

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DA GORDURA NA ABSORÇÃO DE VITAMINA D₃
SUPLEMENTADA EM DOSE ORAL ÚNICA:
ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Fabiana Viegas Raimundo

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DA GORDURA NA ABSORÇÃO DE VITAMINA D₃
SUPLEMENTADA EM DOSE ORAL ÚNICA:
ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Fabiana Viegas Raimundo

Orientadora: Dra Tania Weber Furlanetto

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Medicina: Ciências Médicas,
UFRGS, como requisito para obtenção do
título de Doutor

Porto Alegre

2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por sempre me incentivarem a estudar, lutar pelos meus sonhos e por oportunizar mais esta conquista. Às minhas irmãs, pelo carinho e compreensão.

Ao meu querido Ricardo Montenegro por sempre me incentivar, com muito carinho, amor e paciência. Pelo companheirismo, que já atravessou fronteiras.

À minha orientadora, professora Dra Tania Furlanetto, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo exemplo profissional. Pelo seu entusiasmo, incentivo, apoio e reflexões. Pela disponibilidade constante para a orientação deste trabalho e apoio imensurável para a realização da defesa antecipada. Por todos os momentos preciosos de convivência. Pelo incentivo ao estudo, ao desenvolvimento de novas ideias e superação de limites.

Ao Dr. Gustavo Faulhaber pelo incentivo e apoio em todas as etapas de desenvolvimento deste e de outros projetos.

Aos residentes Maria Augusta Lang e Luciano Scopel, à biomédica Natália Marcondes e à Mirna Anocibar pela colaboração no recrutamento dos participantes e na organização das coletas, sem os quais eu não seria capaz de conduzir este ensaio clínico.

A todos os médicos residentes que participaram desta pesquisa.

Ao Fundo de Apoio à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

A todos os professores e funcionários do PPGCM/UFRGS e GPPG/HCPA.

A todos aqueles não citados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Logic will get you from A to B.

Imagination will take you everywhere.”

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: Suplementos de vitamina D são amplamente utilizados no tratamento e prevenção da deficiência de vitamina D. Como essa molécula é hidrofóbica, sua absorção por via oral pode variar de acordo com o conteúdo de gordura da refeição consumida com o suplemento embora não existam evidências que recomendem a ingestão com alimento.

Objetivos: Avaliar os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] após ingestão de dose oral única de colecalciferol, associada a três refeições com diferentes quantidades de gordura ou placebo.

Métodos: O ensaio clínico duplo-cego placebo controlado incluiu sessenta e quatro médicos residentes saudáveis de um hospital universitário em Porto Alegre 30°S, Brasil, divididos em quatro grupos. Três grupos receberam 50.000UI de colecalciferol durante refeições contendo 0g [Grupo 1(G1)], 15g [Grupo 2(G2)] ou 30g [Grupo 3(G3)] de gordura e um grupo recebeu placebo, de acordo com a randomização. Níveis séricos de 25(OH)D, paratormônio (PTH), cálcio total, albumina, magnésio e creatinina e níveis de cálcio, magnésio e creatinina na urina foram medidos no início do estudo e 14 dias após intervenção.

Resultados: A média dos níveis séricos de 25(OH)D foi baixa em todos os grupos (G1= 17.84±6.78ng/mL; G2=14.03±5.68ng/mL; G3=15.16±6.03ng/mL; G4=14.31±5.39 ng/mL). Após 2 semanas, a vitamina D consumida durante o café da manhã aumentou a variação média dos níveis de 25(OH)D no soro, quando comparada ao placebo: G1(5.28 ±3.24 ng/mL) x G4(1.14±2.00ng/mL), p=0.001; G2(8.59±2.71ng/mL) x G4, p<0.001; G3(8.64± 2.98ng/mL) x G4, p=0.001. No entanto, a ingestão de gordura com a vitamina

D aumentou ainda mais a variação da média dos níveis séricos de 25(OH)D: G1XG2, $p=0.007$; and G1XG3, $p=0.008$.

Conclusão: Após duas semanas, uma dose oral única de vitamina D aumentou os níveis séricos de 25(OH)D quando administrado com alimentos, e foi maior quando a refeição continha pelo menos 15g de gordura. Esses achados podem ter implicações importantes para definir a maneira mais eficaz de suplementação oral de vitamina D.

(ClinicalTrials.gov: NCT00968734)

Palavras-chaves: vitamina D, colecalciferol, suplementos dietéticos, biodisponibilidade, 25-hidroxivitamina D

ABSTRACT

Introduction: Vitamin D supplements are useful to prevent and treat vitamin D deficiency. As this molecule is hydrophobic its oral absorption could vary according to the fat content of the meal is consumed with, although there is no evidence to recommend its ingestion with food.

Objective: To evaluate serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels after the oral intake of a single dose of cholecalciferol, during meals containing three different amounts of fat, or placebo.

Subjects and Methods: A double-blind placebo controlled trial included sixty-four healthy medical residents of a university hospital in Porto Alegre, latitude 30⁰, Brazil, divided in four groups. Three groups received 50,000 IU of cholecalciferol during meals containing 0g [Group 1 (G1)], 15g [Group 2 (G2)] or 30g [Group 3(G3)] of fat, and one group received placebo [group 4 (G4)], according to randomization. Serum 25(OH)D, parathyroid hormone (PTH), total calcium, albumin, magnesium and creatinine levels; and urinary calcium, magnesium and creatinine levels were measured at baseline and after 14 days.

Results: Mean serum 25(OH)D levels were low in all groups (G1= 17.84±6.78ng/mL; G2=14.03±5.68ng/mL; G3= 15.16±6.03ng/mL; G4=14.31±5.39 ng/mL). After 2-weeks, vitamin D given during breakfast increased mean variation of serum 25(OH)D levels, when compared to placebo: G1(5.28±3.24 ng/mL) x G4(1.14±2.00ng/mL), p=0.001; G2(8.59±2.71ng/mL) x G4, p=0.000; G3(8.64±2.98ng/mL) x G4, p=0.001. Nevertheless, the intake of fat with vitamin D increased further the variation of mean serum 25(OH)D levels: G1XG2, p=0.007; and G1XG3, p=0.008.

Conclusion: After two weeks, a single oral dose of vitamin D increased mean serum 25(OH)D levels when given with food, and was larger when the meal had at least 15g of fat. These findings can have important implications to define the most effective way to supplement oral vitamin D. (ClinicalTrials.gov: NCT00968734)

Key Words: Vitamin D, Cholecalciferol, Dietary Supplements, Bioavailability, 25-hydroxyvitamin D

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biodisponibilidade de vitamina D sob a forma de suplementos e em alimentos fortificados.....	36
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura1. Fluxograma da seleção dos artigos	24
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D: 1,25-dihidroxitamina D ou calcitriol

25(OH)D: 25-hidroxitamina D ou calcidiol

25,24(OH)₂D: 24,25-dihidroxitamina D

CBPA: *competitive protein-binding assay*

DNA: ácido desoxirribonucleico

EAR: *estimated average requirement* 988888

HPLC: cromatografia líquida de alta pressão

IMC: índice de massa corporal

IOM: *Institute of Medicine*

NFκB: fator de transcrição nuclear kappa B

PTH: hormônio da paratireóide

RANK: receptor ativador do NFκB

RANKL: ligante do receptor ativador do NFκB

RDA: *recommended dietary allowance*

RIA: radioimunoensaio

RNA: ácido ribonucleico

TCM: triglicerídeo de cadeia média

UI: unidades internacionais

UL: *tolerable upper intake level*

UVB: radiação ultravioleta B

VIT: vitamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
3. MARCO TEÓRICO	40
3.1 Questão de Pesquisa	45
3.2 Estratégias para responder à questão de pesquisa	45
4. JUSTIFICATIVA	46
5. OBJETIVO	47
6. REFERÊNCIAS	48
7. ARTIGO	57
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO	82
APÊNDICE B: ANAMNESE - FICHA DOS PARTICIPANTES.....	84

1. INTRODUÇÃO

Prevalência alta de deficiência de vitamina D tem sido identificada em todo o mundo nos últimos anos (1), destacando-se como um problema de saúde pública, com repercussões ainda não totalmente esclarecidas. (2). A deficiência crônica desta vitamina tem sido associada ao aumento do risco de hipertensão arterial sistêmica, esclerose múltipla, diabetes mellitus tipo 1, câncer de cólon, próstata, cérebro e ovários (3). Metanálises realizadas a partir de ensaios clínicos randomizados concluíram que a suplementação de vitamina D, associada com cálcio, reduz o risco de quedas e fraturas (4, 5). No entanto, o delineamento da maioria dos estudos já realizados com vitamina D com outros desfechos não permite o estabelecimento de uma relação causal com estado nutricional de vitamina D.

Os seres humanos obtêm esta vitamina através de alimentos, suplementos dietéticos ou exposição solar. A vitamina D é encontrada em poucos alimentos; carnes e peixes magros possuem pequena quantidade desta vitamina (2). Os peixes, maior fonte de vitamina D, acumulam essa vitamina devido à sua cadeia alimentar, iniciada pelo plâncton, onde a vitamina D é sintetizada pela ação da irradiação solar (6). Algumas margarinas, iogurtes e leites disponíveis no mercado brasileiro são enriquecidos, porém é uma característica opcional conforme a legislação vigente. A potência da vitamina D é medida em unidades internacionais (UI), sendo que 1µg de colecalciferol ou ergocalciferol equivale a 40UI (7).

Na síntese cutânea há uma reação de isomerização catalisada pela radiação ultravioleta (comprimento de onda de luz entre 290 e 315 nm), onde ocorre a foto conversão do 7-deidrocolesterol em colecalciferol (8-10). Estima-se que níveis

adequados de vitamina D no organismo poderiam ser atingidos com 5 a 10 minutos de exposição solar diária. Porém, a produção cutânea de colecalciferol sofre influência de diversos fatores, tais como latitude, estação do ano, pigmentação da pele, tipo de vestuário, uso de protetor solar e envelhecimento (8, 10). A cidade de Porto Alegre está localizada na latitude 30°S, o que favorece uma menor incidência solar no inverno, já associada com níveis séricos de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] reduzidos após esse período em crianças e adolescentes (11).

A vitamina D [vitamina D₂ (ergocalciferol) e a vitamina D₃ (colecalciferol)], proveniente de suplementos dietéticos ou alimentos, é incorporada aos quilomícrons e transportada pelo sistema linfático até a circulação venosa. Na circulação, ela está ligada à proteína ligante de vitamina D, uma α -globulina específica que a transporta até o fígado, onde é convertida em 25 hidroxicolecalciferol [25(OH)D] pela enzima 25-hidroxilase D. Esta é a forma mais abundante de vitamina D na circulação e sua medida é usada para determinar o status de vitamina D, pois sua meia vida é de duas semanas e seus níveis séricos podem ser correlacionados com hiperparatireoidismo secundário, fraturas e osteomalácia. A 25(OH)D é biologicamente inativa e é convertida nos rins, pela enzima 25 hidroxivitamina D-1 α -hidroxilase, à sua forma ativa, a 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D], chamada de calcitriol (12). Uma vez formada, a 1,25(OH)₂D induz a síntese de uma proteína, *calbindina*, necessária ao transporte do cálcio, no intestino.

O calcitriol age nas células-alvo de uma maneira similar aos hormônios esteróides, atravessando a membrana plasmática e interagindo com o receptor nuclear específico, conhecido como receptor da vitamina D. Este complexo ligante-receptor liga-se a um elemento responsivo específico da vitamina D no DNA e, com associação de fatores de transcrição, aumenta a transcrição dos RNAs mensageiros que codificam

proteínas transportadoras de cálcio, proteínas da matriz óssea e proteínas reguladoras do ciclo celular. Como resultado destes processos, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ estimula a absorção intestinal de cálcio e fosfato. Estas funções têm a finalidade comum de restaurar os níveis séricos de cálcio e fosfato, quando a concentração destes íons está baixa (13).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ age em conjunto com o hormônio da paratireoide (PTH), que é produzido em resposta a cálcio baixo no soro. Esse hormônio desempenha um papel importante na regulação da ativação da vitamina D. Níveis altos de PTH estimulam a produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, enquanto níveis baixos de PTH induzem formação de uma forma inativa da vitamina D, a $24,25-(\text{OH})_2\text{D}$.(7).

A deficiência ou insuficiência de vitamina D resulta no decréscimo da absorção intestinal de cálcio e conseqüente redução de cálcio circulante, promovendo o aumento da expressão, produção e secreção de PTH. O PTH estimula os rins a produzir mais $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Além disso, o PTH tem duas outras opções para manter os níveis séricos de cálcio: através do aumento da reabsorção tubular de cálcio nos rins ou do aumento da mobilização das reservas de cálcio do esqueleto, aumentando a expressão de RANKL (ligante do NFkB) nos osteoblastos. Quando o RANKL se liga ao RANK (receptor do NFkB) no pré-osteoclasto, há um estímulo para formação de osteoclastos multinucleados. Estes osteoclastos maduros removem cálcio e fósforo do osso através da liberação de enzimas e ácido clorídrico para dissolver a matriz de colágeno. O aumento da atividade osteoclástica reduz o conteúdo mineral do osso, e aumenta o risco de fratura. (14)

O guideline mais recente da Endocrine Society (2011) recomenda que a deficiência de vitamina D deve ser investigada em indivíduos com risco para esta deficiência, através da dosagem da $25(\text{OH})\text{D}$ no soro (15). Embora não exista um consenso sobre um nível ótimo de $25(\text{OH})\text{D}$ sérica, a deficiência de vitamina D é

definida por alguns estudiosos da área como níveis abaixo de 20ng/ml ou 50nmol/L. Já os níveis de 25(OH)D de 21 a 29ng/ml indicam uma insuficiência de vitamina D, e os níveis iguais ou maiores que 30ng/ml são considerados como suficientes (2, 15-17). A intoxicação pela vitamina D é observada quando o nível sérico de 25(OH)D é superior a 150ng/ml (374 nmol/l). Com a utilização destas definições, estima-se que cerca de um bilhão de pessoas tenham deficiência ou insuficiência de vitamina D no mundo (1, 18).

As concentrações séricas de vitamina D em adultos jovens variam conforme a região geográfica, dependendo da latitude, sendo mais adequadas perto da linha do Equador (19). Embora o Brasil esteja próximo a esta linha, os estados do sul do país são geograficamente mais distantes, principalmente o Rio Grande do Sul, o que torna esta questão mais relevante em nosso estado. Níveis insuficientes e limítrofes de 25(OH)D já foram observados em crianças (20) e adultos (21, 22) na região sul do Brasil.

Num cenário onde a síntese cutânea de vitamina D é limitada por vários fatores (2), poucos alimentos contêm esse nutriente (23, 24) e o consumo dietético em adultos é inadequado, mesmo em países onde há alimentos fortificados com esta vitamina (25-28), os suplementos alimentares são úteis para prevenir e tratar a deficiência de vitamina D (29).

