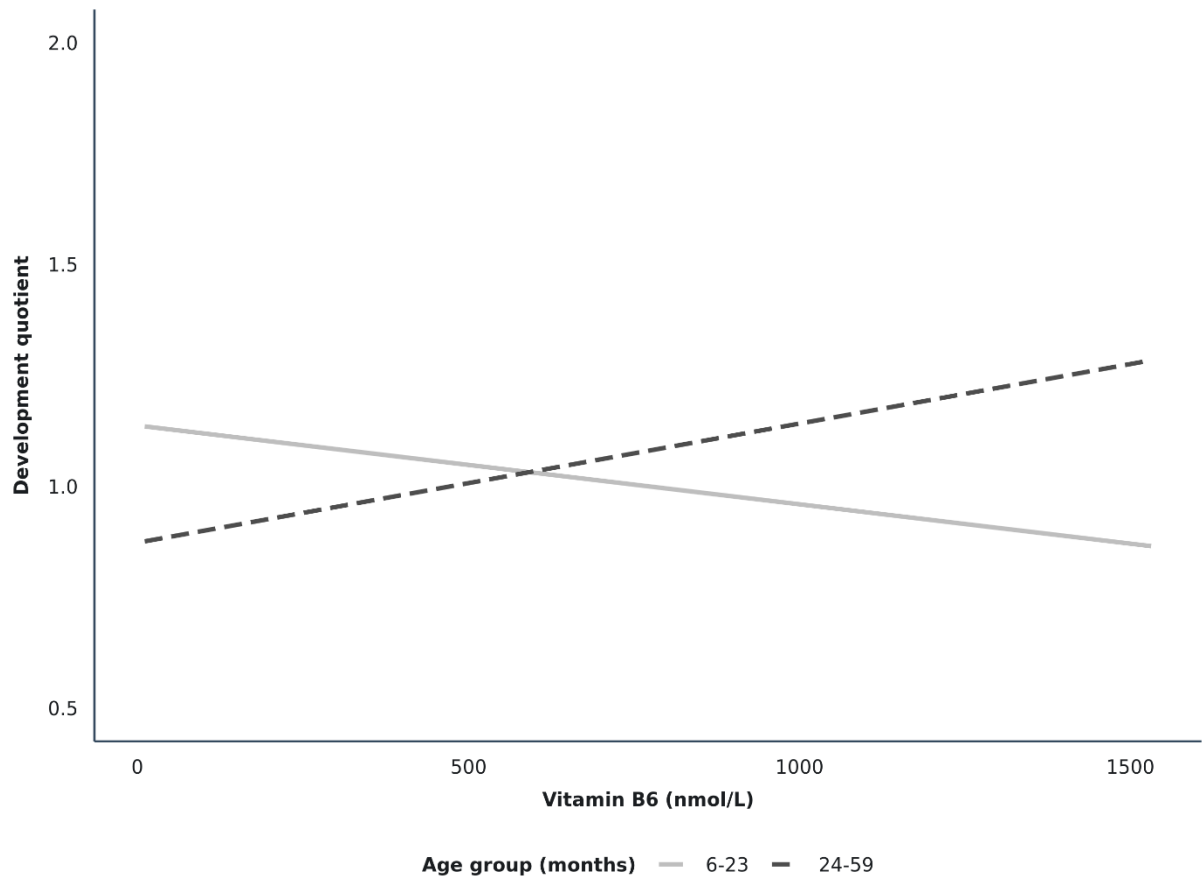


Figure 5. Association between developmental quotient (DQ) and vitamin B6 with chronological age interaction for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).

Notes: Multiple linear regression adjusted for maternal/caregiver education and age group.

Vitamin B6 (nmol/L): Age - 6-23 months (reference); Age - 24-59 months – $\beta=0.0004$;

SE=0.002; $p=0.031$. The developmental quotient (DQ) was calculated using the Survey of

Well-being of Young Children - Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire.

Developmental age was estimated considering the child's age, and developmental milestones

were achieved. Development Quotient (DQ) = developmental age \div chronological age, (45).

DQ = 1 indicates that expected age milestones have been attained; DQ < 1 and > 1 suggest

that the attainment of specific age milestones occurred below or above expectations,

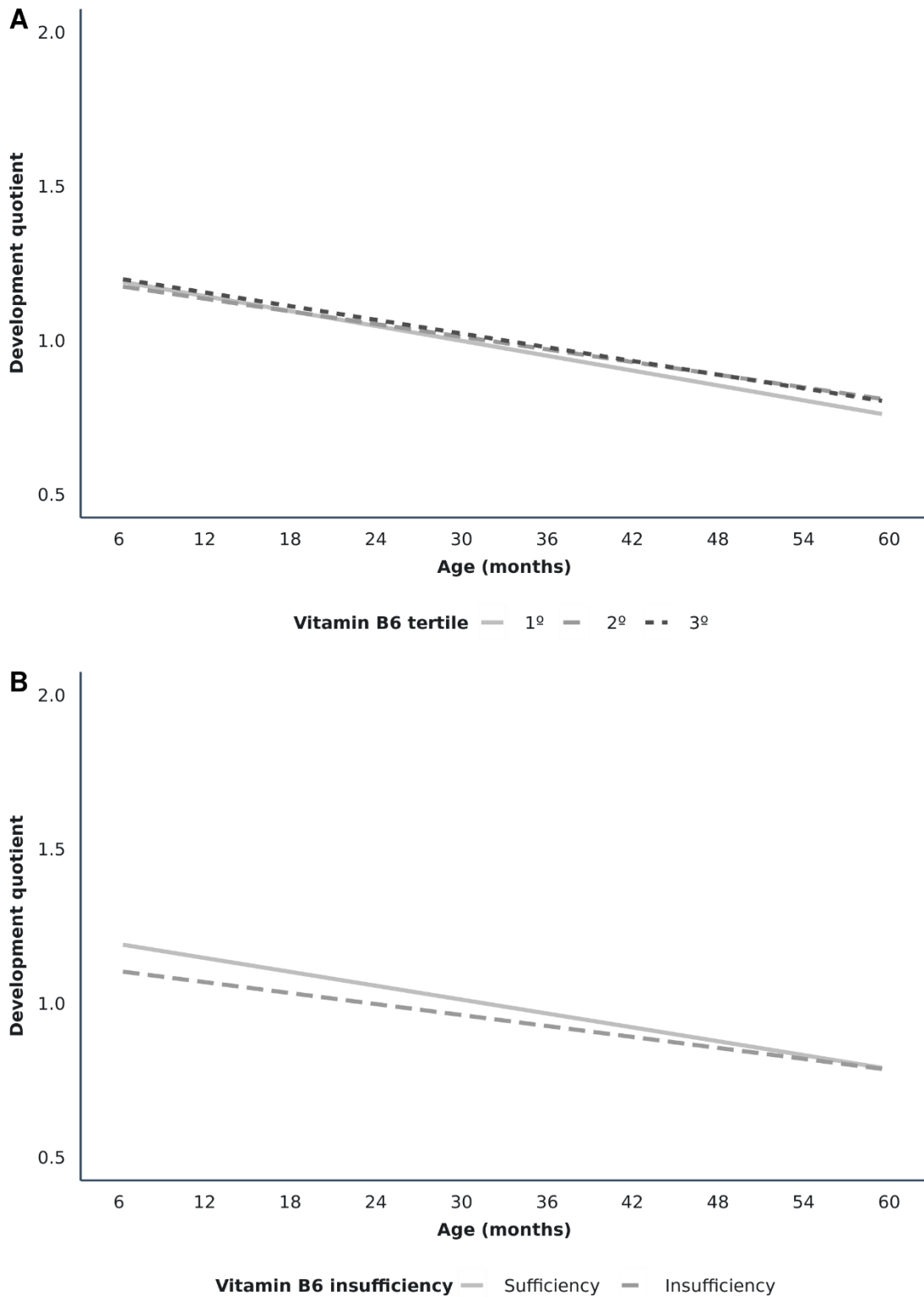
respectively.