Em 2010, o *Institute of Medicine* (IOM) realizou uma revisão das evidências e desfechos relacionados com a vitamina D e cálcio, para a saúde óssea e não óssea, com o objetivo de atualizar as Recomendações Dietéticas de Ingestão (*Dietary Reference Intake* -DRI) destes nutrientes. Foram avaliadas diversas doenças crônicas e desfechos clínicos e o comitê concluiu que, apenas os aspectos relacionados à saúde óssea forneceram a base necessária para o estabelecimento da *Estimated Average Requirement* (EAR) e *Recommended Dietary Allowance* (RDA) de 2011 para indivíduos acima de 1 ano. Para os desfechos não ósseos, incluindo câncer, doença cardiovascular, diabetes,

infecções e desordens autoimunes, os estudos clínicos randomizados são escassos e a evidência é inconsistente e inconclusiva em relação à causalidade e insuficiente para o desenvolvimento da DRI. O nível sérico de 25-hidroxivitamina D (25OHD) foi considerado o marcador mais importante da exposição total de vitamina D, tanto por síntese endógena como por ingestão.

Dentre os principais problemas encontrados para o desenvolvimento das recomendações de ingestão, estão os ensaios clínicos realizados com investigação de cálcio e vitamina D simultaneamente e a dificuldade de separar seus efeitos nos estudos, os dados limitados para avaliar o efeito da dose-resposta, a complexidade em relação às fontes endógena e dietética de vitamina D e os fatores de confusão presentes em estudos observacionais. Para vitamina D (assumindo que a exposição solar é mínima), a EAR é de 400UI/dia para idades acima de 1 ano e a RDA é de 600 UI/dia para idades entre 1 a 70 anos e 800 UI/dia para 71 anos ou mais. A recomendação foi estabelecida, principalmente, pela avaliação conjunta de desfechos para a saúde óssea, considerando os níveis séricos de 25(OH)D de 16ng/mL (40nmol/L) para o estabelecimento das EARs e de 20ng/mL (50nmol/L) ou mais para o estabelecimento das RDAs (30-32).

No entanto, a quantidade de vitamina D suplementar não está completamente estabelecida, pois os valores estabelecidos nas DRIs são aplicáveis para manutenção do estado nutricional deste nutriente, provavelmente insuficiente para recuperar a deficiência de vitamina D previamente estabelecida.

Com base em ensaios clínicos e estudos epidemiológicos, o nível sérico de 25(OH)D mínimo desejável varia entre 20 e 30 ng/ml e são considerados seguros os níveis até 90ng/ml. Na ausência de luz solar, 90ng/ml de 25(OH)D são obtidos com o consumo prolongado de cerca de 10.000 UI/dia (250 ug/dia) de vitamina D₃, sendo esta dose considerada segura na ausência de luz solar (33). Uma dose oral única de

100.000UI de colecalciferol é segura e efetiva para aumentar e manter elevadas as concentrações de 25(OH)D sérica por dois meses, o que seria equivalente a doses de 1600UI/dia (27, 34).

Paralelamente, estatísticas sobre a ingestão de vitamina D indicam um consumo médio de 200 a 400UI/dia, somando alimentos e suplementos habitualmente consumidos nos Estados Unidos (33). No Brasil, existem poucos alimentos suplementados com esta vitamina e a população não tem o hábito de consumir suplementos vitamínicos em grande escala, a exemplo do que ocorre nos Estados Unidos.

Os níveis de Ingestão Máxima Tolerável (*Tolerable Upper Intake Leve* - UL) para vitamina D variam entre 1000 e 4000 UI/dia, de acordo com novas evidências de alguns desfechos associados em forma de “U”, isto é, com riscos, tanto nos níveis inferiores como nos superiores, para todas as causas de mortalidade, doenças cardiovasculares, calcificação vascular, câncer pancreático, quedas, fragilidade e fraturas ósseas (32).

Outro fator importante a ser considerado na suplementação é o índice de massa corporal (IMC), pois foi inversamente associado com os níveis séricos de vitamina D, 24 horas após o uso de dose única de 50.000UI de vitamina D₂ oral ou exposição à irradiação UVB (35). Idosos que receberam suplementação oral de 700UI/dia de vitamina D associada com 500mg/dia de cálcio por um ano também apresentaram mudanças na 25(OH)D inversamente proporcionais ao IMC, sugerindo que o tamanho corporal deve ser levado em conta no momento da prescrição do suplemento de vitamina D (36).

Esta tese de Doutorado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS, sendo apresentada em dois

capítulos principais: revisão sistemática da literatura em forma de artigo científico e artigo original em inglês.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Biodisponibilidade de Suplementos de Vitamina D: Revisão Sistemática

Resumo

Introdução: Suplementos dietéticos de vitamina D são amplamente utilizados para a prevenção e tratamento de insuficiência e deficiência de vitamina D. A biodisponibilidade do suplemento de vitamina D administrado por via oral pode estar relacionada com a absorção intestinal.

Objetivo: Sumarizar as evidências sobre biodisponibilidade de suplementos de vitamina D, identificando os fatores que possam interferir na absorção e consequentemente nos níveis séricos de 25(OH)D.

Métodos: Foi realizada a busca sistemática de ensaios clínicos sobre absorção ou biodisponibilidade da vitamina D realizados em humanos, com suplementação de vitamina D₂ ou vitamina D₃, na forma de suplementos ou alimentos, cujo desfecho foi os níveis séricos de 25(OH)D. As buscas foram realizadas na base de dados PubMed, utilizando os termos “vitamin d”, “supplements”, “food”, “absorption” e “bioavailability”. Foram avaliados artigos publicados até 31 de julho de 2012, redigidos em português, inglês e espanhol.

Resultados: Foram identificados 643 estudos, dos quais 12 ensaios clínicos foram avaliados. Dentre os estudos selecionados para a análise final, 7 foram realizados com alimentos fortificados com vitamina D e 5 foram realizados com suplementos de vitamina D.

Conclusão: Envelhecimento e composição nutricional do alimento associado ao suplemento de vitamina D são fatores que podem alterar a biodisponibilidade e absorção intestinal de vitamina D. Novos estudos são necessários para avaliação do efeito da alimentação e sua composição nutricional na absorção de vitamina D.

Palavras-chave: Vitamina D, suplementos dietéticos, biodisponibilidade

INTRODUÇÃO

A insuficiência de vitamina D constitui um problema de saúde pública (1, 2). A insuficiência crônica impede a mineralização adequada do osso, propiciando o desenvolvimento de raquitismo em crianças, osteomalácia e osteoporose em adultos. Recentemente, novas funções têm sido associadas com a vitamina D, como doenças autoimunes, saúde cardiovascular e prevenção de câncer (16, 37, 38). A principal forma circulante mensurável de vitamina D é a 25(OH)D (39). A insuficiência de vitamina D é definida por níveis séricos de 25(OH)D < 30 ng/mL e a deficiência por níveis séricos 25(OH)D < 20 ng/mL (15).

A síntese cutânea de vitamina D através de radiação ultravioleta, maior contribuinte do status de vitamina D, é limitada por fatores ambientais, culturais e fisiológicos, incluindo latitude, estação do ano, vestuário, uso de protetor solar, idade e pigmentação da pele. Além disso, a vitamina D é dificilmente obtida através da alimentação porque não está naturalmente presente em muitos alimentos. Pode estar presente em alimentos contendo gordura provenientes de animais expostos à luz solar ou com dieta suplementada com vitamina D, como gemas de ovos, leite e carne. Vitamina D₂ pode ser encontrada em cogumelos, expostos a UVB antes ou após a colheita (24, 40-42). No Brasil, não há estudos sobre conteúdo de vitamina D nos alimentos não suplementados.

Suplementos dietéticos isolados ou alimentos suplementados com vitamina D₂ (ergocalciferol) e vitamina D₃ (colecalciferol) são amplamente utilizados para a prevenção e tratamento de insuficiência e deficiência desta vitamina (38, 43-45). A biodisponibilidade do suplemento de vitamina D administrado por via oral pode estar

relacionada com a absorção intestinal (46). Alimentos modificam a farmacocinética dos medicamentos causando aumento, diminuição ou atraso na absorção (47, 48), no entanto, o consenso mais recente sobre tratamento e prevenção de deficiência de vitamina D recomenda que os suplementos sejam ingeridos em jejum ou com alimentos (15).

Otimizar as recomendações para a ingestão de suplementos orais de vitamina D para a população em geral requer considerar como os alimentos podem influenciar a biodisponibilidade da vitamina D. Grossman et al. (53) sugeriu que veículos oleosos produzem uma melhor resposta nos níveis séricos de 25(OH)D, em comparação com veículos em pó ou em etanol em indivíduos saudáveis.

O mecanismo de absorção de vitamina D a partir do trato gastrointestinal é semelhante à absorção de outros lípidos. A vitamina D é lipossolúvel, sua absorção ocorre no intestino delgado, onde é incorporada aos quilomicrons e transportada pelo sistema linfático até a circulação venosa. (49). Absorção inadequada de vitamina D, juntamente com outros lípidos da dieta, podem ocorrer em pacientes com fibrose cística, colestase, doença de Crohn, doença inflamatória intestinal, colite ulcerativa, atrofia das vilosidades do intestino delgado e ressecção de intestino delgado (50).

O objetivo desta revisão é sumarizar as evidências sobre biodisponibilidade de suplementos de vitamina D, identificando os fatores que possam interferir na absorção e consequentemente nos níveis séricos de 25(OH)D.

MÉTODOS

Uma revisão sistemática da literatura foi conduzida baseada nas diretrizes do protocolo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) (51).

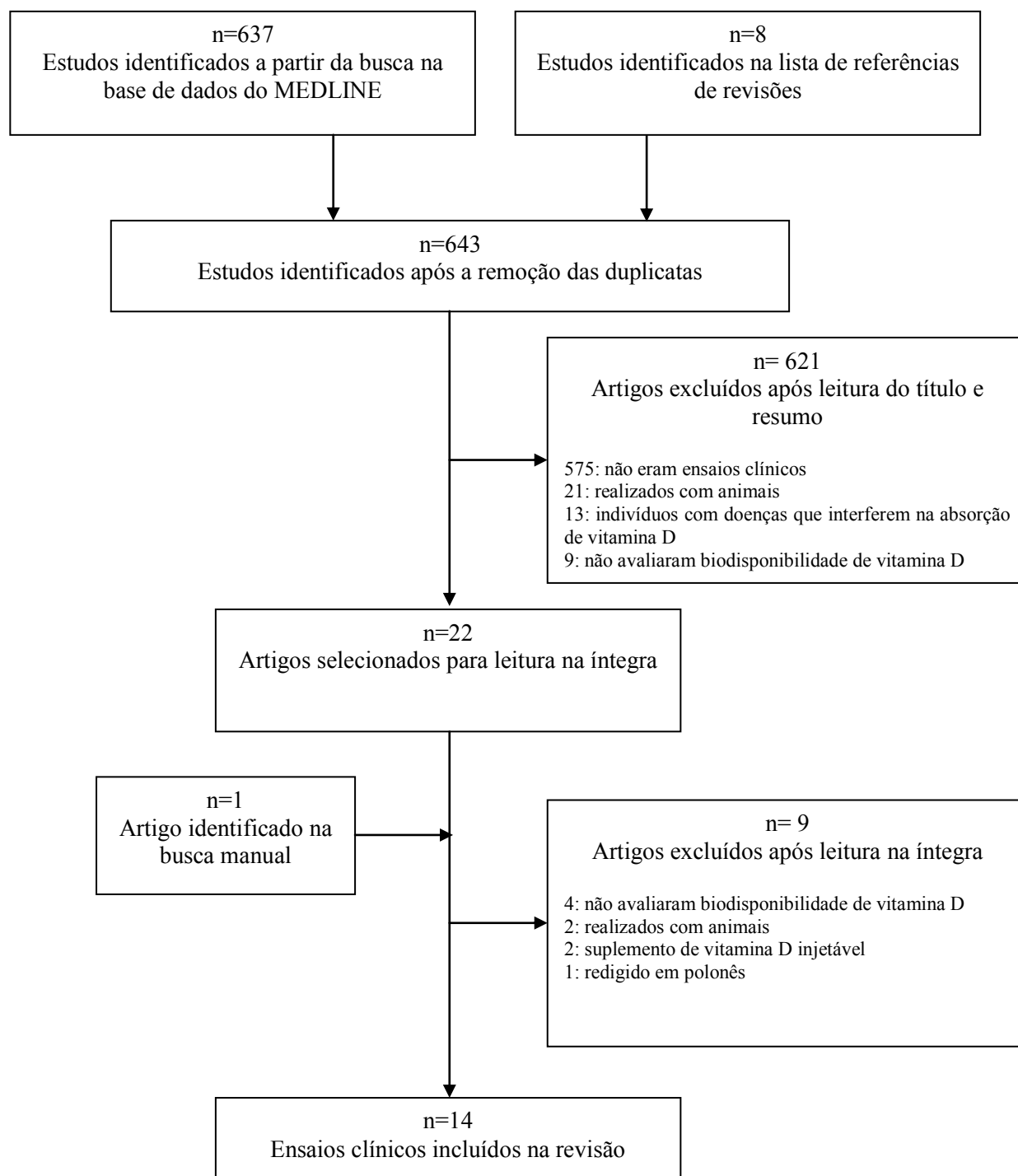
Foi realizada a busca sistemática de ensaios clínicos sobre absorção ou biodisponibilidade da vitamina D realizados em humanos, com suplementação de vitamina D₂ ou vitamina D₃, na forma de suplementos ou alimentos, cujo desfecho dos ensaios clínicos foram os níveis séricos de 25(OH)D.

As buscas foram realizadas na base de dados PubMed, utilizando os termos “vitamin d”, “supplements”, “food”, “absorption” e “bioavailability”, a partir da estratégia: "vitamin d"[MeSH Terms] OR "vitamin d"[All Fields] OR "ergocalciferols"[MeSH Terms] OR "ergocalciferols"[All Fields]) AND ("dietary supplements"[MeSH Terms] OR ("dietary"[All Fields] AND "supplements"[All Fields]) OR "dietary supplements"[All Fields] OR "supplement"[All Fields]) OR ("food"[MeSH Terms] OR "food"[All Fields]) AND (("pharmacokinetics"[Subheading] OR "pharmacokinetics"[All Fields] OR "absorption"[All Fields] OR "absorption"[MeSH Terms]) OR ("biological availability"[MeSH Terms] OR ("biological"[All Fields] AND "availability"[All Fields]) OR "biological availability"[All Fields] OR "bioavailability"[All Fields])). Foram avaliados artigos publicados até 31 de julho de 2012, redigidos em português, inglês ou espanhol.

Uma busca secundária foi realizada na lista de referências de duas revisões sobre biodisponibilidade de vitamina D (52, 53) e as citações em duplicata foram removidas.

A primeira etapa da seleção dos artigos resultantes da busca foi realizada a partir da leitura de títulos e resumos, onde foram utilizados os seguintes critérios de elegibilidade: a) Delineamento: ensaio clínico; b) População: humanos; c) Intervenção: suplementação oral de vitamina D ou alimento suplementado; d) Biodisponibilidade: mínimos dois grupos com mesma dose de vitamina D. Foram excluídos os estudos realizados com indivíduos com doença renal, hepática, intestinal ou com má absorção de gorduras, diabetes, obesidade, fibrose cística, cirurgia bariátrica, ou em uso de medicamentos anticonvulsivantes, barbitúricos e esteroides. As referências dos artigos selecionados nesta etapa foram revisadas manualmente em busca de estudos relevantes (Figura 1).

Os estudos selecionados foram avaliados na íntegra e foram extraídos os dados referentes à população, como idade e sexo, dose e duração de vitamina D, alimentos ou veículos adicionados ao suplemento, metabólito da vitamina D e método de análise utilizado para o desfecho e intervalo de dosagens do metabólito da vitamina D.

Figura 1: Fluxograma da seleção dos artigos

RESULTADOS

A estratégia de busca identificou 643 estudos, dos quais 22 foram selecionados para avaliação do texto completo. Um estudo foi identificado na busca manual. Após leitura dos estudos selecionados, 14 ensaios clínicos foram avaliados e os dados extraídos foram incluídos na tabela 1. Dentre os estudos selecionados para a análise final, sete foram realizados com alimentos e sete foram realizados com suplementos.

Biodisponibilidade de Vitamina D e Envelhecimento

A biodisponibilidade da suplementação de vitamina D via oral foi avaliada em relação às possíveis alterações que o envelhecimento provoca no metabolismo humano.

Estudo conduzido por Barragry e col. (54) avaliou a absorção de colecalciferol em idosos e adultos jovens a partir da suplementação de dose oral única de 95UI de vitamina D₃ com refeição contendo 30g de gordura para todos os participantes. Os níveis séricos dos metabólitos da vitamina D foram avaliados nas primeiras 6 horas após a suplementação e após 28 dias. Os níveis de vitamina D₃ no plasma foram significativamente maiores em mulheres jovens quando comparados aos outros participantes, após 3h ($p<0,05$), 4, 5 e 6h ($p<0,01$). Não foi observada correlação entre os níveis séricos de vitamina D₃ no plasma e a 25(OH)D₃. Os níveis séricos de 25(OH)D foram avaliados entre 28 e 56 dias após intervenção e os idosos apresentaram uma variação média de $14,7\pm 1,5\%$ em relação aos níveis basais, significativamente inferior aos $30,9\pm 3,6\%$ encontrados nos jovens ($p<0,01$).

O estudo realizado por Harris e col.(55) com jovens adultos de 22 a 28 anos e idosos de 63 a 73 anos, randomizou os participantes em 2 grupos: 1) grupo intervenção: 1800UI/dia de vitamina D₂; 2) grupo controle e foram acompanhados por 3 semanas. Os participantes foram orientados a consumir o suplemento durante a manhã, com alimentos. Não foi especificado o tipo de alimentos recomendado ou avaliada a composição nutricional da refeição matinal dos participantes. O estudo foi realizado em fevereiro, mês de inverno em Boston/EUA. Os níveis séricos de 25(OH)D₂ e de 25(OH)D aumentaram significativamente nos grupos suplementados, sem variação entre jovens e idosos do grupo controle. A média de aumento da 25(OH)D₂ foi maior em jovens suplementados que em idosos que receberam o suplemento ($15,2 \pm 3,6$ versus $7,8 \pm 5,1$ ng/mL) ($p=0,027$) e conseqüentemente os níveis de 25(OH)D também apresentaram esse aumento no grupo dos jovens. Estes dados são consistentes com um declínio de absorção, transporte ou hidroxilação hepática da vitamina D por via oral, com o avanço da idade

Outro estudo realizado por Harris e Dawson Hughes (56) foi realizado com o objetivo de identificar diferenças na resposta após 8 semanas de suplementação de 800UI de vitamina D₃, conforme a idade. Jovens e idosos saudáveis foram randomizados para receber suplementação ou placebo. Não foi recomendado o consumo do suplemento com ou sem alimentos e não foi avaliado se os participantes ingeriram algum alimento com o suplemento. O aumento dos níveis séricos de 25(OH)D e a magnitude desta variação após 8 semanas foi quase idêntica nos dois grupos, 9ng/mL e 8,8ng/mL nos jovens e idosos, respectivamente. No grupo controle houve uma redução modesta de 25(OH)D em jovens e idosos. A partir dos dados encontrados, parece não haver prejuízo, relacionado com a idade, na absorção ou no metabolismo da vitamina D na suplementação de 800UI/dia durante 8 semanas.

Biodisponibilidade de Vitamina D em alimentos fortificados

Outila e col.(41) investigaram a biodisponibilidade de vitamina D₂ em cogumelos. O estudo foi realizado nos meses de janeiro e fevereiro, na Finlândia, com 27 mulheres adultas jovens com níveis séricos de 25(OH)D <24ng/ml. Os participantes foram divididos em 3 grupos e receberam 5 refeições por semana, durante 3 semanas. O grupo 1 recebeu cogumelos liofilizados, contendo uma dose total de 8.400UI de vitamina D₂; o grupo 2 recebeu 8.400UI de suplemento de vitamina D₂ e o grupo 3 recebeu apenas as refeições, sem suplemento ou cogumelo. Os participantes foram aconselhados a manter seus hábitos alimentares, sem consumir peixes e margarinas suplementadas com vitamina D durante a realização do estudo. A composição nutricional das refeições oferecidas não foi informada. Os níveis séricos de 25(OH)D dos grupos 1 e 2 foram diferentes do grupo 3 na terceira semana. Considerando todos os grupos, as concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D apresentaram-se diferentes ao longo do estudo (p=0,001). Os níveis séricos de 25(OH)D ao final do estudo foram significativamente diferentes dos níveis basais de 25(OH)D (p=0,011). Quando os grupos 1 e 2 foram comparados com o grupo 3, as concentrações de 25(OH)D no soro, durante as 3 semanas, diferiram significativamente entre os grupos 1 e 3 (p = 0,032), bem como entre os grupos 2 e 3 (p = 0,004). As concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D em 3 semanas não diferiram significativamente entre os grupos 1 e 2 (p = 0,317). O estudo concluiu que a vitamina D₂ presente nos cogumelos é biodisponível e equivalente ao suplemento de vitamina D₂.

Estudo realizado por Urbain e col. (40) também avaliou a biodisponibilidade de vitamina D₂ em cogumelos irradiados com UVB. Cogumelos contêm pouca quantidade de vitamina D₂, mas são abundantes em ergosterol, que pode ser convertido em

vitamina D₂ a partir da radiação ultravioleta. Cogumelos frescos foram irradiados para utilização no estudo. Vinte e sete adultos caucasianos, saudáveis, com idade máxima de 45 anos, com IMC entre 18,5 e 26 kg/m², com níveis séricos de vitamina D ≤ 20 ng/mL e níveis séricos de cálcio normais, foram incluídos no estudo. Os participantes foram randomizados em 3 grupos: o grupo 1 recebeu 28.000UI de vitamina D₂ em sopa contendo cogumelos irradiados com UVB; o grupo 2 recebeu 60UI de vitamina D₂ em sopa contendo cogumelos convencionais e 28.000UI de suplemento de vitamina D₂ e grupo 3 recebeu 60UI de vitamina D₂ em sopa contendo cogumelos convencionais e placebo. O suplemento de vitamina D utilizado possuía etanol na formulação e foi dissolvido em suco de laranja. O placebo era o suco de laranja puro. A composição nutricional da sopa de cogumelos era de 4,2% de gordura, 0,8% de proteínas e 2,9% de carboidratos. A intervenção ocorreu semanalmente, durante 4 semanas e os níveis séricos de 25(OH)D foram medidos semanalmente, por 5 semanas. Após 2 semanas, os níveis séricos de 25(OH)D eram significativamente maiores no grupo cogumelo, quando comparado ao grupo placebo ($P < 0.001$). As concentrações séricas de 25(OH)D dos grupos cogumelo e suplemento aumentou significativamente e de forma semelhante durante o período de estudo de 1,56 ng/mL (IC 95%: 1,16- 1,92) e de 1,88 ng/mL por semana (IC 95%: 1,52 – 2.28), respectivamente. O estudo concluiu que a irradiação UVB em cogumelos melhora o status de vitamina D nesse alimento e que os cogumelos irradiados possuem a mesma biodisponibilidade que os suplementos de vitamina D₂, em humanos.

Natri e col. (57) avaliaram a biodisponibilidade de colecalciferol adicionado na fabricação de pães. A primeira etapa do estudo avaliou a estabilidade, concentração, dispersão e biodisponibilidade do colecalciferol em pães suplementados com vitamina D₃. Na segunda etapa foi realizado um ensaio clínico simples-cego com 41 mulheres, de

idade entre 25 e 45 anos, com níveis séricos de 25(OH)D entre 4,8 e 18ng/ml. Os participantes foram randomizados em quatro grupos: 1) pão de trigo suplementado com vitamina D₃; 2) pão de centeio suplementado com vitamina D₃; 3) pão de trigo (controle); 4) pão de trigo e suplemento de vitamina D₃. Todos participantes consumiram 4 fatias de pão por dia, o equivalente a 400UI/dia, exceto placebo, por um período de 3 semanas e foram orientados a manter sua dieta habitual, não consumir peixe mais de uma vez por semana e não beber leite suplementado com vitamina D. As mudanças nos níveis séricos de 25(OH)D foram 6,5±2,6; 6,0±2,5; -0,1±1,6; 7,8±4,0 ng/ml nos grupos pão de trigo suplementado, pão de centeio suplementado, controle e vitamina D, respectivamente. O aumento nos níveis séricos de 25(OH)D nos grupos com pão de trigo suplementado (p=0,571) e pão de centeio suplementado (p=0,442) não diferiu do grupo que recebeu suplemento. A mudança do grupo controle foi menor que todos os grupos (p=0,005). Os dois tipos de pães suplementados foram tão efetivos no aumento dos níveis séricos de 25(OH)D quanto o suplemento de vitamina D₃. O estudo concluiu que pão suplementado com colecalciferol é uma maneira segura e viável para melhorar o estado nutricional de vitamina D.

A biodisponibilidade de vitamina D adicionada em suco de laranja também foi avaliada. Tangpricha e col. (58) avaliaram a suplementação de duas bebidas com pouca ou nenhuma gordura, o suco de laranja e o leite desnatado. O estudo foi dividido em duas fases. Inicialmente foi realizado um ensaio clínico cruzado, com adultos saudáveis, com idade entre 19 e 68 anos, avaliando os níveis séricos de vitamina D₂, após a ingestão de dose oral única de 25.000UI de ergocalciferol em 0,1ml de óleo de milho aplicado em pão torrado, ou adicionado em 240 ml de leite integral ou ainda adicionado em 240 ml de leite desnatado. Cada participante recebeu os três alimentos em três momentos diferentes. Cada etapa foi realizada com um intervalo de 2 semanas. Os

níveis séricos de vitamina D₂ foram avaliados em 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72h após administração da vitamina D₂ com os alimentos. Não houve diferença significativa entre os níveis séricos de vitamina D₂ nos grupos, ao longo do tempo do estudo (p=0,87). O segundo experimento foi realizado no final do inverno, no mês de março, em Boston/EUA, com adultos saudáveis, com idade entre 20 e 60 anos, avaliando a biodisponibilidade de vitamina D₃ em suco de laranja. Os participantes foram randomizados em dois grupos, o grupo 1 recebeu suco de laranja contendo 1000UI de vitamina D₃/240ml e o grupo 2 recebeu suco de laranja puro. Os participantes foram orientados a consumir 1 copo (240ml) de suco de laranja por dia. A distribuição dos sucos e as dosagens séricas de 25(OH)D foram realizadas semanalmente, durante as 12 semanas do estudo. Os indivíduos que consumiram o suco de laranja fortificado com a vitamina D₃ tiveram um aumento de 150% nas concentrações de 25(OH)D no soro durante as 12 semanas ($14,8 \pm 3,2 - 37,6 \pm 8$ ng/ml, $p < 0,01$); indivíduos do grupo controle tiveram um aumento de 45% nas concentrações de 25(OH) D durante as 12 semanas do estudo ($20,0 \pm 4,0 - 29,2 \pm 3,2$ ng/ml, $p < 0,01$). O aumento médio de 25(OH)D no grupo que consumiu o suco de laranja fortificado com a vitamina D₃ foi de $22,8 \pm 2,8$ ng/ml, em comparação com um aumento médio de $9,0 \pm 2,0$ ng/ml no grupo controle ($P < 0,001$). Apesar da presumida síntese de vitamina D induzida pelo sol no grupo de controle, 25% dos indivíduos tinham insuficiência de vitamina D no final do estudo, enquanto nenhum dos indivíduos que ingeriram 1000 UI de vitamina D₃/dia tinha insuficiência de vitamina D. O estudo concluiu que o teor de gordura do leite não afeta a biodisponibilidade da vitamina D e que o suco de laranja fortificado com vitamina D é capaz de aumentar os níveis séricos de 25(OH)D₃ em adultos.

Biancuzzo e col. (59) compararam a biodisponibilidade de suco de laranja fortificado com vitamina D₂ e vitamina D₃ com o suplemento de vitamina D₂ e

vitamina D₃, através de ensaio clínico duplo cego, com adultos, com idade entre 18 e 79 anos, no mês de fevereiro em Boston/EUA. Os participantes foram randomizados em 5 grupos: 1) cápsula de placebo + suco de laranja; 2) cápsula de placebo + suco de laranja fortificado com 1000UI vitamina D₃/236,6 ml; 3) cápsula de placebo + suco de laranja fortificado com 1000UI vitamina D₂/236,6 ml; 4) 1000UI vitamina D₃ em cápsula + suco de laranja; 5) 1000UI vitamina D₃ em cápsula + suco de laranja. Todos os participantes consumiram 1 copo de suco de laranja (236,6 ml) por dia, durante as 11 semanas do estudo. Não há informações sobre a distribuição do suco de laranja, local de consumo e se foi associado com algum outro alimento no momento do consumo. A análise da área sob a curva não mostrou diferença significativa na 25(OH)D no soro entre indivíduos que consumiram suco de laranja fortificado com vitamina D e aqueles que consumiram suplementos de vitamina D ($p = 0,084$). Não houve diferença significativa na 25(OH)D₃ no soro entre indivíduos que consumiram suco de laranja fortificado com vitamina D₃ e os que consumiram cápsulas vitamina D₃ ($p > 0,1$). Da mesma forma, não houve diferença significativa na 25(OH)D₂ no soro entre indivíduos que consumiram suco de laranja fortificado com vitamina D₂ e os que consumiram cápsulas vitamina D₂ ($p > 0,1$). O estudo concluiu que a vitamina D₂ e vitamina D₃ são igualmente biodisponíveis em suco de laranja e cápsulas.