Supplementary data

Table S1. Correlation between vitamin B6, B12 and folate dietary intake and B6, B12 and folate serum/blood concentrations according to age groups for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,516)¹.

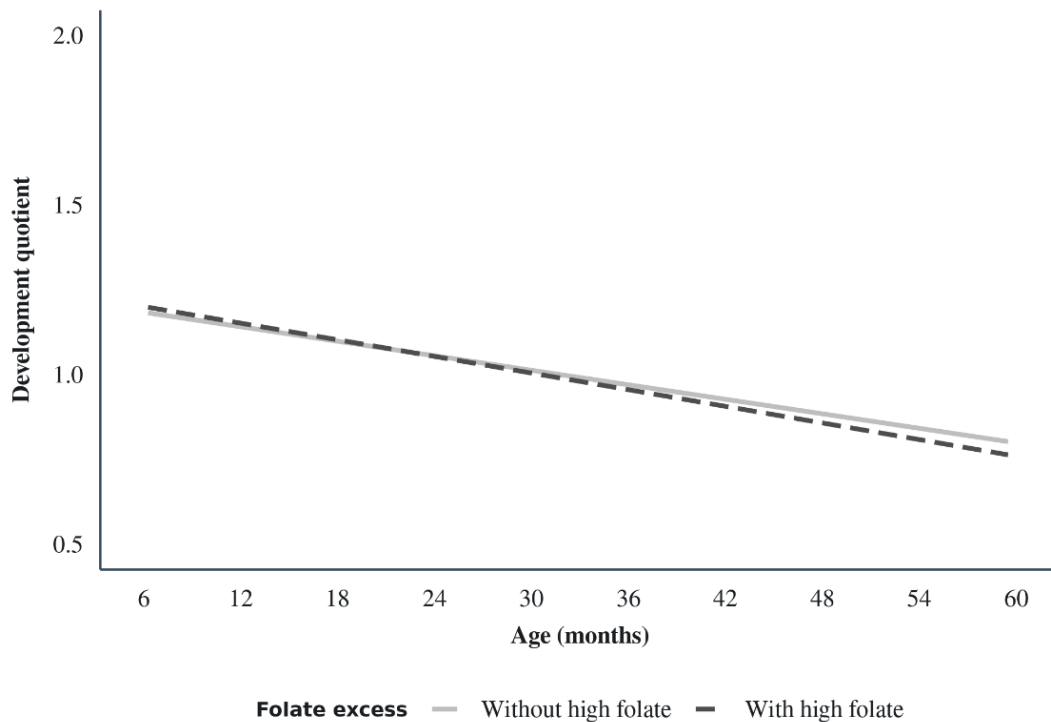
Variables	r	95% CI
Vitamin B6 blood concentrations (nmol/L)		
Vitamin B6 dietary intake (mg)	0.060	0.038-0.081
Age - 0-23 months	0.122	0.078-0.166
Age - 24-59 months	0.059	0.030-0.088
Vitamin B12 serum concentrations (pmol/L)		
Vitamin B12 dietary intake (mcg)	0.072	0.050-0.095
Age - 0-23 months	0.180	0.137-0.223
Age - 24-59 months	0.041	0.012-0.069
Folate serum concentrations (nmol/L)		
Vitamin folate dietary intake (mcg)	0.020	0.001-0.046
Age - 0-23 months	0.045	0.001-0.089
Age - 24-59 months	0.053	0.239-0.082

Notes: ¹: Four missing records for the 24-hour recall assessment; r: Pearson correlation coefficient; 95% CI: 95% confidence interval



Supplementary figure 1. Association between developmental quotient (DQ) and chronological age with vitamin B6 tertile (A) and insufficiency (B) interaction for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).

Notes: Linear regression model. Age (months): 2nd tertile $\beta = 0.001$; SE = 0.001; p = 0.437; age (months): 3rd tertile: $\beta = 0.001$; SE = 0.001; p = 0.575. Age (months): insufficiency: $\beta = 0.00157$; SE = 0.00418; p = 0.707. The developmental quotient (DQ) was calculated using the Survey of Well-being of Young Children - Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire. Developmental age was estimated considering the child's age, and developmental milestones were achieved. Development Quotient (DQ) = developmental age \div chronological age (50). DQ = 1 indicates that expected age milestones have been attained; DQ < 1 and > 1 suggest that the attainment of specific age milestones occurred below or above expectations, respectively. Vitamin B6 tertiles: 1st ≤ 93.1 ; 2nd = 93.1–144.03; 3rd ≥ 144.04 nmol/L. Vitamin B6 insufficiency was defined as <20 nmol/L.



Supplementary figure 2. Association between developmental quotient (DQ) and chronological age with high folate interaction for children 6–59 months evaluated in ENANI-2019 (n=6,520).

Note: Linear regression adjusted for dietary folic acid sources and maternal/caregiver education. With high folate: age (months): $\beta = -0.001$; SE: 0.0011; $p = 0.482$. The developmental quotient (DQ) was calculated using the Survey of Well-being of Young Children - Brazilian version (SWYC-BR) milestones questionnaire. Developmental age was estimated considering the child's age, and developmental milestones were achieved. Development Quotient (DQ) = developmental age \div chronological age (50). DQ = 1 indicates that expected age milestones have been attained; DQ < 1 and > 1 suggest that the attainment of specific age milestones occurred below or above expectations, respectively. High folate was defined > 45.3 nmol/L.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O DPI pleno é um direito humano e um dos objetivos do desenvolvimento sustentável (ODS) de 2030. Contemplam 17 objetivos que buscam lidar com os principais desafios de desenvolvimento enfrentados pela população mundial. Nesse caminho, a meta 4.2 busca a garantia a todos as meninas e meninos ao acesso a um desenvolvimento de qualidade na primeira infância, cuidados e educação pré-escolar, de modo que eles estejam prontos para o ensino primário. Ainda assim, estima-se que 250 milhões de crianças menores de cinco e pelo menos 80,8 milhões de crianças entre 36-59 meses, em países de baixa e média renda, não atingem seu potencial de desenvolvimento. No Brasil, segundo estimativas de pesquisas locais aproximadamente 20% das crianças menores de 5 anos estejam em risco para o desenvolvimento abaixo do esperado para idade. Por outro lado, estimativas da UNICEF, usando um indicador composto de atraso no crescimento ou pobreza para crianças menores de 5 anos, aponta uma melhora nesse indicador de 19 para 13% entre 2005 e 2015.

Intervenções no DPI estão relacionadas com o desenvolvimento do indivíduo ao longo da vida, mas também com o capital humano gerado, a equidade e a coesão social. Uma vez que o conjunto de conhecimentos, competências e atributos adquiridos, permitem desenvolver atividades de trabalho no futuro, de modo a produzir valor econômico e reduzir desigualdades. Dessa forma, investimentos no DPI são considerados uma das formas mais econômicas de se promover o desenvolvimento humano e reduzir as desigualdades sociais. Nesse contexto, os *Nurturing care*, termo cunhado na série do Lancet de 2017 sobre DPI e em seguida pela OMS e UNICEF em 2018, contempla cinco domínios de cuidados que interagem entre si e podem ser mutuamente reforçados por meio do processo de desenvolvimento: saúde, nutrição, segurança e proteção, cuidados responsivos e oportunidades de aprendizado. Intervenções considerando essa definição e seus domínios, são importantes ferramentas de mudança da realidade da primeira infância em países como o Brasil, considerando o contexto de desigualdades, uma vez que são capazes de atenuar os efeitos das negativos no DPI.