Biodisponibilidade de Vitamina D e Gordura

A biodisponibilidade de vitamina D₃ em queijos suplementados com diferentes teores de gordura também foi avaliada. Wagner e col. (60) realizaram um ensaio clínico com adultos saudáveis, com idade entre 18 e 60 anos. Os participantes foram randomizados em 6 grupos: 1) Queijo cheddar suplementado com vitamina D₃ (DC); 2)

queijo com pouca gordura suplementado com vitamina D₃ (DLF); 3) suplemento de vitamina D em solução de etanol, consumido com alimento (DS1); 4) suplemento de vitamina D consumido sem alimento (DS1); 5) queijo com pouca gordura, sem vitamina D; 6) solução de etanol sem vitamina D (placebo). Cada porção ou dose de vitamina D continha 28.000UI de vitamina D₃. Cada porção ou dose foi consumida por via oral uma vez por semana, durante 8 semanas. O estudo foi conduzido nos meses de janeiro a abril, meses de inverno, no Canadá. A composição nutricional das refeições e queijos utilizados no estudo e se os queijos foram consumidos com outros alimentos não foram informados. No grupo placebo, os níveis séricos iniciais de 25(OH)D [22,0±10,1ng/mL], reduziram durante as 8 semanas do estudo para 20,3 ± 9,7ng/mL (P =0,046). Nos grupos tratados com vitamina D, os aumentos médios nos níveis séricos de 25(OH)D durante as 8 semanas foram: 26,1±9,6ng/mL (DC), 26,0±8,68ng/mL (DLF), 23,7±9,3ng/mL (DS1) e 23,7±7,8ng/mL (DS1); estas alterações diferiram do grupo placebo (P<0,0001), mas não entre eles (p=0,62). Os resultados deste estudo demonstrou que a vitamina D é biodisponível no queijo cheddar, no queijo com pouca gordura, com ou sem alimento.

Johnson e col. (61) também avaliaram a biodisponibilidade de vitamina D em queijos processados fortificados. O estudo foi realizado em duas etapas. O primeiro experimento foi realizado com o objetivo de determinar o efeito do consumo diário de queijo fortificado com vitamina D₃, durante 2 meses, nos níveis séricos de 25(OH)D. Idosos, com mais de 60 anos, foram randomizados em 3 grupos: 1) 85g de queijo processado fortificado com vitamina D₃ (600UI/porção); 2) queijo processado sem vitamina D₃; 3) grupo controle, que não recebeu queijo processado. O queijo utilizado no estudo tinha 35,4% de gordura, aproximadamente 30g de gordura por porção. Os participantes foram instruídos a manterem suas atividades normais e dieta habitual

durante o estudo. Não foi informado como o queijo foi distribuído aos participantes, e se houve alguma orientação quanto ao consumo do queijo com ou sem outros alimentos. Após os dois meses de intervenção, o grupo que recebeu o queijo não fortificado apresentou um aumento nos níveis séricos de 25(OH)D de $1,4 \pm 0,5 \text{ ng/mL}$ ($p=0,01$), o grupo do queijo fortificado com vitamina D apresentou uma inesperada redução dos níveis séricos de 25(OH)D de $2,4 \pm 0,8 \text{ ng/mL}$ e o grupo que não recebeu queijo apresentou uma variação não significativa, quando comparado ao nível de 25(OH)D no soro no início do estudo. O segundo experimento foi realizado, baseado nos resultados da primeira etapa, para determinar a biodisponibilidade e absorção de vitamina D₂ em queijos processados e em água. A vitamina D₂ foi escolhida para este experimento para evitar interferência da exposição solar nos resultados. Foi realizado um ensaio clínico randomizado cruzado com idosos e adultos jovens. Todos os participantes receberam 10.000UI de vitamina D₂ em água (240ml) ou queijo (57g), contendo aproximadamente 20g de gordura por porção. A média total do pico de concentração sérica de vitamina D₂ de queijo processado foi de $15,0 \pm 1,0 \text{ ng/mL}$ por 10.000 UI, e na água fortificada com vitamina D₂ foi significativamente inferior, $2,0 \pm 0,4 \text{ ng/mL}$ /10.000UI vitamina D₂ ($p < 0,001$). A área sob a curva para o queijo processado foi de $89,0 \pm 7,0 \text{ ng/mL}$, maior do que a observada para água fortificada com vitamina D₂ ($63,0 \pm 2,0 \text{ ng/mL}$, $p=0,03$). As concentrações máximas de vitamina D₂ sérica e a média da área sob a curva para a absorção de vitamina D₂, tanto no queijo processado quanto na água foram semelhantes entre os idosos e adultos jovens. Este estudo demonstrou que a vitamina D é biodisponível no queijo processado fortificado com vitamina D₂, e que os adultos jovens e idosos têm absorção similar. Em idosos, 600 UI de vitamina D₃/dia em queijo fortificado, por 2 meses não foi suficiente para aumentar a concentração sérica de 25(OH)D durante a exposição solar limitada.

A absorção do suplemento de vitamina D conforme a quantidade de gordura da refeição associada foi avaliada por Raimundo e col.(62), a partir dos níveis séricos de 25-hidroxivitamina D, após ingestão oral de colecalciferol com refeições contendo pouca ou muita quantidade de gordura. Foi realizado um ensaio clínico randomizado simples cego com 32 médicos residentes saudáveis, com idade entre 25 e 32 anos. Todos os participantes receberam uma dose única oral de 50.000UI de colecalciferol com refeições contendo: Grupo 1 (G1) - 472 calorias (carboidratos:43,3g; proteínas:17,2g; lipídios:25,6g) e Grupo 2 (G2) - 465kcal (carboidratos: 95,5g; proteínas:16,8g; lipídios:1,7g). Os níveis séricos de 25(OH)D foram dosados nos dias 0, 7 e 14. Os níveis séricos basais de 25(OH)D foram $17,1 \pm 7,6$ ng/mL no G1 e $14,6 \pm 7,6$ ng/mL no G2 ($p=0.38$). Após administração de colecalciferol, a média dos níveis séricos de 25(OH)D foi maior no G1 ($p<0,001$): 7 dias - G1= $18,5 \pm 5,6$ ng/mL e G2= $13,3 \pm 6,1$ ng/mL; 14 dias - G1= $21,5 \pm 6,2$ ng/mL e G2= $13,5 \pm 6,7$ ng/mL. O estudo concluiu que uma refeição rica em gordura provavelmente aumenta a absorção de vitamina D₃, quando avaliado através dos níveis séricos de 25(OH)D, em adultos jovens.

Biodisponibilidade de Excipientes de Vitamina D

Holmberg e col. avaliaram a absorção de suplemento de vitamina D em dois tipos diferentes de veículos oleosos, óleo de amendoim e triglicerídeo de cadeia média (TCM). O óleo de amendoim é rico em ácidos graxos de cadeia longa. Indivíduos saudáveis, com idade entre 23 e 45 anos foram divididos em 4 grupos: Grupo A - 20.000UI de vitamina D₃ em óleo de amendoim, com água e refeição padronizada após 4h; Grupo B - 20.000UI de vitamina D₃ em TCM, com água e refeição padronizada após 4h; Grupo C - 20.000UI de vitamina D₃ em óleo de amendoim, com refeição

padronizada; Grupo D - 20.000UI de vitamina D₃ em TCM, com refeição padronizada. Amostras de sangue foram coletadas em 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12h, e 1, 2, 7, 14 e 28 dias após administração do suplemento. O pico médio da vitamina D sérica no grupo B (15,6±4,4 ng/ml) foi significativamente menor quando comparado aos grupo A (46,5±10.8 ng/ml), grupo C (39,2±15,2 ng/ml) e grupo D (47,2±21,2 ng/ml) (p<0,05). A área sob a curva também foi menor no grupo B (p<0,05). Os níveis de 25(OH)D foram maiores após 28 dias, quando comparados aos basal, no entanto não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Os resultados indicaram que a presença de ácidos graxos de cadeia longa facilitam a absorção da vitamina D₃ em jejum (63).

A biodisponibilidade de vitamina D foi avaliada em excipientes oleoso e não oleoso, por Coelho e col. (64) em ensaio clínico aberto, aleatório e cruzado com mulheres de 20 a 75 anos, com baixa exposição solar. As intervenções foram: 1) Dose oral única de 13.200UI de vitamina D₃ de suplemento em gotas, em excipiente oleoso – óleo de amendoim; 2) Dose oral única de 13.200UI de vitamina D₃ em cápsula manipulada em excipiente não oleoso – lactose. O intervalo entre as duas intervenções foi de 90 dias. As amostras foram coletadas em jejum e 4, 8, 12 e 24 horas após a administração de cápsulas e de gotas oleosas. Não foi informado se houve alguma recomendação ou controle sobre as refeições próximas ou associadas com a suplementação da intervenção do estudo. A concentração máxima da 25(OH)D e a área sob a curva não apresentaram diferenças significativas entre os dois tipos de suplementos utilizados e o estudo concluiu que os dois tipos de veículos são bioequivalentes.

Tabela 1: Biodisponibilidade de vitamina D sob a forma de suplementos e em alimentos fortificados

Estudo (Referência)	População (n)	Idade (anos)	Dose de Vitamina D	Observações sobre alimentos ou veículos adicionados ao suplemento	Ensaio	Tempo das dosagens de Vit D
Raimundo e col. Int J Endocrinol, 2011 (61)	Adultos n=30	25-32	Dose oral única 50.000 UI Vit D ₃ + Refeição com 1,7g gordura (n=15) 50.000 UI Vit D ₃ + Refeição com 25,6g gordura (n=15)	Todos participantes estavam em jejum e consumiram apenas a refeição do estudo	RIA 25(OH)D	0,7 e 14 dias
Urbain e col. Eur J Clin Nutr, 2011 (40)	Adultos n=27	≤45	Dose Semanal – 4 semanas Cogumelo irradiado com UVB (n=8) Suplemento Vit D ₂ – 28.000 UI (n=9) Placebo (n=9)	Composição nutricional da sopa de cogumelos: 4,2% de gordura, 0,8% de proteínas e 2,9% de carboidratos	RIA 25(OH)D	Semanal (0 e 2)
Biancuzzo e col. Am J Clin Nutr, 2010 (58)	Adultos n=105	18-84	Dose oral/dia 1.000 UI Vit D ₂ no suco de laranja (n=17) 1.000 UI vit D ₂ em cápsula (n=16) 1.000 UI vit D ₃ no suco de laranja (n=18) 1.000 UI vit D ₃ em cápsula (n=20)	Todos os participantes beberam o suco pela manhã e ingeriram a cápsula à noite	HPLC 25(OH)D	Semanal (0-11)
Coelho e col. Arq Bras Endocrinol Metab. 2010(62)	Freiras n=18	20-75	Dose oral única 13.200 UI Vit A e 66.000 UI vit D ₃ em 3ml de óleo de amendoim (n=18) 13.200 UI vit A e 66.000 IU vit D ₃ em excipiente lactose (n=18)	*óleo de amendoim: 3g de gordura * excipiente lactose: 0g de gordura	RIA 25(OH)D	0, 4, 8, 12 e 24h
Wagner e col. J Nutr. 2008 (59)	Adultos n=80	18-60	Dose oral semanal de 28.000 UI vit D ₃ em: 33,6g/dia Queijo Cheddar (n=20) 41.4g/dia Queijo magro(n=10) Suplemento com alimento (n=20) Suplemento sem alimento (n=10) Placebo (n=20)	*Queijo Cheddar: 11g de gordura * Queijo magro: 3g de gordura Alimento: não foi informada a composição nutricional	RIA 25(OH)D	0, 2, 4, 6 e 8 semanas
Holvik e col.Br J Nutr. 2007 (65)	Adultos n=55	19-49	Dose oral diária de 400 UI vit D ₃ em: Multivitamínico (n=28) Cápsulas óleo de peixe (n=27)	Todos os participantes foram orientados a ingerir o multivitamínico ou a cápsula com 1 copo de água	RIA 25(OH)D	0 e 28 dias
Natri e col.J Nutr. 2006 (56)	Mulheres n=41	25–45	Dose oral diária de 400 UI vit D ₃ em: 85g Pão de trigo Fortificado (n=10) 85g Pão de centeio fortificado (n=10) Suplemento de vit D (n=11) Controles (n=9)	Não informado	RIA 25(OH)D	0 e 3 semanas

Estudo (Referência)	População (n)	Idade (anos)	Dose de Vitamina D	Observações sobre alimentos ou veículos adicionados ao suplemento	Ensaio	Tempo das dosagens de Vit D
Johnson e col. J Dairy Sci.2005 (60)	Adultos n=8	23-84	Dose oral única 10.000 UI vit D ₂ em água (n=8) 10.000 UI vit D ₂ no queijo (n=8)	*queijo:~20g gordura	RIA Vit D ₂	0, 6, 12 e 24 horas
Tangpricha e col Am J Clin Nutr, 2003 (57)	Adultos n=18	19-68	Dose oral única de 25.000 IU vit D ₂ em alimentos fortificados: 240ml leite integral (n=18) 240ml leite desnatado(n=18) 0,1ml óleo em torrada (n=18)	* leite integral: 8,4g gordura * leite desnatado: 2,4g gordura * óleo em torrada:? gordura	CBPA VitD ₂	0, 2, 4, 8, 12, 48 e 72h
Harris e col. J Am Coll Nutr. 2002(55)	Homens n=50	Jovens: 18-35 Idosos: 62-79	Dose oral diária de 800 UI vit D ₃ em: Jovens (n=13) Idosos (n=14) Controle - jovens (n=12) Controle - idosos (n=11)	Não informado	HPLC Vit D ₃ e CBPA 25(OH)D	0, 4, 6 e 8 semanas
Harris e col. J Am Coll Nutr. 1999 (54)	Homens n=18	Jovens: 22-28 Idosos: 65-73	Dose oral diária de 1800 UI vit D ₂ em: Jovens (n=6) Idosos (n=5) Controle - jovens (n=3) Controle - idosos (n=4)	Todos os participantes tomaram o suplemento durante a manhã com adição de alimento	HPLC Vit D ₂ and Vit D ₃	0, 1, 2 e 3 semanas
Outila e col. Am J Clin Nutr. 1999 (41)	Mulheres n=31	Grupo I: 25±2 Grupo II:29±4 Controle: 29±3	Dose oral diária de 560 UI vit D ₂ em: Grupo I: Cogumelos (n=9) Grupo II: Suplemento (n=9) Controle (n=9)	Todos os participantes tomaram o cogumelo ou o suplemento com o almoço	CBPA 25(OH)D	0 e 3 semanas
Holmberg e col. Biopharm Drug Dispos. 1990(63)	Adultos n=24	23-45	Dose oral única de 20.000UI Vit D ₃ em: Óleo de amendoim sem alimento (n=6) TCM sem alimento (n=6) Óleo de amendoim com alimento (n=6) TCM com alimento (n=6)	Sem alimento: refeição padrão após 4h da administração do suplemento Com alimento: refeição padrão com vit D Quantidade de gordura da refeição padrão: não especificada	HPLC 25(OH)D e Vit D ₃	0,2,4,6,8,10 e 12h, e 1,2,7,14 e 28 dias
Barragry e col. Clin Sci Mol Med.1978(54)	Adultos e idosos n=42	Adultos: 30-58 Idosos:68-96	Dose Oral única de 95UI de vit D ₃ com refeição Adultos (n=22) Mulheres idosas (n=20)	Refeição padronizada: 30g de gordura	CBPA 25(OH)D e Vit D ₃	Vit D ₃ 0,1,2,3,4,5,6h 25(OH)D 28 a 56 dias

* Valor estimado; NI: Não informado; CBPA: *competitive protein-binding assay*; RIA: radioimunoensaio; HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Pressão; Vit: vitamina; TCM: Triglicerídeo de Cadeia Média

DISCUSSÃO

A partir dos 14 ensaios clínicos apresentados nesta revisão sistemática da literatura, observou-se que os estudos sobre biodisponibilidade de vitamina D avaliaram aspectos diversos, mas de grande importância dentro de cada contexto. A suplementação de vitamina D pode ser realizada a partir de suplementos dietéticos (15) ou de alimentos fortificados (45) com ergocalciferol ou colecalciferol, justificando a existência de estudos que avaliam a biodisponibilidade de vitamina D nestes dois cenários.

Os estudos de Harris e col. (55, 56) apresentaram resultados distintos quanto à biodisponibilidade de vitamina D em jovens e idosos. Esta variação pode ser explicada em parte pelas metodologias distintas, em termos de doses de suplementação e de tipo de vitamina D, pois estudos que avaliaram a equivalência do colecalciferol e ergocalciferol ainda são controversos (65). Além disso, o primeiro estudo recomendou que os participantes consumissem os suplementos com alimentos, mas não controlou a composição nutricional do alimento associado ao suplemento e o segundo estudo não recomendou a ingestão do suplemento com ou sem alimento e não avaliou se os participantes administraram o suplemento com alimento, água ou em jejum.

Os estudos que avaliaram a biodisponibilidade de vitamina D em cogumelos demonstraram que cogumelos liofilizados (41) ou cogumelos irradiados com UVB (40), assim como o pão de trigo e de centeio (57) e suco de laranja fortificados com vitamina D (58, 59) são uma opção viável para fortificação de alimentos, equivalente aos suplementos. Para abordar o problema de deficiência de vitamina D na população em geral, muitos países optam por fortificação obrigatória ou voluntária de alimentos (25,

66, 67). Alimentos fortificados, como leite, iogurte, manteiga, margarina, queijo, suco de laranja, pão e cereais matinais constituem a maior fonte de vitamina D nos Estados Unidos (68).

A comparação entre a biodisponibilidade de vitamina D₂ em leite integral, leite desnatado e pão torrado com 0,1ml de óleo de milho, sem diferença de níveis médios de vitamina D₂ no soro, sugeriu que a absorção de vitamina D é independente da sua administração com a gordura e incentivou a investigação da biodisponibilidade de vitamina D em suco de laranja (58). No entanto a comparação do suco de laranja puro com o suco de laranja contendo vitamina D não nos permite avaliar a biodisponibilidade do suplemento de vitamina D no suco de laranja, apenas verificamos que o suco fortificado aumentou os níveis séricos em comparação com um placebo. Além disso, o suco de laranja foi consumido na casa dos participantes e não houve orientação sobre como consumir o suco, com ou sem alimento, ou avaliação de como foi consumido e a composição nutricional das refeições associadas ao suco de laranja, se pertinente. Esta mesma limitação ocorreu no estudo conduzido por Biancuzzo e col.(59), ao avaliar a biodisponibilidade de vitamina D₂ e vitamina D₃ em suco de laranja.

Apesar da vitamina D ser lipossolúvel, poucos estudos avaliaram o efeito da gordura na sua absorção. O estudo que avaliou a biodisponibilidade de vitamina D em queijos, comparando um queijo com baixo teor de gordura (~ 3 g de gordura/porção) com outro queijo com alto teor de gordura (~ 11g de de gordura/porção), ambos enriquecidos com 28.000IU de vitamina D, ou a mesma quantidade de vitamina D dissolvida em etanol, com ou sem alimentos, encontrou médias semelhantes e maiores de 25(OH)D no soro em todos os grupos tratados com vitamina D, quando comparadas ao placebo (60). No entanto, não foi informado se os queijos e suplementos foram ingeridos com outros alimentos, cuja composição nutricional pode ter interferido nos

resultados, tendo em vista que o estudo durou 8 semanas e as doses eram semanais. Em outro estudo, os níveis médios séricos de vitamina D₂ foram maiores em adultos jovens e mais velhos quando a vitamina D foi ingerida com queijo (~ 20g de gordura/porção) quando comparado com vitamina D diluída em água (61), assim como o resultado encontrado no estudo realizado por Raimundo e col.(62), no qual a média de 25(OH)D no soro foi mais elevada em indivíduos que receberam dose oral única de 50.000UI de vitamina D₃ com refeição contendo 25g de gordura em comparação ao grupo que recebeu refeição contendo 1,7g de gordura. Os resultados destes dois últimos estudos sugerem que os alimentos gordurosos facilitam a absorção da vitamina D. A quantidade de gordura fornecida nos estudos que não encontraram diferença entre os níveis séricos de vitamina D era menor que a quantidade utilizada nos estudos com diferenças significativas nos níveis séricos de 25(OH)D.

A quantidade de gordura utilizada no excipiente de uma cápsula ou em algumas gotas de suplementos de vitamina D pode não ser suficiente para alterar a absorção da vitamina. Estudo conduzido por Coelho e col.(64), avaliou os níveis séricos somente nas primeiras 24 horas após administração do suplemento. No entanto, os níveis séricos de 25(OH)D geralmente apresentam mudanças em longo prazo, após 7 ou 14 dias, como observado em outros estudos de suplementação de vitamina D, pois dependem da hidroxilação hepática para se tornar disponível na circulação sob a forma de 25(OH)D (34, 39, 69).

Além da quantidade de gordura, é possível que o tipo de gordura associada ao suplemento também tenha influência sobre a biodisponibilidade da vitamina D. Holmberg e col. avaliaram a absorção do colecalciferol em dois veículos oleosos e encontraram resultados divergentes quando os indivíduos recebiam ou não refeição associada ao alimento. Na ausência de alimentos, o óleo de amendoim, utilizado como

veículo, apresentou um melhor desempenho na área sob a curva e na média de pico dos níveis sérico de vitamina D, quando comparado ao TCM. Em contrapartida, na presença de alimentos, o suplemento de vitamina D com TCM apresentou desempenho similar ao óleo de amendoim (63). Este estudo é condizente com o que se estima sobre a necessidade de formação de micelas para absorção da vitamina D, pois na absorção intestinal, o TCM atravessa livremente a membrana dos enterócitos, enquanto os ácidos graxos de cadeia longa necessitam ser emulsificados, com auxílio dos ácidos biliares, para formar micelas e então serem absorvidos (70).

A maioria dos estudos revisados apresentou limitações para avaliação da biodisponibilidade e absorção intestinal de vitamina D. Estudos que avaliaram a absorção intestinal de vitamina D de forma direta, até os dias de hoje, são experimentais e em animais (71). Assim como ocorre com a farmacocinética da maioria das drogas (47), os alimentos podem aumentar, diminuir ou retardar a absorção dos suplementos de vitamina D.

CONCLUSÃO

Fatores biológicos individuais, como a idade, e fatores associados aos alimentos ingeridos com os suplementos dietéticos ou sob a forma de alimentos fortificados podem alterar a biodisponibilidade e absorção intestinal de vitamina D. Até o presente momento, os estudos que avaliaram a biodisponibilidade de suplementos de vitamina D associados com diferentes alimentos, em humanos, ainda apresentam resultados controversos. Novos ensaios clínicos randomizados são necessários para a definição de

fatores, tais como a gordura e a presença ou não de alimentos, que possam otimizar a absorção da vitamina D.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Questão de Pesquisa

Níveis séricos de 25-hidroxivitamina D variam conforme o teor de gordura da refeição associada à ingestão do suplemento de vitamina D₃?

3.2 Estratégias para Responder à questão de pesquisa

Realização de um ensaio clínico randomizado, controlado, duplo cego para avaliar a 25(OH)D, no soro, após uma intervenção alocada por randomização e grupo placebo. A intervenção com diferentes quantidades de gordura, em refeições isocalóricas, nos permitirá apontar a quantidade ideal de gordura para otimizar a absorção do suplemento. Os participantes, médicos residentes, são uma população com deficiência de vitamina D, principalmente por permanecerem por longos períodos em locais fechados, sem exposição solar (72). O desfecho, a 25(OH)D, é o metabólito padrão-ouro para avaliação do estado nutricional da vitamina D, apesar de não ser o metabólito ativo (73). O grupo controle permitirá verificar se houve alguma alteração devido aos índices UVB (exposição solar) que podem estimular síntese cutânea de vitamina D durante a realização do estudo. Este projeto de pesquisa corresponde aos padrões do CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials).

4. JUSTIFICATIVA

O suplemento dietético é uma opção para prevenir e tratar a deficiência de vitamina D, tendo em vista a dificuldade de obtenção através da síntese cutânea por irradiação UVB ou alimentação. Sendo a vitamina D uma substância lipossolúvel, estima-se que sua biodisponibilidade pode variar conforme o teor de gordura da refeição realizada no momento da administração do suplemento. Um estudo piloto realizado com 30 adultos jovens saudáveis mostrou níveis séricos de 25(OH)D mais altos quando o suplemento de colecalciferol foi administrado com uma refeição contendo mais gordura. Portanto, é importante um novo estudo para avaliar diferentes teores de gordura da refeição associada ao suplemento de vitamina D, juntamente com a participação de um grupo controle para eventuais alterações provenientes da exposição solar. Este novo trabalho fornecerá subsídios para orientações quanto à quantidade de gordura necessária para a máxima absorção do suplemento de vitamina D, otimizando e reduzindo custos do tratamento.

5. OBJETIVO

Avaliar níveis séricos de 25(OH)D após dose oral única de 50.000UI de vitamina D₃ (colecalciferol) associado a três tipos de refeições com diferentes quantidades de gordura.

6. REFERÊNCIAS

1. Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int.* 2009;20(11):1807-20. Epub 2009 Jun 19.
2. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357(3):266-81.
3. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. *Mol Aspects Med.* 2008;29(6):361-8. Epub 2008 Sep 2.
4. Kalyani RR, Stein B, Valiyil R, Manno R, Maynard JW, Crews DC. Vitamin D treatment for the prevention of falls in older adults: systematic review and meta-analysis. *J Am Geriatr Soc.* 58. United States 2010. p. 1299-310.
5. Murad MH, Elamin KB, Abu Elnour NO, Elamin MB, Alkatib AA, Fatourechi MM, et al. Clinical review: The effect of vitamin D on falls: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 96. United States 2011. p. 2997-3006.
6. Mattila P, Piironen V, Haapala R, Hirvi T, Uusi-Rauva E. Possible Factors Responsible for the High Variation in the Cholecalciferol Contents of Fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1997;45(10):3891-6.
7. Devlin TM. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas.* 1st ed. São Paulo: Edgar Blucher; 2003. 1007 p.
8. Lehmann B. Role of the vitamin D3 pathway in healthy and diseased skin--facts, contradictions and hypotheses. *Exp Dermatol.* 2009 Feb;18(2):97-108. PubMed PMID: 19146580. eng.

9. Rapuri P, Kinyamu H, Gallagher J, Haynatzka V. Seasonal changes in calciotropic hormones, bone markers, and bone mineral density in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 May;87(5):2024-32. PubMed PMID: 11994336. eng.
10. Holick M, Chen T, Lu Z, Sauter E. Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res.* 2007 Dec;22 Suppl 2:V28-33. PubMed PMID: 18290718. eng.
11. Raimundo F, Bueno A, Moulin C, Czepielewski M. Seasonal Variation of 25-Hydroxyvitamin D Serum Levels and Vitamin D Dietary Intake in Short Stature Children and Adolescents. *Revista HCPA.* 2010;30(3):209-13.
12. Holick M. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc.* 2006 Mar;81(3):353-73. PubMed PMID: 16529140. eng.
13. Haussler M, Haussler C, Bartik L, Whitfield G, Hsieh J, Slater S, et al. Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutr Rev.* 2008 Oct;66(10 Suppl 2):S98-112. PubMed PMID: 18844852. eng.
14. Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev.* 2008;66(10 Suppl 2):S182-94.
15. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jul;96(7):1911-30. PubMed PMID: 21646368. eng.
16. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(1):18-28.
17. Dawson-Hughes B, Heaney R, Holick M, Lips P, Meunier P, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int.* 2005 Jul;16(7):713-6. PubMed PMID: 15776217. eng.

18. Lips P. Worldwide status of vitamin D nutrition. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 Jul;121(1-2):297-300. PubMed PMID: 20197091. eng.
19. McKenna MJ. Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly. *Am J Med*. 1992;93(1):69-77.
20. Bueno AL, Czepielewski MA, Raimundo FV. Calcium and vitamin D intake and biochemical tests in short-stature children and adolescents. *Eur J Clin Nutr*. 2010.
21. Premaor MO, Paludo P, Manica D, Paludo AP, Rossatto ER, Scalco R, et al. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of a general hospital in southern Brazil. *J Endocrinol Invest*. 2008;31(11):991-5.
22. Scalco R, Premaor M, Fröhlich P, Furlanetto T. High prevalence of hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in elders living in nonprofit homes in South Brazil. *Endocrine*. 2008 Feb;33(1):95-100. PubMed PMID: 18401764. eng.
23. Chen TC, Chimeh F, Lu Z, Mathieu J, Person KS, Zhang A, et al. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys*. 2007;460(2):213-7. Epub 2007 Jan 8.
24. Roberts JS, Teichert A, McHugh TH. Vitamin D₂ formation from post-harvest UV-B treatment of mushrooms (*Agaricus bisporus*) and retention during storage. *J Agric Food Chem*. 2008;56(12):4541-4. Epub 2008 Jun 4.
25. Vatanparast H, Calvo M, Green T, Whiting S. Despite mandatory fortification of staple foods, vitamin D intakes of Canadian children and adults are inadequate. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 Jul;121(1-2):301-3. PubMed PMID: 20399268. eng.
26. Calvo M, Whiting S, Barton C. Vitamin D fortification in the United States and Canada: current status and data needs. *Am J Clin Nutr*. 2004 Dec;80(6 Suppl):1710S-6S. PubMed PMID: 15585792. eng.

27. Whiting S, Green T, Calvo M. Vitamin D intakes in North America and Asia-Pacific countries are not sufficient to prevent vitamin D insufficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 Mar;103(3-5):626-30. PubMed PMID: 17218094. eng.
28. Yin AY, Htun M, Swerdloff RS, Diaz-Arjonilla M, Dudley RE, Faulkner S, et al. Reexamination of pharmacokinetics of oral testosterone undecanoate in hypogonadal men with a new self-emulsifying formulation. *J Androl.* 33. United States 2012. p. 190-201.
29. Stechschulte SA, Kirsner RS, Federman DG. Vitamin D: bone and beyond, rationale and recommendations for supplementation. *Am J Med.* 2009;122(9):793-802.
30. Aloia JF. Clinical Review: The 2011 report on dietary reference intake for vitamin D: where do we go from here? *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;96(10):2987-96. PubMed PMID: 21795456. eng.
31. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D: what dietetics practitioners need to know. *J Am Diet Assoc.* 2011 Apr;111(4):524-7. PubMed PMID: 21443983. eng.
32. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jan;96(1):53-8. PubMed PMID: 21118827. Pubmed Central PMCID: PMC3046611. eng.
33. Vieth R. Implications for 25-hydroxyvitamin D testing of public health policies about the benefits and risks of vitamin D fortification and supplementation. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012 Apr;243:144-53. PubMed PMID: 22536776. eng.