Os resultados dessa tese trazem conhecimento pela primeira vez com representatividade para a população Brasileira, a respeito do estado do DPI das crianças brasileiras menores de cinco anos e seus determinantes. Os dados do ENANI-2019 permitiram identificar os grupos mais vulneráveis de DPI, ou seja, crianças entre 36-59 meses e residentes na região Norte. Somado a isso, observou-se uma relação inversa entre a idade cronológica e o DPI, reforçando a vulnerabilidade das crianças com o aumento da idade.

Os resultados do artigo 1 permitiram identificar que variáveis de desigualdades sociais foram importantes preditores de DPI nessa amostra representativa de crianças menores de cinco anos. Considerando o *framework* proposto na série do periódico do Lancet, foram avaliadas variáveis de quatro dos cinco domínios dos *nurturing care* e do ambiente e de contexto. O acesso adequado a serviços de saúde, a não participação em programas de transferência de renda, a frequência em creches/escolas privadas, a elevada escolaridade materna/do cuidador e a renda familiar foram preditores de melhores status de DPI. Variáveis de saúde e nutrição, como o peso ao nascer/idade gestacional, a via de parto e o consumo de alimentos ultraprocessados também estiveram associadas ao DPI.

Em consonância com os achados do primeiro artigo, no artigo 2 observou-se a relação direta entre o estado nutricional, um dos domínios dos *nurturing care*, com o DPI. O estado nutricional de vitamina B6 e B12 foram associados ao DPI. Foi observada uma interação entre a idade da criança e a deficiência de vitamina B12, indicando que entre crianças com deficiência de B12, o DPI diminuiu mais acentuadamente com o aumento da idade cronológica em comparação com aquelas sem deficiência de vitamina B12. Já as concentrações de vitamina B6 estiveram diretamente associadas ao DPI para crianças de 24–59 meses e não para as de 6–23 meses.

Os resultados aqui apresentados contribuirão para o conhecimento científico e para a formulação e gerenciamento de políticas públicas no Brasil. Iniciativas de políticas e programas voltados para o DPI ainda são escassas e recentes no Brasil. O Marco legal da primeira infância é uma dessas iniciativas e busca atingir os objetivos do desenvolvimento sustentável, estabelecidos em 2015 além de garantir princípios e diretrizes para a formulação de políticas públicas destinadas a crianças de 0–6 anos. Alinhado a isso, o programa Criança Feliz, criado em 2016, busca por meio de visitas domiciliares a famílias em vulnerabilidade social, identificar necessidades e orientar os cuidadores para ações e serviços que visem a garantia do pleno DPI. Antes disso, iniciativas isoladas voltadas para o desenvolvimento infantil eram realizadas em alguns municípios e/ ou estados.

As creches comunitárias, sociais, do governo são importantes locais de implementação de programas na primeira infância, especialmente, quanto a políticas de suplementação nutricional, garantia da segurança alimentar e oportunidades de estímulo e aprendizado precoce para as crianças atendidas. Entretanto, no Brasil a frequência em creches e pré-escolas é restrita ao número de vagas disponibilizada pelo poder público, ainda insuficiente. Além disso, a matrícula/ frequência era facultativa para crianças menores de seis anos até 2013, quando passou a se constituir obrigatório a matrícula de crianças a partir dos 4 anos de idade em pré-

escolas. Essa lei/diretriz tornou-se um novo campo para a implementação de políticas públicas voltadas não só para a nutrição adequada, mas para a plenitude do DPI.

Por fim, reforça-se a necessidade de políticas públicas que busquem garantir o DPI, especialmente os *nurturing care* e minimizar as desigualdades sociais. Ademais, nossos resultados reforçam a necessidade de integração de políticas públicas sobre nutrição e DPI, conforme sugerido pela OMS. De forma inédita, as evidências apresentadas nessa tese poderão apoiar o planejamento de novos estudos sobre o tema e de políticas públicas no Brasil e em outros países com o mesmo contexto de desigualdade e/ou estágio de transição nutricional.

7 REFERÊNCIAS

- AKIYAMA, T.; HYODO, Y.; HASEGAWA, K.; OBOSHI, T. *et al.* Pyridoxal in the Cerebrospinal Fluid May Be a Better Indicator of Vitamin B6-dependent Epilepsy Than Pyridoxal 5'-Phosphate. **Pediatr Neurol**, 113, p. 33-41, Dec 2020.
- ALBERSEN, M.; BOSMA, M.; JANS, J. J.; HOFSTEDDE, F. C. *et al.* Vitamin B6 in plasma and cerebrospinal fluid of children. **PLoS One**, 10, n. 3, p. e0120972, 2015.
- ALLEN, L. Vitamin B12. . *In: Encyclopedia of Dietary Supplements*. London and New York: Informa Healthcare, 2010. p. 812-820.
- ALLEN, L. H.; MILLER, J. W.; DE GROOT, L.; ROSENBERG, I. H. *et al.* Biomarkers of Nutrition for Development (BOND): Vitamin B-12 Review. **J Nutr**, 148, n. suppl_4, p. 1995s-2027s, Dec 1 2018.
- ALVES-SANTOS, N. H.; CASTRO, I. R. R.; ANJOS, L. A. D.; LACERDA, E. M. A. *et al.* General methodological aspects in the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. **Cad Saude Publica**, 37, n. 8, p. e00300020, 2021.
- ALVES, C. R. L. **Survey of Well-being of Young Children (SWYC-BR) [recurso eletrônico] : manual de aplicação e interpretação**. Araranguá : UFSC.: 2021.
- ANKAR, A.; KUMAR, A. **Vitamin B12 Deficiency**. [Updated 2022 Jun 5]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441923/>, 2022 Acesso em: July, 2022.
- AZAD, C.; JAT, K. R.; KAUR, J.; GUGLANI, V. *et al.* Vitamin B(12) status and neurodevelopmental delay in Indian infants: a hospital-based cross-sectional study. **Paediatr Int Child Health**, 40, n. 2, p. 78-84, May 2020.
- BAILEY, L. B. New standard for dietary folate intake in pregnant women. **Am J Clin Nutr**, 71, n. 5 Suppl, p. 1304s-1307s, May 2000.
- BAILEY, L. B.; STOVER, P. J.; MCNULTY, H.; FENECH, M. F. *et al.* Biomarkers of Nutrition for Development-Folate Review. **J Nutr**, 145, n. 7, p. 1636s-1680s, Jul 2015.
- BAILEY, R. L.; JUN, S.; MURPHY, L.; GREEN, R. *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**, 112, n. 6, p. 1547-1557, Dec 10 2020.
- BARROS, A. J.; EWERLING, F. Early childhood development: a new challenge for the SDG era. **Lancet Glob Health**, 4, n. 12, p. e873-e874, Dec 2016.
- BENNETT, M. Vitamin B12 deficiency, infertility and recurrent fetal loss. **J Reprod Med**, 46, n. 3, p. 209-212, Mar 2001.
- BENTON, D. The influence of dietary status on the cognitive performance of children. **Mol Nutr Food Res**, 54, n. 4, p. 457-470, Apr 2010.

BERTOLO, R. F.; MCBREAIRTY, L. E. The nutritional burden of methylation reactions. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 16, n. 1, p. 102-108, Jan 2013.

BHUTTA, Z. A.; DAS, J. K.; BAHL, R.; LAWN, J. E. *et al.* Can available interventions end preventable deaths in mothers, newborn babies, and stillbirths, and at what cost? **Lancet**, 384, n. 9940, p. 347-370, Jul 26 2014.

BLACK, M. M.; ABOUD, F. E. Responsive feeding is embedded in a theoretical framework of responsive parenting. **J Nutr**, 141, n. 3, p. 490-494, Mar 2011.

BLACK, M. M.; WALKER, S. P.; FERNALD, L. C. H.; ANDERSEN, C. T. *et al.* Early childhood development coming of age: science through the life course. **Lancet (London, England)**, 389, n. 10064, p. 77-90, 2017.

BONDEVIK, G. T.; SCHNEEDE, J.; REFSUM, H.; LIE, R. T. *et al.* Homocysteine and methylmalonic acid levels in pregnant Nepali women. Should cobalamin supplementation be considered? **Eur J Clin Nutr**, 55, n. 10, p. 856-864, Oct 2001.

BOO, F. L.; MATEUS, M. C.; DURYEYEA, S. Analysis of socioeconomic gradients in the development of children aged 0-3 years in Fortaleza, Northeastern Brazil. **Rev Saude Publica**, 52, p. 84, Oct 11 2018.

BORNSTEIN, M. H.; ROTHENBERG, W. A.; LANSFORD, J. E.; BRADLEY, R. H. *et al.* Child Development in Low- and Middle-Income Countries. **Pediatrics**, 148, n. 5, Nov 2021.

BORSCHERL, M. Vitamin B-6 in infancy: Requirements and current feeding practices. *In: DL., e. (Ed.). Vitamin B-6 metabolism in pregnancy, lactation and infancy.* Boca Raton, London: Tokyo: CRC Press, 1995. p. p. 109-124.

BOYLAN, L. M.; HART, S.; PORTER, K. B.; DRISKELL, J. A. Vitamin B-6 content of breast milk and neonatal behavioral functioning. **J Am Diet Assoc**, 102, n. 10, p. 1433-1438, Oct 2002.

BRADLEY, R. H.; PUTNICK, D. L. Housing quality and access to material and learning resources within the home environment in developing countries. **Child Dev**, 83, n. 1, p. 76-91, Jan-Feb 2012.

BRASIL. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN. . SAUDE, M. d. Brasília, DF: : Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de atenção Básica, MS: 72 p. 2011.

BRASIL. Guia alimentar para a população brasileira. . Brasília: Ministério da Saúde 2014.

BRASIL. LEI Nº 13.257. PODER LEGISLATIVO. 2016a.

BRASIL. Orientações para avaliação de marcadores de consumo alimentar na atenção básica. Brasília: Ministério da Saúde 2016b.

BRION, L. P.; BELL, E. F.; RAGHUVVEER, T. S. Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, p. Cd003665, 2003.

BRITTO, P. R.; LYE, S. J.; PROULX, K.; YOUSAFZAI, A. K. *et al.* Nurturing care: promoting early childhood development. **Lancet**, 389, n. 10064, p. 91-102, Jan 7 2017.

BURDGE, G. C.; LILLYCROP, K. A. Folic acid supplementation in pregnancy: Are there devils in the detail? **Br J Nutr**, 108, n. 11, p. 1924-1930, Dec 14 2012.

CAFFREY, A.; MCNULTY, H.; ROLLINS, M.; PRASAD, G. *et al.* Effects of maternal folic acid supplementation during the second and third trimesters of pregnancy on neurocognitive development in the child: an 11-year follow-up from a randomised controlled trial. **BMC Medicine**, 19, n. 1, p. 73, 2021/03/10 2021.

CAMARGO-FIGUERA, F. A.; BARROS, A. J.; SANTOS, I. S.; MATIJASEVICH, A. *et al.* Early life determinants of low IQ at age 6 in children from the 2004 Pelotas Birth Cohort: a predictive approach. **BMC Pediatr**, 14, p. 308, Dec 16 2014.

CASTRO, I. R. R.; NORMANDO, P.; ALVES-SANTOS, N. H.; BEZERRA, F. F. *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**, 3737, n. 8, p. e00301120, 2021.

CHATZI, L.; PAPADOPOULOU, E.; KOUTRA, K.; ROUMELIOTAKI, T. *et al.* Effect of high doses of folic acid supplementation in early pregnancy on child neurodevelopment at 18 months of age: the mother-child cohort 'Rhea' study in Crete, Greece. **Public Health Nutrition**, 15, n. 9, p. 1728-1736, 2012.

COMPañ GABUCIO, L. M.; GARCÍA DE LA HERA, M.; TORRES COLLADO, L.; FERNÁNDEZ-SOMOANO, A. *et al.* The Use of Lower or Higher Than Recommended Doses of Folic Acid Supplements during Pregnancy Is Associated with Child Attentional Dysfunction at 4-5 Years of Age in the INMA Project. **Nutrients**, 13, n. 2, Jan 23 2021.

CORREIA, L. L.; ROCHA, H. A. L.; SUDFELD, C. R.; ROCHA, S. *et al.* Prevalence and socioeconomic determinants of development delay among children in Ceará, Brazil: A population-based study. **PLoS One**, 14, n. 11, p. e0215343, 2019.

CRISPIM, S. P.; KAC, G.; LACERDA, E. M. d. A.; CASTRO, I. R. R. d. Manual fotográfico de quantificação alimentar infantil. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2018.

D'SOUZA, N.; BEHERE, R. V.; PATNI, B.; DESHPANDE, M. *et al.* Pre-conceptional Maternal Vitamin B12 Supplementation Improves Offspring Neurodevelopment at 2 Years of Age: PRIYA Trial. **Front Pediatr**, 9, p. 755977, 2021.

DAMAYANTI, D.; JACELDO-SIEGL, K.; BEESON, W. L.; FRASER, G. *et al.* Foods and Supplements Associated with Vitamin B(12) Biomarkers among Vegetarian and Non-Vegetarian Participants of the Adventist Health Study-2 (AHS-2) Calibration Study. **Nutrients**, 10, n. 6, Jun 4 2018.

DE ALBUQUERQUE, M. P.; IBELLI, P. M. E.; SAWAYA, A. L. Child malnutrition in Brazil: the wound that never healed. **Jornal de Pediatria**, 2023/11/08/ 2023.

DE BENOIST, B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. **Food Nutr Bull**, 29, n. 2 Suppl, p. S238-244, Jun 2008.

DE SOUZA MORAIS, R. L.; DE CASTRO MAGALHÃES, L.; NOBRE, J. N. P.; PINTO, P. F. A. *et al.* Quality of the home, daycare and neighborhood environment and the cognitive development of economically disadvantaged children in early childhood: A mediation analysis. **Infant Behav Dev**, 64, p. 101619, Aug 2021.

DELGADO, D. A.; MICHELON, R. C.; GERZSON, L. R.; ALMEIDA, C. S. d. *et al.* Avaliação do desenvolvimento motor infantil e sua associação com a vulnerabilidade social. **Fisioter. Pesqui. (Online)**, 27, n. 1, p. 48-56, 2020/01 2020.

DI SALVO, M. L.; SAFO, M. K.; CONTESTABILE, R. Biomedical aspects of pyridoxal 5'-phosphate availability. **Front Biosci (Elite Ed)**, 4, n. 3, p. 897-913, Jan 1 2012.

DUCKER, G. S.; RABINOWITZ, J. D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. **Cell Metab**, 25, n. 1, p. 27-42, Jan 10 2017.

DUNCAN, G. J.; MORRIS, P. A.; RODRIGUES, C. Does money really matter? Estimating impacts of family income on young children's achievement with data from random-assignment experiments. **Dev Psychol**, 47, n. 5, p. 1263-1279, Sep 2011.

ELLIS, G. F.; SCHNEIDER, B. *srvyr*: 'dplyr'-Like Syntax for Summary Statistics of Survey Data. R package version 1.1.1. 2022.

EVANS, G. W.; KIM, P. Childhood poverty, chronic stress, self-regulation, and coping. **Child Development Perspectives**, 7, n. 1, p. 43-48, 2013.

FAN, J.; YE, J.; KAMPHORST, J. J.; SHLOMI, T. *et al.* Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. **Nature**, 510, n. 7504, p. 298-302, Jun 12 2014.

FARRELL, C. J.; KIRSCH, S. H.; HERRMANN, M. Red cell or serum folate: what to do in clinical practice? **Clin Chem Lab Med**, 51, n. 3, p. 555-569, Mar 1 2013.