34. Ilahi M, Armas LA, Heaney RP. Pharmacokinetics of a single, large dose of cholecalciferol. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(3):688-91.
35. Wortsman J, Matsuoka L, Chen T, Lu Z, Holick M. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000 Sep;72(3):690-3. PubMed PMID: 10966885. eng.
36. Blum M, Dallal G, Dawson-Hughes B. Body size and serum 25 hydroxy vitamin D response to oral supplements in healthy older adults. *J Am Coll Nutr.* 2008 Apr;27(2):274-9. PubMed PMID: 18689559. Pubmed Central PMCID: PMC2729752. eng.
37. Borges M, Martini L, Rogero M. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. *Nutrition.* 2010 Oct. PubMed PMID: 20971616. ENG.
38. Holick M. Vitamin D: Evolutionary, Physiological and Health Perspectives. *Curr Drug Targets.* 2010 Aug. PubMed PMID: 20795941. ENG.
39. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol.* 2009;19(2):73-8. Epub 2008 Mar 10.
40. Urbain P, Singler F, Ihorst G, Biesalski HK, Bertz H. Bioavailability of vitamin D₂ from UV-B-irradiated button mushrooms in healthy adults deficient in serum 25-hydroxyvitamin D: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2011 Aug;65(8):965-71. PubMed PMID: 21540874. eng.
41. Outila T, Mattila P, Piironen V, Lamberg-Allardt C. Bioavailability of vitamin D from wild edible mushrooms (*Cantharellus tubaeformis*) as measured with a human bioassay. *Am J Clin Nutr.* 1999 Jan;69(1):95-8. PubMed PMID: 9925129. eng.
42. Kristensen HL, Rosenqvist E, Jakobsen J. Increase of vitamin D(2) by UV-B exposure during the growth phase of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food*

Nutr Res. 2012;56. PubMed PMID: 22489222. Pubmed Central PMCID: PMC3321259.
eng.

43. Casey CF, Slawson DC, Neal LR. Vitamin D supplementation in infants, children, and adolescents. *Am Fam Physician*. 2010;81(6):745-8.

44. O'Mahony L, Stepien M, Gibney MJ, Nugent AP, Brennan L. The potential role of vitamin D enhanced foods in improving vitamin D status. *Nutrients*. 3. Switzerland2011. p. 1023-41.

45. Black LJ, Seamans KM, Cashman KD, Kiely M. An updated systematic review and meta-analysis of the efficacy of vitamin D food fortification. *J Nutr*. 142. United States2012. p. 1102-8.

46. Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol*. 2011 Mar;91(2):115-24. PubMed PMID: 21384086. Epub 2011/03/09. eng.

47. Custodio JM, Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev*. 60. Netherlands2008. p. 717-33.

48. Schmidt LE, Dalhoff K. Food-drug interactions. *Drugs*. 62. New Zealand2002. p. 1481-502.

49. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Rheum Dis Clin North Am*. 38. United States: 2012 Elsevier Inc; 2012. p. 1-11, vii.

50. Lo CW, Paris PW, Clemens TL, Nolan J, Holick MF. Vitamin D absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes. *Am J Clin Nutr*. 1985 Oct;42(4):644-9. PubMed PMID: 4050723. Epub 1985/10/01. eng.

51. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med*. 2009 Jul

21;6(7):e1000097. PubMed PMID: 19621072. Pubmed Central PMCID: PMC2707599. Epub 2009/07/22. eng.

52. van den Berg H. Bioavailability of vitamin D. *Eur J Clin Nutr.* 1997 Jan;51 Suppl 1:S76-9. PubMed PMID: 9023488. eng.

53. Grossmann RE, Tangpricha V. Evaluation of vehicle substances on vitamin D bioavailability: a systematic review. *Mol Nutr Food Res.* 2010 Aug;54(8):1055-61. PubMed PMID: 20425758. Pubmed Central PMCID: PMC3033429. eng.

54. Barragry JM, France MW, Corless D, Gupta SP, Switala S, Boucher BJ, et al. Intestinal cholecalciferol absorption in the elderly and in younger adults. *Clin Sci Mol Med.* 1978 Aug;55(2):213-20. PubMed PMID: 209929. eng.

55. Harris S, Dawson-Hughes B, Perrone G. Plasma 25-hydroxyvitamin D responses of younger and older men to three weeks of supplementation with 1800 IU/day of vitamin D. *J Am Coll Nutr.* 1999 Oct;18(5):470-4. PubMed PMID: 10511329. eng.

56. Harris S, Dawson-Hughes B. Plasma vitamin D and 25OHD responses of young and old men to supplementation with vitamin D3. *J Am Coll Nutr.* 2002 Aug;21(4):357-62. PubMed PMID: 12166534. eng.

57. Natri AM, Salo P, Vikstedt T, Palssa A, Huttunen M, Karkkainen MU, et al. Bread fortified with cholecalciferol increases the serum 25-hydroxyvitamin D concentration in women as effectively as a cholecalciferol supplement. *J Nutr.* 2006;136(1):123-7.

58. Tangpricha V, Koutkia P, Rieke SM, Chen TC, Perez AA, Holick MF. Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(6):1478-83.

59. Biancuzzo R, Young A, Bibuld D, Cai M, Winter M, Klein E, et al. Fortification of orange juice with vitamin D(2) or vitamin D(3) is as effective as an oral supplement

in maintaining vitamin D status in adults. *Am J Clin Nutr.* 2010 Jun;91(6):1621-6. PubMed PMID: 20427729. Pubmed Central PMCID: PMC2869510. eng.

60. Wagner D, Sidhom G, Whiting SJ, Rousseau D, Vieth R. The bioavailability of vitamin D from fortified cheeses and supplements is equivalent in adults. *J Nutr.* 2008;138(7):1365-71.

61. Johnson JL, Mistry VV, Vukovich MD, Hogue-Lorenzen T, Hollis BW, Specker BL. Bioavailability of vitamin D from fortified process cheese and effects on vitamin D status in the elderly. *J Dairy Sci.* 2005;88(7):2295-301.

62. Raimundo FV, Faulhaber GA, Menegatti PK, Marques LaS, Furlanetto TW. Effect of High- versus Low-Fat Meal on Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels after a Single Oral Dose of Vitamin D: A Single-Blind, Parallel, Randomized Trial. *Int J Endocrinol.* 2011;2011:809069. PubMed PMID: 22190928. Pubmed Central PMCID: PMC3235461. eng.

63. Holmberg I, Aksnes L, Berlin T, Lindbäck B, Zemgals J, Lindeke B. Absorption of a pharmacological dose of vitamin D₃ from two different lipid vehicles in man: comparison of peanut oil and a medium chain triglyceride. *Biopharm Drug Dispos.* 1990 Dec;11(9):807-15. PubMed PMID: 2176898. eng.

64. Coelho IM, Andrade LD, Saldanha L, Diniz ET, Griz L, Bandeira F. Bioavailability of vitamin D₃ in non-oily capsules: the role of formulated compounds and implications for intermittent replacement. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010;54(2):239-43.

65. Heaney RP, Recker RR, Grote J, Horst RL, Armas LA. Vitamin D(3) is more potent than vitamin D(2) in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 96. United States 2011. p. E447-52.

66. Calvo MS, Whiting SJ. Public health strategies to overcome barriers to optimal vitamin D status in populations with special needs. *J Nutr.* 136. United States 2006. p. 1135-9.
67. Lamberg-Allardt C. Vitamin D in foods and as supplements. *Prog Biophys Mol Biol.* 92. England 2006. p. 33-8.
68. Calvo MS, Whiting SJ, Barton CN. Vitamin D intake: a global perspective of current status. *J Nutr.* 135. United States 2005. p. 310-6.
69. Bacon CJ, Gamble GD, Horne AM, Scott MA, Reid IR. High-dose oral vitamin D3 supplementation in the elderly. *Osteoporos Int.* 2009 Aug;20(8):1407-15. PubMed PMID: 19101755. eng.
70. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(6):E1183-94. Epub 2009 Jan 21.
71. Reboul E, Goncalves A, Comera C, Bott R, Nowicki M, Landrier JF, et al. Vitamin D intestinal absorption is not a simple passive diffusion: evidences for involvement of cholesterol transporters. *Mol Nutr Food Res.* 2011 May;55(5):691-702. PubMed PMID: 21280209. eng.
72. Maeda SS, Kunii IS, Hayashi L, Lazaretti-Castro M. The effect of sun exposure on 25-hydroxyvitamin D concentrations in young healthy subjects living in the city of Sao Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(12):1653-9. Epub 2007 Oct 29.
73. Zerwekh J. Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr.* 2008 Apr;87(4):1087S-91S. PubMed PMID: 18400739. eng.

7. ARTIGO

Effect of Fat on Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels after a Single Oral Dose of Vitamin D: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Study

Authors: Fabiana Viegas Raimundo¹, Maria Augusta Lang², Luciano Scopel², Natalia Marcondes², Mirna Anocibar³, Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber² and Tania Weber Furlanetto^{1,2}

1 Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

2 Serviço de Medicina Interna/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

3 Faculdade de Medicina: Graduação em Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Funding: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil and Conselho Nacional de Pesquisas CNPq, Brazil

Corresponding Author:

Tania Weber Furlanetto

Rua Ramiro Barcelos 2350/700; Zip code: 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone/Fax: 55 51 3359-8152

e-mail: taniafurlanetto@gmail.com; tfurlanetto@hcpa.ufrgs.br

ClinicalTrials.gov: NCT01519986

Abstract

Background: Vitamin D supplements are useful to prevent and treat vitamin D deficiency. As this molecule is hydrophobic its oral absorption could vary according to the fat content of the meal it is consumed with, although there is no evidence to recommend its ingestion with food.

Objective: To evaluate serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels after the oral intake of a single dose of cholecalciferol, during meals containing three different amounts of fat, or placebo.

Subjects and Methods: A double-blind placebo controlled trial included sixty-four healthy medical residents of a university hospital in Porto Alegre, latitude 30⁰, Brazil, divided in four groups. Three groups received 50,000 IU of cholecalciferol during meals containing 0g [Group 1 (G1)], 15g [Group 2 (G2)] or 30g [Group 3(G3)] of fat, and one group received placebo [group 4 (G4)], according to randomization. Serum 25(OH)D, parathyroid hormone (PTH), total calcium, albumin, magnesium and creatinine levels; and urinary calcium, magnesium and creatinine levels were measured at baseline and after 14 days.

Results: Mean serum 25(OH)D levels were low in all groups (G1= 17.84±6.78ng/mL; G2=14.03±5.68ng/mL; G3= 15.16±6.03ng/mL; G4=14.31±5.39 ng/mL). After 2-weeks, vitamin D given during breakfast increased mean variation of serum 25(OH)D levels, when compared to placebo: G1(5.28±3.24 ng/mL) x G4(1.14±2.00ng/mL), p=0.001; G2(8.59±2.71ng/mL) x G4, p=0.000; G3(8.64±2.98ng/mL) x G4, p=0.001. Nevertheless, the intake of fat with vitamin D increased further the variation of mean serum 25(OH)D levels: G1XG2, p=0.007; and G1XG3, p=0.008.

Conclusion: After two weeks, a single oral dose of vitamin D increased mean serum 25(OH)D levels when given with food, and was larger when the meal had at least 15g of fat. These findings can have important implications to define the most effective way to supplement oral vitamin D. (ClinicalTrials.gov: NCT00968734)

Key Words: Vitamin D, Cholecalciferol, Dietary Supplements, Bioavailability, 25-hydroxyvitamin D

Introduction

Vitamin D is important for human health (1). Recently, vitamin D repletion strategies have had an increased public and scientific interest due to the high prevalence of vitamin D deficiency worldwide. Oral vitamin D supplements have been commonly used to prevent and treat vitamin D deficiency when skin production in response to sunlight exposure and/or dietary intake are not considered sufficient to provide enough vitamin D (2).

Vitamin D is a hydrophobic molecule, so its oral absorption could vary according to the fat content of the meal it is consumed with. Few studies have evaluated the effect of dietary fat in the absorption of vitamin D (3-5) so there is no evidence to recommend its ingestion with food, containing fat or not (6). Nevertheless, recently our group has shown a higher increase in mean serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels when the intake of vitamin D occurred during a fat containing meal, in a parallel clinical trial study comparing the effect of fat intake in serum 25(OH)D levels (4).

Therefore, the aim of this study was to evaluate serum 25(OH)D levels after the oral intake of a single dose of cholecalciferol with meals containing three different amounts of fat, or placebo, in young adults.

Materials and Methods

This double-blind randomized placebo-controlled study included 64 healthy medical residents of a university hospital in Porto Alegre, 30⁰S, Brazil. The exclusion criteria were not drinking milk; body mass index (BMI) ≥ 25 kg/m² or < 18.5 kg/m²;

known liver, kidney or endocrine disease; use of supplements of calcium and/or vitamin D; use of anticonvulsants, barbiturates or glucocorticoids, and travel outside the Brazilian South region during the previous 120 days. Skin phototype was evaluated according to Fitzpatrick (7).

Groups were formed according to randomization. Numbers were assigned to subjects in the order of inclusion in the study. Subjects were randomized to 4 groups with a tool obtained in <http://www.randomizer.org>. Different meals were given sequentially according to the order of the number assigned in the randomization.

All participants came to the research unit on the same week at 7:00 a.m., after overnight fasting. Blood and urine samples were collected at baseline and after 14 days to measure serum 25(OH)D, parathyroid hormone (PTH), total calcium, albumin, magnesium and creatinine levels, and urinary creatinine, calcium and magnesium levels. Then, 50,000IU of cholecalciferol or placebo [Group 4 (G4)] was administered orally to each subject during breakfast containing fat according to randomization [Group 1 (G1): no fat meal; Group 2 (G2): 15g-fat meal, and Group 3 (G3): 30g-fat meal]. The no fat meal contained orange juice, fat-free white bread, jam, and fruit; the 15g fat meal contained chocolate milk, fruit, and cookies; and the 30g fat meal was composed by chocolate milk, white bread, bologna and vegetable oil margarine. All meals had approximately 500 calories. All subjects ingested the whole content of the assigned meal, and then were advised to avoid sun exposure and changes in their usual eating pattern for the next two weeks.

Serum was kept at -70°C until the assays. All samples were analyzed in the same run: 25(OH)D by chemiluminescence (LIAISON, DiaSorin Inc., Stillwater/MN, USA, intra-assay coefficient of variation = 5.5%), PTH by electrochemiluminescence (Roche Diagnostics, Indianapolis/IN, USA, intra-assay coefficient of variation = 2.8%); all

other biochemical measurements were made by routine methods of the laboratory of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Cholecalciferol was purchased from Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and had a purity of 99.9%. Vitamin D3 and placebo capsules were prepared by a pharmacist and put in sequentially numbered containers; geometric dilution method was used to fractionate vitamin D. All capsules were individually weighted and the estimated content of vitamin D was $50000\text{IU} \pm 1326\text{IU}$. The content of capsules was disclosed to the research team after the biochemical measurements. Assignment groups were unknown to the researchers who collected the samples, as well as to the technicians responsible for biochemical measurements. The number of subjects, calculated to detect a difference of 8ng/ml in mean variation of serum 25(OH)D levels between groups after supplementation with cholecalciferol, with a standard deviation of 6.5ng/mL (4), power of 90%, and $p < 0.05$, was 15 per group. One additional subject was included in each group to allow for losses.