FEIN, S. B.; LABINER-WOLFE, J.; SCANLON, K. S.; GRUMMER-STRAWN, L. M. Selected complementary feeding practices and their association with maternal education. **Pediatrics**, 122 Suppl 2, p. S91-97, Oct 2008.

FOX, J. T.; STOVER, P. J. Folate-mediated one-carbon metabolism. **Vitam Horm**, 79, p. 1-44, 2008.

FRIEDMAN, J.; STURDY, J. The Influence of Economic Crisis on Early Childhood Development: A Review of Pathways and Measured Impact. *In*: **No Small Matter**, p. 51-83.

GEORGE, L.; MILLS, J. L.; JOHANSSON, A. L.; NORDMARK, A. *et al.* Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. **Jama**, 288, n. 15, p. 1867-1873, Oct 16 2002.

GEORGIEFF, M. K. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. **Am J Clin Nutr**, 85, n. 2, p. 614s-620s, Feb 2007.

GUIMARÃES, M. A. P. VALIDADE DO QUESTIONÁRIO MARCOS DO DESENVOLVIMENTO DO SURVEY OF WELL-BEING OF YOUNG CHILDREN (SWYC-BRASIL) E NORMAS PARA INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS EM CRIANÇAS BRASILEIRAS. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**, 2020.

HAIR, N. L.; HANSON, J. L.; WOLFE, B. L.; POLLAK, S. D. Association of Child Poverty, Brain Development, and Academic Achievement. **JAMA Pediatr**, 169, n. 9, p. 822-829, Sep 2015.

HANSEN, C. M.; SHULTZ, T. D.; KWAK, H. K.; MEMON, H. S. *et al.* Assessment of vitamin B-6 status in young women consuming a controlled diet containing four levels of vitamin B-6 provides an estimated average requirement and recommended dietary allowance. **J Nutr**, 131, n. 6, p. 1777-1786, Jun 2001.

HANSON, J. L.; NACEWICZ, B. M.; SUTTERER, M. J.; CAYO, A. A. *et al.* Behavioral problems after early life stress: contributions of the hippocampus and amygdala. **Biol Psychiatry**, 77, n. 4, p. 314-323, Feb 15 2015.

HOLICK, M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. **Rev Endocr Metab Disord**, 18, n. 2, p. 153-165, Jun 2017.

INFOODS. **International Network of Food Data Systems (INFOODS)**. Disponível em: <https://www.fao.org/infoods/infoods/en/>. Acesso em: March 13th

INSTITUTE OF MEDICINE, I. **Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline.** Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114310/> doi: 10.17226/6015, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: tabela de medidas referidas para os alimentos consumidos no Brasil. (IBGE), I. B. d. G. e. E. Rio de Janeiro 2011.

JAESCHKE, R.; GUYATT, G. H.; DELLINGER, P.; SCHÜNEMANN, H. *et al.* Use of GRADE grid to reach decisions on clinical practice guidelines when consensus is elusive. **BMJ**, 337, p. a744, 2008.

JOHNSON, S. B.; RIIS, J. L.; NOBLE, K. G. State of the Art Review: Poverty and the Developing Brain. **Pediatrics**, 137, n. 4, Apr 2016.

JULVEZ, J.; FORTUNY, J.; MENDEZ, M.; TORRENT, M. *et al.* Maternal use of folic acid supplements during pregnancy and four-year-old neurodevelopment in a population-based birth cohort. **Paediatr Perinat Epidemiol**, 23, n. 3, p. 199-206, May 2009.

KING, J. C.; BROWN, K. H.; GIBSON, R. S.; KREBS, N. F. *et al.* Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-Zinc Review. **J Nutr**, 146, n. 4, p. 858s-885s, Apr 1 2015.

KIRKE, P. N.; MOLLOY, A. M.; DALY, L. E.; BURKE, H. *et al.* Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. **Q J Med**, 86, n. 11, p. 703-708, Nov 1993.

KRISHNASWAMY, K.; MADHAVAN NAIR, K. Importance of folate in human nutrition. **Br J Nutr**, 85 Suppl 2, p. S115-124, May 2001.

KVESTAD, I.; HYSING, M.; SHRESTHA, M.; ULAK, M. *et al.* Vitamin B-12 status in infancy is positively associated with development and cognitive functioning 5 y later in Nepalese children. **Am J Clin Nutr**, 105, n. 5, p. 1122-1131, May 2017.

KVESTAD, I.; MCCANN, A.; CHANDYO, R. K.; GILL, L. M. *et al.* One-Carbon Metabolism in Nepalese Infant-Mother Pairs and Child Cognition at 5 Years Old. **J Nutr**, 151, n. 4, p. 883-891, Apr 8 2021.

KVESTAD, I.; TANEJA, S.; KUMAR, T.; HYSING, M. *et al.* Vitamin B12 and Folic Acid Improve Gross Motor and Problem-Solving Skills in Young North Indian Children: A Randomized Placebo-Controlled Trial. **PLoS One**, 10, n. 6, p. e0129915, 2015.

LACERDA, E. M. A.; BOCCOLINI, C. S.; ALVES-SANTOS, N. H.; CASTRO, I. R. R. *et al.* Methodological aspects of the assessment of dietary intake in the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. **Cad Saude Publica**, 37, n. 8, p. e00301420, 2021.

LAI, J. S.; MOHAMAD AYOB, M. N.; CAI, S.; QUAH, P. L. *et al.* Maternal plasma vitamin B12 concentrations during pregnancy and infant cognitive outcomes at 2 years of age. **Br J Nutr**, 121, n. 11, p. 1303-1312, Jun 2019.

LAMERS, Y. Folate recommendations for pregnancy, lactation, and infancy. **Ann Nutr Metab**, 59, n. 1, p. 32-37, 2011a.

LAMERS, Y. Indicators and methods for folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status assessment in humans. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 14, n. 5, p. 445-454, Sep 2011b.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LIN, Y. C.; CHUNG, C. J.; HUANG, Y. L.; HSIEH, R. L. *et al.* Association of plasma folate, vitamin B12 levels, and arsenic methylation capacity with developmental delay in preschool children in Taiwan. **Arch Toxicol**, 93, n. 9, p. 2535-2544, Sep 2019.

LOB, K.; BASSELL-HAWKINS, J.; PATIL, R.; NIE, D. *et al.* Vitamin B6 decreases the risk of levetiracetam discontinuation in children with epilepsy: A retrospective study. **Epilepsy Behav**, 134, p. 108839, Sep 2022.

LOCKYER, F.; MCCANN, S.; MOORE, S. E. Breast Milk Micronutrients and Infant Neurodevelopmental Outcomes: A Systematic Review. **Nutrients**, 13, n. 11, Oct 28 2021.

LÖVBLAD, K.; RAMELLI, G.; REMONDA, L.; NIRKKO, A. C. *et al.* Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. **Pediatr Radiol**, 27, n. 2, p. 155-158, Feb 1997.

LU, C.; BLACK, M. M.; RICHTER, L. M. Risk of poor development in young children in low-income and middle-income countries: an estimation and analysis at the global, regional, and country level. **Lancet Glob Health**, 4, n. 12, p. e916-e922, Dec 2016.

LU, C.; CUARTAS, J.; FINK, G.; MCCOY, D. *et al.* Inequalities in early childhood care and development in low/middle-income countries: 2010–2018. **BMJ Global Health**, 5, n. 2, p. e002314, 2020.

LUMLEY, T. "survey: analysis of complex survey samples". R package version 4.0. 2020.

LYNCH, S.; PFEIFFER, C. M.; GEORGIEFF, M. K.; BRITTENHAM, G. *et al.* Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-Iron Review. **J Nutr**, 148, n. suppl_1, p. 1001s-1067s, Jun 1 2018.