ANOVA was used to compare mean variation of serum 25(OH)D levels between groups. Post hoc analysis was made by the Tukey test. All data were analyzed with SPSSv.16.0, and differences were considered significant when $p < 0.05$.

The study was approved by the Ethics Committee of HCPA, and participants were included after written informed consent.

Results

Eighty-seven resident physicians were invited to participate, and all agreed. Ten were excluded because they had traveled to regions with high UVB incidence in the last 120 days, eleven were excluded for having $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$, and two were using

anticonvulsants or steroids drugs. One participant did not complete the protocol. All others were included in the analyses (Figure 1). The study was conducted in October 2011 (spring in the southern hemisphere).

Baseline characteristics are shown in Table 1. Phototypes ranged from I to II. Serum 25(OH)D was <30ng/ml in 61/63 subjects, <20ng/ml in 47/63 subjects, and <10ng/ml in 12/63 subjects.

After 2-weeks of vitamin D₃ or placebo intake during breakfast, mean variation of serum 25(OH)D levels was different between groups ($p < 0.001$). The mean variation of serum 25(OH)D levels after vitamin D ingested during no fat breakfast (5.28 ± 3.24 ng/mL) was higher when compared to placebo (1.14 ± 2.00 ng/mL), $p = 0.001$. Nevertheless, the intake of fat during vitamin D administration increased further the variation of mean serum 25(OH)D levels: G1XG2 (8.59 ± 2.71 ng/mL), $p = 0.007$; and G1XG3 (8.64 ± 2.99 ng/mL), $p = 0.008$. These data are shown in Figure 2. At day 14, no subject had hypercalcemia, and mean serum total calcium, PTH, magnesium, and albumin levels, and mean urinary calcium, magnesium, and creatinine levels were similar in all groups, as shown in Table 2.

Discussion

A single oral 50000IU dose of cholecalciferol given during breakfast containing no fat, 15g of fat, or 30g of fat increased mean variation of serum 25(OH)D levels, when compared to placebo. Nevertheless, subjects that received fat-containing meals had a higher increase in mean variation of serum 25(OH)D levels. As patients with malabsorption diseases are more susceptible to vitamin D deficiency, such an effect seems logical (6), although the mechanism by which fat intake may influence vitamin D₃

absorption has not been completely elucidated. It could be due to a higher release of bile, allowing an increased incorporation of fat in the bile salt micelle (8).

Food-drug interactions may depend on the size and the composition of meals as well as the timing of drug intake in relation to it (9). Drug oral absorption occurs after solubilization, and depends on intestinal permeability (10). The volume of intestinal fluids may increase 2–3 fold following a meal and the levels of phospholipids and bile salts in the gut also may increase 4–5 times (11, 12). Enhanced solubility in the postprandial intestine can markedly improve the bioavailability of a poorly soluble drug (13). In addition to the actual constituents of meal, the resulting changes in the volume of intestinal fluids and the fluidic environment is important for absorption(9, 14). For poorly soluble compounds, higher levels of bile may allow for enhanced wetting of the drug as well as increased micellar solubilization, both of which can increase the dissolution rate (10).

Food constituents have been widely studied and the composition of meals has been evaluated in humans to determine the pharmacokinetic of drug changes in response to meals composition. Triglycerides are predominant in fatty foods, and their digestion and absorption have been widely examined (8). When fat reaches the small intestine, fluid secretion increases with peak bile. Bile acids, their salts and lipases break down fats into monoglycerides and fatty acids that are able to cross the intestinal mucosal cell membrane. In addition, bile salts undergo aggregation into polymolecular micelles which increase in size, when emulsified with the breakdown products of lipid hydrolysis, resulting in improved solubilization ability (15-18).

Concomitant food intake may result in increased drug bioavailability either because of a food-induced increase in drug solubility, or due to the secretion of gastric acid or bile in response to food intake (19).

Testosterone, as vitamin D, is a steroid hormone. Several studies evaluated the absorption of oral testosterone in response to dietary fat. In a crossover study, investigating the effect of food composition on the pharmacokinetics of oral testosterone undecanoate, postmenopausal women ingested the drug with four different meals in a randomized order (0.6g, 5g, 19g or 44g of fat); the authors concluded that approximately 19g of lipid per meal was enough to maximize the absorption of testosterone (20). In a recent study of self-emulsifying oral testosterone, a lipophilic testosterone ester with a complex lipid matrix and an emulsifying agent, hypogonadal men that received the drug with food had not only prolonged maximum serum concentration of testosterone but also higher minimum testosterone concentration (21). Another crossover study evaluated the effect of dietary fat on the pharmacokinetics of a single oral dose of testosterone undecanoate containing 300 mg of testosterone in a self-emulsifying capsule formulation, also in hypogonadal men. The drug was administered with no food or 30 minutes after an approximately 800 calorie meal containing 10%, 20%, 30% or 50% fat. The magnitude of the increase in serum testosterone was shown to be directly dependent on the amount of fat in the meal. Food containing 20% to 50% dietary fat produced testosterone levels at or above the upper range of adult men and testosterone levels trended higher as dietary fat content increased (22) Although the formulation used in this two last pharmacokinetics studies contained an emulsifying agent, these results suggest that this emulsifier was not able to maximize testosterone absorption.

Few studies have evaluated the effect of dietary fat in vitamin D absorption. Nevertheless, a food effect on vitamin D absorption is suggested by a recent uncontrolled study; higher mean serum 25(OH)D levels were observed when vitamin D supplements were ingested during the largest meal of the day; however, the content of

these meals was not described (5). A recent randomized parallel trial in young adults compared mean serum 25(OH)D levels after one single oral dose of 50,000 IU of cholecalciferol administered during a 1.7g-fat meal or 25g-fat meal. Mean serum 25(OH)D levels were higher in subjects which received the 25g-fat meal (4). In a clinical trial that compared the effect of 25 000IU of vitamin D₂ intake with whole milk (8.4g of fat/serving), skimmed milk (2.4g of fat/serving), or toast with 0.1mL of corn oil, there was no difference in mean serum vitamin D₂ levels, so the authors suggested that vitamin D absorption is independent of its administration with fat (23). In another study, normal subjects received low-fat cheese (~3g of fat/serving) or high-fat cheese (~11g of fat/serving), fortified with 28000IU of vitamin D, or the same amount of vitamin D dissolved in ethanol, with or without food, per week, for 8 weeks. Mean serum 25(OH)D were similar in all groups treated with vitamin D, and higher than placebo (24). Although in these studies there was no difference between serum vitamin D levels between groups, the amount of fat provided during the meals was smaller than in the present study. Besides, it is not known if their subjects were allowed to intake other foods with unknown fat content along with vitamin D. In another study, mean serum vitamin D₂ levels were higher in young and older adults when vitamin D was ingested with cheese (~20g of fat/serving) when compared to water, suggesting that fatty food facilitates its absorption despite age (3). In this study, the fat content of cheese was similar to the one provided in our study.

An association of dietary fat composition estimated by food frequency questionnaire with serum 25(OH)D levels was observed in a cohort study of subjects in the active treatment arm (700 IU vitamin D and calcium supplementation daily) of a randomized clinical trial, although there was no association of total daily fat intake with 25(OH)D increment. In contrast, the variation in 25(OH)D was positively associated

with total daily monounsaturated fatty acid intake and inversely associated with total polyunsaturated fatty intake (25). The main limitations of this study are the estimation of fat content of meals by food frequency questionnaire, and unaccounted for confounding, as the time interval between vitamin D and fat-containing food intake.

In our study, baseline mean serum 25(OH)D levels were low in most of the participants. It could be explained by some factors related to the study, as its location (Porto Alegre, RS, Brazil, 30°S), and the season (spring) in which it was performed (26). Besides all subjects worked in a hospital setting and had low sun exposure.

Our study has limitations. The content of vitamin D in dietary food was not evaluated. Nevertheless, it is very improbable that dietary vitamin D influenced the results, because natural food contains small amounts of vitamin D, and food is usually not supplemented with vitamin D in Brazil. Another limitation was the measurement of serum 25(OH)D levels as a surrogate for serum vitamin D₃ levels. Nonetheless, as this metabolite increases rapidly after vitamin D supplementation, it has frequently being used to assess the effect of vitamin D supplementation (23, 27-32). Another point that deserves comment in our study is our inability to quantify the amount of emulsifiers present in the fat containing meals, because there was no information on the label of industrialized food offered (cookies; white bread, bologna and vegetable oil margarine).

The administration of vitamin D in powder in our study might have affected its results. A recent systematic review of different vehicles on vitamin D bioavailability identified few clinical studies with this purpose. The results of each study were standardized by equation with total change in mean serum 25(OH)D divided by the mean dose of vitamin D administered per day multiplied by 100IU. The authors concluded that vitamin D in oil produced a greater 25(OH)D response than vitamin D in powder or ethanol in healthy subjects (33).

In conclusion, after two weeks, a single oral dose of vitamin D, administered with a meal containing fat or not, increased serum 25(OH)D levels. Nevertheless, the increase was higher when the meals contained 15g or more of fat. These findings can have important implications to define the most effective way to supplement oral vitamin D.

Acknowledgements

We are grateful to Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil and Conselho Nacional de Pesquisas of Brazil for funding our research and to Roberta Pires Bastos Oliveira for performing in the preparation of capsules.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-81.
2. Stechschulte SA, Kirsner RS, Federman DG. Vitamin D: bone and beyond, rationale and recommendations for supplementation. *Am J Med*. 2009;122(9):793-802.
3. Johnson JL, Mistry VV, Vukovich MD, Hogie-Lorenzen T, Hollis BW, Specker BL. Bioavailability of vitamin D from fortified process cheese and effects on vitamin D status in the elderly. *J Dairy Sci*. 2005;88(7):2295-301.
4. Raimundo FV, Faulhaber GA, Menegatti PK, Marques LaS, Furlanetto TW. Effect of High- versus Low-Fat Meal on Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels after a Single Oral Dose of Vitamin D: A Single-Blind, Parallel, Randomized Trial. *Int J Endocrinol*. 2011;2011:809069. PubMed PMID: 22190928. Pubmed Central PMCID: PMC3235461. eng.
5. Mulligan GB, Licata A. Taking Vitamin D With the Largest Meal Improves Absorption and Results in Higher Serum Levels of 25-Hydroxyvitamin D. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010;25(4):928-30. PubMed PMID: WOS:000277189400026.
6. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jul;96(7):1911-30. PubMed PMID: 21646368. eng.
7. Roberts WE. Skin type classification systems old and new. *Dermatol Clin*. 2009;27(4):529-33, viii.

8. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(6):E1183-94. Epub 2009 Jan 21.
9. Singh BN. Effects of food on clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 1999 Sep;37(3):213-55. PubMed PMID: 10511919. Epub 1999/10/08. eng.
10. Custodio JM, Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 60. Netherlands2008. p. 717-33.
11. Galia E, Nicolaidis E, Horter D, Lobenberg R, Reppas C, Dressman JB. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm Res.* 1998 May;15(5):698-705. PubMed PMID: 9619777. Epub 1998/06/10. eng.
12. Dressman JB, Reppas C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Sci.* 11 Suppl 2. Netherlands2000. p. S73-80.
13. Ratain MJ, Cohen EE. The value meal: how to save \$1,700 per month or more on lapatinib. *J Clin Oncol.* 25. United States2007. p. 3397-8.
14. Welling PG. Effects of food on drug absorption. *Annu Rev Nutr.* 1996;16:383-415. PubMed PMID: 8839932. Epub 1996/01/01. eng.
15. Konishi T, Satsu H, Hatsugai Y, Aizawa K, Inakuma T, Nagata S, et al. A bitter melon extract inhibits the P-glycoprotein activity in intestinal Caco-2 cells: monoglyceride as an active compound. *Biofactors.* 2004;22(1-4):71-4. PubMed PMID: 15630255. Epub 2005/01/05. eng.
16. Konishi T, Satsu H, Hatsugai Y, Aizawa K, Inakuma T, Nagata S, et al. Inhibitory effect of a bitter melon extract on the P-glycoprotein activity in intestinal Caco-2 cells. *Br J Pharmacol.* 143. England2004. p. 379-87.

17. Ingels F, Deferme S, Destexhe E, Oth M, Van den Mooter G, Augustijns P. Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *Int J Pharm.* 232. Netherlands2002. p. 183-92.
18. Varma MV, Ambler CM, Ullah M, Rotter CJ, Sun H, Litchfield J, et al. Targeting intestinal transporters for optimizing oral drug absorption. *Curr Drug Metab.* 11. Netherlands2010. p. 730-42.
19. Schmidt LE, Dalhoff K. Food-drug interactions. *Drugs.* 62. New Zealand2002. p. 1481-502.
20. Schnabel PG, Bagchus W, Lass H, Thomsen T, Geurts TB. The effect of food composition on serum testosterone levels after oral administration of Andriol Testocaps. *Clin Endocrinol (Oxf).* 66. England2007. p. 579-85.
21. Yin AY, Htun M, Swerdloff RS, Diaz-Arjonilla M, Dudley RE, Faulkner S, et al. Reexamination of pharmacokinetics of oral testosterone undecanoate in hypogonadal men with a new self-emulsifying formulation. *J Androl.* 33. United States2012. p. 190-201.
22. Yin A, Alfadhli E, Htun M, Dudley R, Faulkner S, Hull L, et al. Dietary Fat Modulates the Testosterone Pharmacokinetics of a New Self-Emulsifying Formulation of Oral Testosterone Undecanoate in Hypogonadal Men. *J Androl*2012.
23. Tangpricha V, Koutkia P, Rieke SM, Chen TC, Perez AA, Holick MF. Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(6):1478-83.
24. Wagner D, Sidhom G, Whiting SJ, Rousseau D, Vieth R. The bioavailability of vitamin D from fortified cheeses and supplements is equivalent in adults. *J Nutr.* 2008;138(7):1365-71.

25. Niramitmahapanya S, Harris SS, Dawson-Hughes B. Type of dietary fat is associated with the 25-hydroxyvitamin D₃ increment in response to vitamin D supplementation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;96(10):3170-4. PubMed PMID: 21816779. Pubmed Central PMCID: PMC3200243. eng.
26. Saraiva GL, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araujo LM, Vieira JG, Kunii I, et al. Influence of ultraviolet radiation on the production of 25 hydroxyvitamin D in the elderly population in the city of Sao Paulo (23 degrees 34'S), Brazil. *Osteoporos Int.* 2005;16(12):1649-54. Epub 2005 Jun 10.
27. Heaney RP, Recker RR, Grote J, Horst RL, Armas LA. Vitamin D(3) is more potent than vitamin D(2) in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 96. United States 2011. p. E447-52.
28. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int.* 2005;16(7):713-6. Epub 2005 Mar 18.
29. Biancuzzo R, Young A, Bibuld D, Cai M, Winter M, Klein E, et al. Fortification of orange juice with vitamin D(2) or vitamin D(3) is as effective as an oral supplement in maintaining vitamin D status in adults. *Am J Clin Nutr.* 2010 Jun;91(6):1621-6. PubMed PMID: 20427729. Pubmed Central PMCID: PMC2869510. eng.
30. Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, Klein EK, Young A, Bibuld D, et al. Vitamin D₂ is as effective as vitamin D₃ in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 93. United States 2008. p. 677-81.
31. Ilahi M, Armas LA, Heaney RP. Pharmacokinetics of a single, large dose of cholecalciferol. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(3):688-91.