MCCOY, D. C.; PEET, E. D.; EZZATI, M.; DANAEI, G. *et al.* Early Childhood Developmental Status in Low- and Middle-Income Countries: National, Regional, and Global Prevalence Estimates Using Predictive Modeling. **PLoS Med**, 13, n. 6, p. e1002034, Jun 2016.

MCCOY, D. C.; RAVER, C. C. Household instability and self-regulation among poor children. **J Child Poverty**, 20, n. 2, p. 131-152, 2014.

MCNULTY, H.; ROLLINS, M.; CASSIDY, T.; CAFFREY, A. *et al.* Effect of continued folic acid supplementation beyond the first trimester of pregnancy on cognitive performance in the child: a follow-up study from a randomized controlled trial (FASSTT Offspring Trial). **BMC Med**, 17, n. 1, p. 196, Oct 31 2019.

MCNULTY, H.; WARD, M.; HOEY, L.; HUGHES, C. F. *et al.* Addressing optimal folate and related B-vitamin status through the lifecycle: health impacts and challenges. **Proceedings of the Nutrition Society**, 78, n. 3, p. 449-462, 2019.

METWALLY, A. M.; SALAH EL- DIN, E. M.; SHEHATA, M. A.; SHAALAN, A. *et al.* Early Life Predictors of Socio-Emotional Development in a Sample of Egyptian Infants. **PLOS ONE**, 11, n. 7, p. e0158086, 2016.

MOREIRA, R. S. TRIAGEM DE ATRASO DE DESENVOLVIMENTO E DE ALTERAÇÕES DE COMPORTAMENTO: ESTUDO NORMATIVO DO “SURVEY OF WELLBEING OF YOUNG CHILDREN (SWYC)” NO CONTEXTO BRASILEIRO. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**, 2016.

MOREIRA, R. S.; MAGALHÃES, L. d. C.; SIQUEIRA, C. M.; ALVES, C. R. L. Cross-cultural adaptation of the child development surveillance instrument "Survey of Wellbeing of Young Children (SWYC)" in the Brazilian context. **Journal of Human Growth and Development**, 29, p. 28-38, 2019.

MOSHFEGH, A. J.; RHODES, D. G.; BAER, D. J.; MURAYI, T. *et al.* The US Department of Agriculture Automated Multiple-Pass Method reduces bias in the collection of energy intakes. **Am J Clin Nutr**, 88, n. 2, p. 324-332, Aug 2008.

MUENNIG, P.; SCHWEINHART, L.; MONTIE, J.; NEIDELL, M. Effects of a prekindergarten educational intervention on adult health: 37-year follow-up results of a randomized controlled trial. **Am J Public Health**, 99, n. 8, p. 1431-1437, Aug 2009.

MULKEY, S. B.; BEARER, C. F.; MOLLOY, E. J. Indirect effects of the COVID-19 pandemic on children relate to the child's age and experience. **Pediatr Res**, 94, n. 5, p. 1586-1587, Nov 2023.

MUTHÉN, L. K. a. M., B.O. . **Mplus User's Guide**. . Los Angeles, CA.: (1998-2015).

NEVES, P. A. R.; GATICA-DOMÍNGUEZ, G.; SANTOS, I. S.; BERTOLDI, A. D. *et al.* Poor maternal nutritional status before and during pregnancy is associated with suspected child developmental delay in 2-year old Brazilian children. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 1851, Feb 5 2020.

NEVILLE, H. J.; STEVENS, C.; PAKULAK, E.; BELL, T. A. *et al.* Family-based training program improves brain function, cognition, and behavior in lower socioeconomic status preschoolers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110, n. 29, p. 12138-12143, 2013.

NOBLE, K. G.; ENGELHARDT, L. E.; BRITO, N. H.; MACK, L. J. *et al.* Socioeconomic disparities in neurocognitive development in the first two years of life. **Dev Psychobiol**, 57, n. 5, p. 535-551, Jul 2015.

PAREY, M.; CARNEIRO, P.; MEGHIR, C. Maternal Education, Home Environments, and the Development of Children and Adolescents. **Journal of the European Economic Association**, 11, p. 123–160, 01/01 2013.

PAUL, C.; BRADY, D. M. Comparative Bioavailability and Utilization of Particular Forms of B(12) Supplements With Potential to Mitigate B(12)-related Genetic Polymorphisms. **Integr Med (Encinitas)**, 16, n. 1, p. 42-49, Feb 2017.

PAVLAKIS, A. E.; NOBLE, K.; PAVLAKIS, S. G.; ALI, N. *et al.* Brain imaging and electrophysiology biomarkers: is there a role in poverty and education outcome research? **Pediatr Neurol**, 52, n. 4, p. 383-388, Apr 2015.

PERCUDANI, R.; PERACCHI, A. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. **BMC Bioinformatics**, 10, n. 1, p. 273, 2009/09/01 2009.

PINHEIRO, A.; LACERDA, E.; BENZECRY, E.; GOMES, M. *et al.* **Tabela de avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008. v. 5th Ed.).

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing 2020.

RAJMIL, L.; FERNANDEZ DE SANMAMED, M. J.; CHOONARA, I.; FARESJÖ, T. *et al.* Impact of the 2008 economic and financial crisis on child health: a systematic review. **Int J Environ Res Public Health**, 11, n. 6, p. 6528-6546, Jun 2014.

RAY, J. G.; BLOM, H. J. Vitamin B12 insufficiency and the risk of fetal neural tube defects. **Qjm**, 96, n. 4, p. 289-295, Apr 2003.

REYNOLDS, E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. **Lancet Neurol**, 5, n. 11, p. 949-960, Nov 2006.

ROCHA, P. R. H.; SARAIVA, M.; BARBIERI, M. A.; FERRARO, A. A. *et al.* Association of preterm birth and intrauterine growth restriction with childhood motor development: Brisa cohort, Brazil. **Infant Behav Dev**, 58, p. 101429, Feb 2020.

ROSE, C. S.; GYÖRGY, P.; BUTLER, M.; ANDRES, R. *et al.* Age differences in vitamin B6 status of 617 men. **Am J Clin Nutr**, 29, n. 8, p. 847-853, Aug 1976.

ROSÉN, B. A user's guide to Pareto π ps sampling. **Stockholm: Statistiska Centralbyrån**, 2000.

ROSENZWEIG, A.; BLENIS, J.; GOMES, A. P. Beyond the Warburg Effect: How Do Cancer Cells Regulate One-Carbon Metabolism? **Frontiers in cell and developmental biology**, 6, p. 90-90, 2018.

SALVATTE, K.; FARIAS, D. R.; NORMANDO, P.; BERTI, T. L. *et al.* High Serum Folate Concentration, Vitamin B12 Deficiency, and Anthropometric Nutritional Status in Brazilian Children Aged 6-59 Months: Data from the Brazilian National Survey of Child Nutrition. **J Nutr**, 153, n. 7, p. 2094-2104, Jul 2023.

SANIA, A.; SUDFELD, C. R.; DANAEI, G.; FINK, G. *et al.* Early life risk factors of motor, cognitive and language development: a pooled analysis of studies from low/middle-income countries. **BMJ Open**, 9, n. 10, p. e026449, Oct 3 2019.

SARTES, L.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. Advances in Psychometrics: From Classical Test Theory to Item Response Theory. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, 26, p. 241-250, 12/01 2012.

SATO, K.; FUKAI, T.; FUJISAWA, K. K.; NAKAMURO, M. Association Between the COVID-19 Pandemic and Early Childhood Development. **JAMA Pediatrics**, 177, n. 9, p. 930-938, 2023.

SCAGLIONE, F.; PANZAVOLTA, G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. **Xenobiotica**, 44, n. 5, p. 480-488, May 2014.

SCHOLL, T. O.; JOHNSON, W. G. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. **Am J Clin Nutr**, 71, n. 5 Suppl, p. 1295s-1303s, May 2000.

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**, 104, n. 50, p. 19995-20000, Dec 11 2007.

SELHUB, J.; ROSENBERG, I. H. Excessive folic acid intake and relation to adverse health outcome. **Biochimie**, 126, p. 71-78, Jul 2016.

SHELDRIK, R. C.; PERRIN, E. C. Evidence-based milestones for surveillance of cognitive, language, and motor development. **Acad Pediatr**, 13, n. 6, p. 577-586, Nov-Dec 2013.

SHELDRIK, R. C.; SCHLICHTING, L. E.; BERGER, B.; CLYNE, A. *et al.* Establishing New Norms for Developmental Milestones. **Pediatrics**, 144, n. 6, Dec 2019.

SHENG, X.; WANG, J.; LI, F.; OUYANG, F. *et al.* Effects of dietary intervention on vitamin B(12) status and cognitive level of 18-month-old toddlers in high-poverty areas: a cluster-randomized controlled trial. **BMC Pediatr**, 19, n. 1, p. 334, Sep 13 2019.

SILVA, Â. C. D. d.; ENGSTRON, E. M.; MIRANDA, C. T. d. Fatores associados ao desenvolvimento neuropsicomotor em crianças de 6-18 meses de vida inseridas em creches públicas do Município de João Pessoa, Paraíba, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública [online]**, 31, n. 9, p. 1881-1893, 2015.

SIMKHADA, B.; TEIJLINGEN, E. R.; PORTER, M.; SIMKHADA, P. Factors affecting the utilization of antenatal care in developing countries: systematic review of the literature. **J Adv Nurs**, 61, n. 3, p. 244-260, Feb 2008.

SINGLA, D. R.; KUMBAKUMBA, E.; ABOUD, F. E. Effects of a parenting intervention to address maternal psychological wellbeing and child development and growth in rural Uganda: a community-based, cluster randomised trial. **Lancet Glob Health**, 3, n. 8, p. e458-e469, Aug 2015.

SRINIVASAN, K.; THOMAS, S.; ANAND, S.; JAYACHANDRA, M. *et al.* Vitamin B-12 Supplementation during Pregnancy and Early Lactation Does Not Affect Neurophysiologic Outcomes in Children Aged 6 Years. **The Journal of nutrition**, 150, n. 7, p. 1951-1957, 2020.

SRINIVASAN, K.; THOMAS, T.; KAPANEE, A. R.; RAMTHAL, A. *et al.* Effects of maternal vitamin B12 supplementation on early infant neurocognitive outcomes: a randomized controlled clinical trial. **Matern Child Nutr**, 13, n. 2, Apr 2017.

STRAND, T. A.; TANEJA, S.; UELAND, P. M.; REFSUM, H. *et al.* Cobalamin and folate status predicts mental development scores in North Indian children 12-18 mo of age. **Am J Clin Nutr**, 97, n. 2, p. 310-317, Feb 2013.

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

SUDFELD, C. R.; MCCOY, D. C.; DANAEI, G.; FINK, G. *et al.* Linear growth and child development in low- and middle-income countries: a meta-analysis. **Pediatrics**, 135, n. 5, p. e1266-1275, May 2015.

TANUMIHARDJO, S. A.; RUSSELL, R. M.; STEPHENSEN, C. B.; GANNON, B. M. *et al.* Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-Vitamin A Review. **J Nutr**, 146, n. 9, p. 1816s-1848s, Sep 2016.

TARR, J. B.; TAMURA, T.; STOKSTAD, E. L. Availability of vitamin B6 and pantothenate in an average American diet in man. **Am J Clin Nutr**, 34, n. 7, p. 1328-1337, Jul 1981.

TENNANT, P. W. G.; MURRAY, E. J.; ARNOLD, K. F.; BERRIE, L. *et al.* Use of directed acyclic graphs (DAGs) to identify confounders in applied health research: review and recommendations. **Int J Epidemiol**, 50, n. 2, p. 620-632, May 17 2021.

THOMAS, S.; THOMAS, T.; BOSCH, R. J.; RAMTHAL, A. *et al.* Effect of Maternal Vitamin B12 Supplementation on Cognitive Outcomes in South Indian Children: A Randomized Controlled Clinical Trial. **Matern Child Health J**, 23, n. 2, p. 155-163, Feb 2019.

TORSVIK, I.; UELAND, P. M.; MARKESTAD, T.; BJØRKE-MONSEN, A. L. Cobalamin supplementation improves motor development and regurgitations in infants: results from a randomized intervention study. **Am J Clin Nutr**, 98, n. 5, p. 1233-1240, Nov 2013.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. FoodData Central external link disclaimer. SERVICE., A. R. 2019.

UELAND, P. M.; ULVIK, A.; RIOS-AVILA, L.; MIDTTUN, Ø. *et al.* Direct and Functional Biomarkers of Vitamin B6 Status. **Annu Rev Nutr**, 35, p. 33-70, 2015.

UFRJ, U. F. D. R. D. J. Aspectos Metodológicos: Descrição geral do estudo 1: ENANI 2019. - Documento eletrônico. Rio de Janeiro, RJ: UFRJ, 2021. Disponível em: <https://enani.nutricao.ufrj.br/index.php/relatorios/>. 2021a.

UFRJ, U. F. D. R. D. J. Biomarcadores do estado de micronutrientes: prevalências de deficiências e curvas de distribuição de micronutrientes em crianças brasileiras menores de 5 anos 3: ENANI-2019. Rio de Janeiro, RJ: UFRJ, 2021. Disponível em: <https://enani.nutricao.ufrj.br/index.php/relatorios/>. 2021b.

UNICEF. Early Childhood Development and Climate Change. 2022.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). Nutrition, for Every Child: UNICEF Nutrition Strategy 2020–2030. UNICEF, U. New York 2020.

VALENTINI, N. C.; COUTINHO, M. T. C.; PANSERA, S. M.; SANTOS, V. A. P. *et al.* Prevalência de déficits motores e desordem coordenativa desenvolvimental em crianças da região Sul do Brasil. **Revista Paulista de Pediatria [online]**. 30, n. 3, p. 377-384, 2012.

VALERA-GRAN, D.; GARCÍA DE LA HERA, M.; NAVARRETE-MUÑOZ, E. M.; FERNANDEZ-SOMOANO, A. *et al.* Folic acid supplements during pregnancy and child psychomotor development after the first year of life. **JAMA Pediatr**, 168, n. 11, p. e142611, Nov 2014.

VALERA-GRAN, D.; NAVARRETE-MUÑOZ, E. M.; GARCIA DE LA HERA, M.; FERNÁNDEZ-SOMOANO, A. *et al.* Effect of maternal high dosages of folic acid supplements on neurocognitive development in children at 4-5 y of age: the prospective birth cohort Infancia y Medio Ambiente (INMA) study. **Am J Clin Nutr**, 106, n. 3, p. 878-887, Sep 2017.

VASCONCELLOS, M. T. L.; SILVA, P.; CASTRO, I. R. R.; BOCCOLINI, C. S. *et al.* Sampling plan of the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. **Cad Saude Publica**, 37, n. 8, p. e00037221, 2021.

VENANCIO, S. I.; TEIXEIRA, J. A.; DE BORTOLI, M. C.; BERNAL, R. T. I. Factors associated with early childhood development in municipalities of Ceará, Brazil: a hierarchical model of contexts, environments, and nurturing care domains in a cross-sectional study. **The Lancet Regional Health - Americas**, 5, p. 100139, 2022/01/01/ 2022.

VENKATRAMANAN, S.; ARMATA, I. E.; STRUPP, B. J.; FINKELSTEIN, J. L. Vitamin B-12 and Cognition in Children. **Adv Nutr**, 7, n. 5, p. 879-888, Sep 2016.