32. Romagnoli E, Mascia ML, Cipriani C, Fassino V, Mazzei F, D'Erasmus E, et al. Short and long-term variations in serum calciotropic hormones after a single very large dose of ergocalciferol (vitamin D₂) or cholecalciferol (vitamin D₃) in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(8):3015-20. Epub 2008 May 20.
33. Grossmann RE, Tangpricha V. Evaluation of vehicle substances on vitamin D bioavailability: a systematic review. *Mol Nutr Food Res.* 2010 Aug;54(8):1055-61. PubMed PMID: 20425758. Pubmed Central PMCID: PMC3033429. eng.

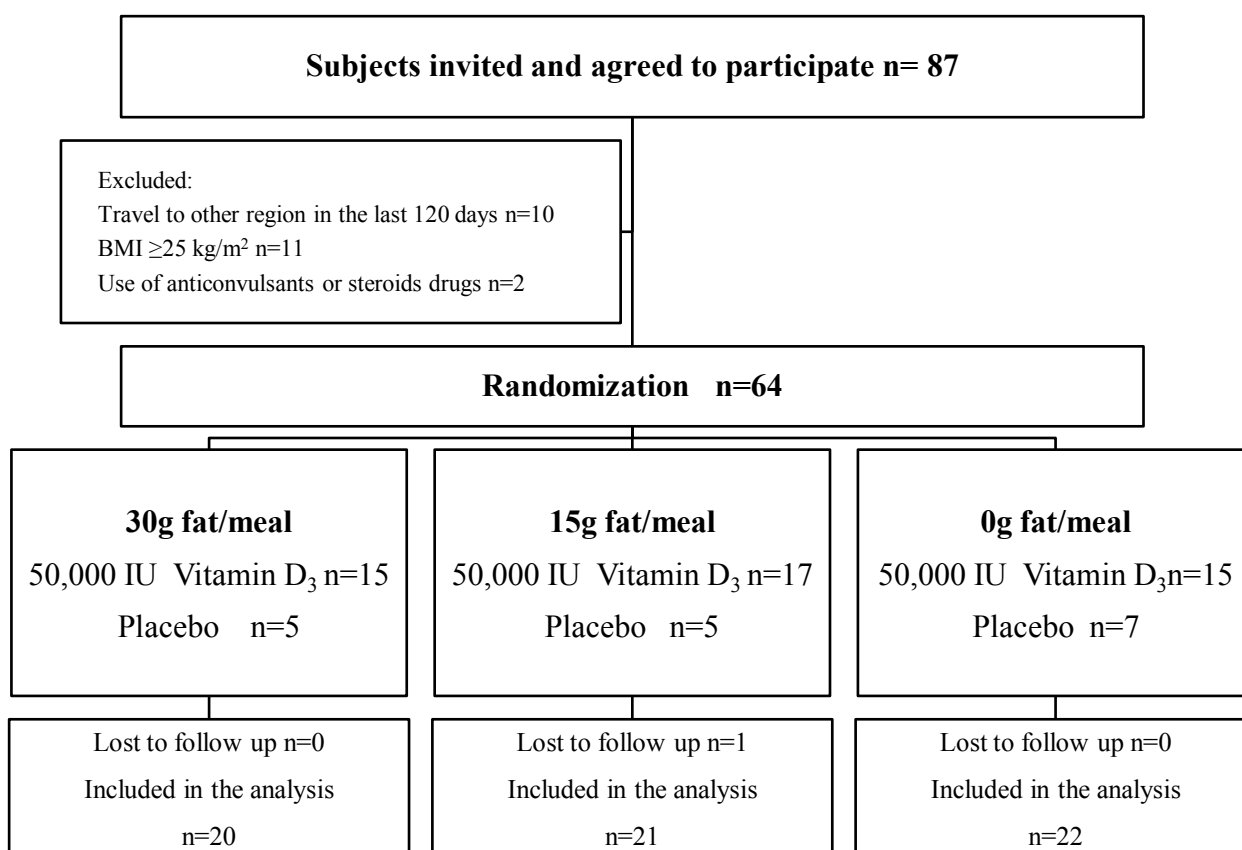
Figure 1: Flow diagram of the participants

Table1: Baseline characteristics of study groups

Parameters	30g fat/meal (n=15)	15g fat/meal (n=17)	0g fat/meal (n=15)	Placebo (n=16)
Age(yr)	28.4±3.2	27.3±3.2	27.4±3.1	27.8±3.1
BMI (kg/m ²)	21.1±1.5	22.2±2.1	22.0±1.8	21.9±1.2
Serum				
25(OH)D(ng/mL)	15.2±6.0	14.6±6.1	17.8±6.8	14.3±5.4
PTH(pg/mL)	46.4±19.5	37.0±14.5	46.8±16.9	46.3±18.6
Albumin(g/dL)	4.5±0.3	4.4±0.2	4.5±0.3	4.5±0.3
Calcium(mg/dL)	9.0±0.3	8.8±0.3	9.0±0.4	9.1±0.3
Creatinine(mg/dL)	0.8±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1
Magnesium(mg/dL)	2.1±0.1	2.1±0.1	2.1±0.1	2.1±0.1
Urine				
Creatinine(mg/dL)	173.8±41.0	173.6±70.9	179.9±99.6	182.6±101.9
Calcium(mg/dL)	13.6±8.3	14.3±8.9	10.7±6.7	14.7±10.6
Magnesium(mg/dL)	8.8±2.9	9.6±5.0	8.3±4.9	10.2±4.9

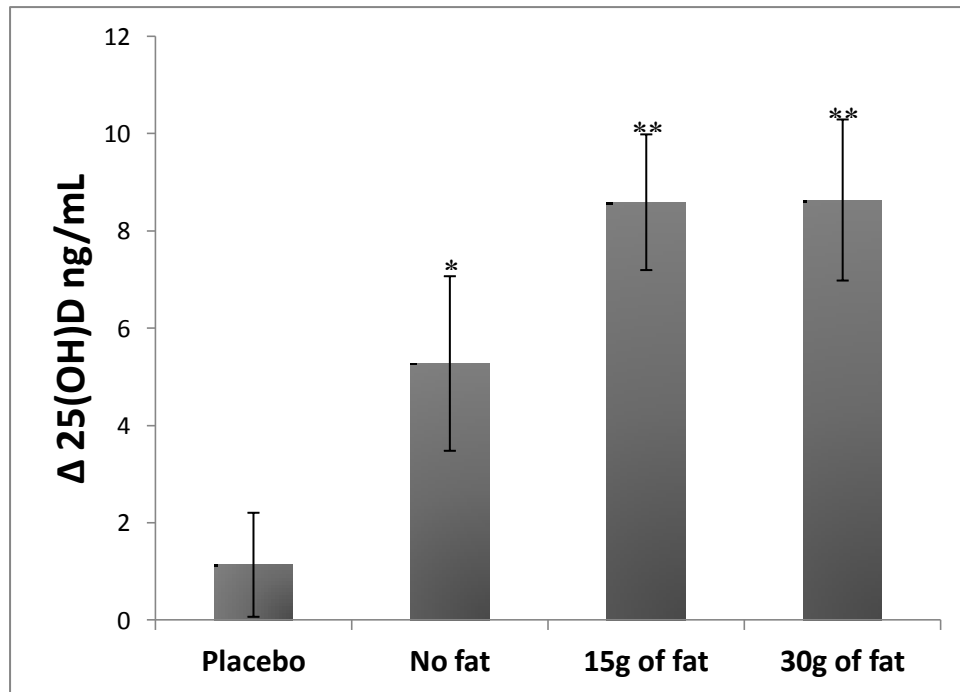
Values are shown as mean ± SD. Baseline values did not differ among groups (P>0.05). BMI: Body Mass Index

Table 2: Biochemical responses 14 days after a single 50,000IU oral dose of vitamin D3, administered with fat-containing breakfast or not, or placebo.

Parameters	30g fat/meal (n=15)	15g fat/meal (n=17)	0g fat/meal (n=15)	Placebo (n=16)
Serum				
25(OH)D(ng/mL)	23.8±5.4	22.6±6.4	23.1±5.6	15.4±5.8
PTH(pg/mL)	32.1±17.4	41.3±12.1	35.1±14.1	43.9±17.6
Calcium(mg/dL)	8.9±0.2	8.9±0.4	8.9±0.3	8.9±0.3
Creatinine(mg/dL)	0.8±0.3	0.8±0.1	0.8±0.1	0.7±0.1
Magnesium(mg/dL)	2.1±0.1	2.1±0.1	2.1±0.1	2.1±0.2
Urine				
Creatinine(mg/dL)	184.4±76.8	197.8±47.5	146.7±46.1	148.3±61.4
Calcium(mg/dL)	11.8±7.4	14.9±13.0	16.6±11.9	15.2±16.8
Magnesium(mg/dL)	8.1±3.9	9.5±4.3	7.9±5.5	9.4±6.6

Values are shown as mean ± SD. The mean variation of all parameters measured in serum and urine, except for serum 25(OH)D levels, were not significant between groups.

Figure 2: Mean variation of serum 25(OH)D levels 14-days after a single 50,000IU oral dose of vitamin D3, administered with fat-containing breakfast or not, or placebo. Data are shown as mean and 95% confidence interval.



*Different from placebo group ($p=0,001$); **Different from no fat group ($p<0,01$)

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Otimizar as recomendações para a ingestão de suplementos orais de vitamina D para a população em geral requer considerar como os alimentos podem influenciar a biodisponibilidade da vitamina D.

Uma dose oral única de 50.000IU de colecalciferol associada a refeições contendo 0, 15 ou 30 gramas de gordura, apresentou um aumento na variação média dos níveis séricos de 25(OH)D em jovens saudáveis, quando comparada ao grupo placebo. No entanto, os indivíduos que receberam maior conteúdo de gordura nas refeições apresentaram uma maior aumento na variação média dos níveis séricos de 25(OH)D. Embora o mecanismo pelo qual a ingestão de gordura pode influenciar a absorção de vitamina D₃ não tenha sido completamente elucidado, a presença de gordura pode ter provocado uma maior liberação de bile, permitindo um aumento da incorporação de vitamina D às micelas e conseqüentemente maior absorção intestinal.

Em nosso estudo, os níveis séricos de 25(OH)D basais foram baixos na maioria dos participantes. Isso pode ser explicado por alguns fatores, como a sua localização geográfica (Porto Alegre, RS, Brasil, 30° S), e a estação do ano (primavera), na qual o estudo foi realizado. Além disso, todos os participantes tinham uma rotina de trabalho em ambiente fechado, dentro de um hospital, com baixa ou nenhuma exposição solar.

O teor de vitamina D em alimentos dietéticos não foi avaliado. No entanto, é muito improvável que vitamina D proveniente de alimentos tenha influenciado os resultados, porque poucos alimentos contêm naturalmente vitamina D e o Brasil não

possui legislação específica para incentivo a fortificação de alimentos com esta vitamina. Outro ponto que merece comentário em nosso estudo é a nossa incapacidade para quantificar o montante de emulsificantes presentes nas refeições que continham gordura, porque não havia informação sobre a quantidade de emulsificantes nos rótulos dos alimentos industrializados utilizados.

Os resultados deste ensaio clínico randomizado controlado duplo cego contribuirão para a elaboração de recomendações sobre suplementação de vitamina D, em busca de uma melhor eficácia dos suplementos dietéticos de vitamina D. Novos estudos são necessários, para investigar o papel de outros componentes alimentares, além da gordura, na absorção de suplementos dietéticos de vitamina D.

APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO

Consentimento Livre e Esclarecido do Projeto “Efeito da Gordura na Absorção de Vitamina D₃ Suplementada em Dose Oral Única”

Convidamos o senhor(a) a participar de um estudo que será realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com o objetivo de avaliar a absorção de suplemento dietético de vitamina D através da variação de 25(OH)D no sangue, conforme a refeição associada à administração do suplemento.

Em estudo realizado recentemente no HCPA, observou-se uma alta prevalência de hipovitaminose D em médicos residentes, na primavera. Tendo em vista a dificuldade de obtenção desta vitamina através da síntese cutânea por irradiação UVB ou alimentação, o suplemento dietético é uma opção para prevenir e tratar a deficiência de vitamina D. Estima-se que sua absorção e biodisponibilidade podem variar conforme o teor de gordura da refeição realizada no momento da administração do suplemento. A verificação desta variação contribuirá para a orientação fornecida aos pacientes quanto à importância ou não da ingestão do suplemento dietético com alimentos ricos em gordura.

Por se tratar de um estudo cegado e com intervenção placebo, o participante poderá receber uma cápsula sem o suplemento. Os pesquisadores envolvidos na coleta e na intervenção não sabem quais as cápsulas contém o suplemento de vitamina D. Todos os participantes do estudo receberão os resultados dos exames e terão sua identidade preservada.

Os participantes receberão uma refeição juntamente com o suplemento e realizarão coletas de duas amostras de urina (20ml cada) e duas amostras de sangue (8ml cada), além de responder um questionário e medir peso e altura. O tempo total para responder ao questionário será de 10 minutos e aproximadamente 20 min para realizar cada coleta.

O uso de suplementos dietéticos de vitamina D, com a dosagem de 50.000 UI não apresenta risco ao usuário tendo em vista que estudos com dosagem igual ou maior apresentaram resultados satisfatórios, além de não apresentarem danos à saúde dos participantes. O único risco do estudo é o da punção venosa, que pode causar equimoses e muito raramente, tromboflebite superficial. O procedimento para medir peso e altura é indolor e não invasivo. A participação no estudo é voluntária e os participantes poderão se retirar do estudo a qualquer momento, se assim o desejarem.

Este estudo não proverá despesas aos participantes. As despesas com a refeição oferecida com o suplemento, o próprio suplemento e os exames serão custeados pelo projeto de pesquisa.

Todos os participantes poderão ser esclarecidos a qualquer momento pelos telefones informados no final deste documento. Este documento possui duas vias, sendo que uma dela permanecerá com o pesquisador e a outra com o participante.

Eu, _____ concordo em participar do estudo.

Assinatura: _____

Porto Alegre, ___ de _____ de 2011.

Pesquisador/Entrevistador

Dra. Tania Furlanetto
Pesquisadora Responsável

Contatos: Fabiana Viegas Raimundo (9105.6415), Dra. Tania Furlanetto (9964.8624) ou Comitê de Ética em Pesquisas do HCPA (3359-7640 - atendimento das 8h às 17h)

Endereço do HCPA: Rua Ramiro Barcellos, 2350 Bairro Rio Branco - Porto Alegre/RS CEP 90035-903