VICTORA, C. G.; HUTTLY, S. R.; FUCHS, S. C.; OLINTO, M. T. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. **Int J Epidemiol**, 26, n. 1, p. 224-227, Feb 1997.

VILLAR, J.; CHEIKH ISMAIL, L.; VICTORA, C. G.; OHUMA, E. O. *et al.* International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. **Lancet**, 384, n. 9946, p. 857-868, Sep 6 2014.

VILLAR, J.; OCHIENG, R.; STAINES-URIAS, E.; FERNANDES, M. *et al.* Late weaning and maternal closeness, associated with advanced motor and visual maturation, reinforce autonomy in healthy, 2-year-old children. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 5251, Mar 23 2020.

WATANABE, F.; YABUTA, Y.; BITO, T.; TENG, F. Vitamin B₁₂-containing plant food sources for vegetarians. **Nutrients**, 6, n. 5, p. 1861-1873, May 5 2014.

WHITEHEAD, V. M. Acquired and inherited disorders of cobalamin and folate in children. **Br J Haematol**, 134, n. 2, p. 125-136, Jul 2006.

WHO. **WHO handbook for guideline development**. 2nd ed ed. Geneva: World Health Organization, 2014 2014. 9789241548960
9789245548966 (Chinese)
9789246548965 (Arabic).

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

WHO. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. *In: Improving Early Childhood Development: WHO Guideline*. Geneva: World Health Organization
© World Health Organization 2020., 2020.

WHO. Department of Nutrition and Food Safety key achievements 2021. *In*. Geneva: World Health Organization
© World Health Organization 2022., 2022.

WHO. **Malnutrition**. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>.

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

WU, A.; CHANARIN, I.; SLAVIN, G.; LEVI, A. J. Folate Deficiency in the Alcoholic—its Relationship to Clinical and Haematological Abnormalities, Liver Disease and Folate Stores. **British Journal of Haematology**, 29, n. 3, p. 469-478, 1975.

YAKOUB, M. Y.; LO, C. W. Nutrition (Micronutrients) in Child Growth and Development: A Systematic Review on Current Evidence, Recommendations and Opportunities for Further Research. **J Dev Behav Pediatr**, 38, n. 8, p. 665-679, Oct 2017.

YAN, J.; ZHU, Y.; CAO, L. J.; LIU, Y. Y. *et al.* Effects of maternal folic acid supplementation during pregnancy on infant neurodevelopment at 1 month of age: a birth cohort study in China. **Eur J Nutr**, 59, n. 4, p. 1345-1356, Jun 2020.

ZAGO, J. T. d. C.; PINTO, P. A. F.; LEITE, H. R.; SANTOS, J. N. *et al.* Associação entre o desenvolvimento neuropsicomotor e fatores de risco biológico e ambientais em crianças na primeira infância. . **Revista CEFAC [online]**. , 19, n. 3, p. 320-329, 2017.

ZANARDI, D. M.; SANTOS, J. P.; PACAGNELLA, R. C.; PARPINELLI, M. A. *et al.* Long-Term Consequences of Severe Maternal Morbidity on Infant Growth and Development. **Matern Child Health J**, 25, n. 3, p. 487-496, Mar 2021.

Nota: SWYC-BR: *Survey of Well-being of Young Children* versão brasileira

Anexo 2 – Alimentos avaliados no Bloco E.

Consumo alimentar avaliado	
1.	Leite do peito
2.	Água
3.	Água filtrada/ fervida
4.	Água com açúcar
5.	Chá
6.	Leite de vaca em pó
7.	Leite de vaca líquido
8.	Leite de soja em pó
9.	Leite de soja líquido
10.	Fórmula infantil
11.	Suco natural de fruta espremido sem açúcar
12.	Fruta inteira, em pedaço ou amassada
13.	Quantas vezes “nome da criança” comeu fruta inteira, em pedaço ou amassada ontem?
14.	Manga, mamão ou goiaba
15.	Comeu outras frutas que não manga, mamão ou goiaba ontem ?
16.	Comida de sal (de panela, papa ou sopa)
17.	Essa comida foi oferecida de que forma
18.	Mingau ou papa com leite
19.	Iogurte
20.	Arroz, batata, inhame, cará, aipim/macaxeira/mandioca, farinha ou macarrão (sem ser macarrão instantâneo, tipo miojo)
21.	Pão
22.	Legumes diferentes de batata, inhame, cará, aipim/macaxeira/mandioca
23.	Cenoura, abóbora (jerimum) ou batata doce
24.	Couve, espinafre, taioba, brócolis, caruru folha, beldroega, bertalha ou mostarda
25.	Outras verduras, sem ser couve, espinafre, taioba, brócolis, caruru folha, beldroega, bertalha ou mostarda
26.	Feijão ou outros tipos de grãos, como lentilha, ervilha ou grão de bico
27.	Algum tipo de carne (de boi, frango, porco, peixe ou outro)
28.	Fígado
29.	Ovo (frito, mexido, omelete, cozido ou gemada)
30.	Hambúrguer, presunto, mortadela, salame, nugget, linguiça ou salsicha
31.	Salgadinhos de pacote, tipo chips como Fofura, Fandangos, Cheetos ou outros parecidos
32.	Suco industrializado, de caixinha, água de coco de caixinha, guaraná natural ou xaropes de guaraná, refresco de groselha, suco em pó ou suco natural de fruta com adição de açúcar
33.	Refrigerante
34.	Macarrão instantâneo
35.	Biscoito/bolacha doce ou salgada
36.	Bala, pirulito ou outras guloseimas
37.	Algum alimento que levou tempero pronto industrializado (tipo Sazon, caldo Knorr)
38.	Farinhas instantâneas de arroz, milho, trigo ou aveia (por exemplo: Mucilon, Farinha láctea, Neston, Vitalon, Milnutri)
39.	Algum alimento por mamadeira ou chuquinha
40.	Alimento adoçado com açúcar, mel ou melado

Anexo 3 - Agrupamentos de biomarcadores sanguíneos.

Agrupamentos	n
1a Hemoglobina, PCR, ferritina ^a	7.473
1b Hemoglobina, PCR, ferritina ^b	7.293
1c PCR e ferritina ^a	7.931
2 Hemoglobina e vitamina A	7.716
3 Hemoglobina, vitamina A, vitamina D, e zinco	7.037
4 PCR e zinco	7.659
5 PCR e vitamina A	7.944
6 PCR e selênio	7.660
7 Ácido fólico e vitamina B12	7.418
8 PCR, zinco, selênio, vitamina A e vitamina E	7.506
9a Ácido fólico, hemoglobina, ferritina, PCR, vitaminas B12, D, A, B1 e B6, zinco e selênio ^a	6.023
9b Ácido fólico, hemoglobina, ferritina, PCR, vitaminas B12, D, A, B1 e B6, zinco e selênio ^c	6.532
10 Hemoglobina, ácido fólico, vitamina B12, ferritina e PCR ^a	6.526
11 Hemoglobina, ácido fólico, vitamina B12, ferritina e PCR ^d	6.556
12 Hemoglobina	8.187
13 Ácido fólico	7.435
14 Ferritina	8.156
15 Vitamina B12	7.441
16 Vitamina D	8.217
17 Vitamina A	8.393
18 Vitamina B1	8.328
19 Vitamina B6	8.329
20 Vitamina E	8.388
21 Zinco	8.052
22 Selênio	8.054

Fonte: Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019) (UFRJ, 2021a)

Nota: Número de crianças elegíveis: 12.598. PCR: proteína C reativa.

^a 1a, 1c, 9a e 10: parâmetros coletados na mesma data.

^b 1b: Ferritina e PCR na mesma data; ferritina e hemoglobina na mesma data ou com intervalo de até 30 dias.

^c 9b: coletados em datas diferentes.

^d 11: coletadas na mesma data ou com hemoglobina com intervalo de até 30 dias