

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM PICOLINATO DE CROMO EM PACIENTES
COM DIABETES TIPO2: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

ANA NUNES PAIVA

NATAL-RN

2015

ANA NUNES PAIVA

**SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM PICOLINATO DE CROMO EM PACIENTES
COM DIABETES TIPO2: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Almeida

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Adriana Augusto de Rezende

NATAL-RN

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE

P149s

Paiva, Ana Nunes..

Suplementação oral com picolinato de cromo em pacientes com diabetes tipo 2: um ensaio clínico randomizado / Ana Nunes Paiva. – Natal, 2015.

78f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Almeida.Coorientadora: Prof^a Dr^a Adriana Augusto de Rezende.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Suplementação oral - Tese.
2. Picolinato de Cromo - Tese.
3. Diabetes tipo 2 - Tese. I. Almeida, Maria das Graças. II. Rezende, Adriana Augusto de. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 616.379-008.64(043.3)

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde:

Prof. Dr. Erivaldo Sócrates Tabosa do Egito

ANA NUNES PAIVA

**SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM PICOLINATO DE CROMO EM PACIENTES
COM DIABETES TIPO2: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Aprovada em: 27.02.2015

Banca examinadora:

Presidente da Banca: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Almeida

Membros da Banca:

Prof^a. Dr^a.Karine Cavalcanti Maurício de Sena Evangelista

Prof. Dr. André Gustavo Pires de Souza

Prof^a. Dr^a.Sandra Maria Nunes Monteiro

Prof. Dr. Jorge Alberto López Rodriguez

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

a minha querida **MÃE** (*in memoriam*), de quem herdei determinação, coragem e responsabilidade para busca de um ideal;

a minha irmã **MARIA DO CÉU NUNES ABRANTES** (*in memoriam*) e a meu irmão **RAIMUNDO EVANGELISTA PAIVA**, constantes vigilantes e incentivadores das lides de toda a minha vida estudantil.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS**, em primeiro lugar, por ter-me concedido saúde, força e coragem para alcançar mais um objetivo em minha vida;

aos **meus familiares Carlos André da Silva**, esposo, companheiro e amigo, e **Gustavo, Rodolfo e Marília**, meus filhos, pela compreensão, apoio e carinho durante o tempo em que este projeto foi meu objetivo maior;

à **Prof^a. Dr^a. Maria das Graças de Almeida**, que, apesar de todas as múltiplas atividades, encontrou, em seu precioso tempo, espaço para dedicar-se à orientação deste trabalho, muitas vezes abrindo mão de momentos do convívio familiar. A confiança que em mim depositou constituiu-se em fator de relevante motivação.

À **Prof^a. Dr^a. Adriana Augusto de Rezende**, pela prestimosa co-orientação na concretização desta pesquisa;

ao **PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** – na pessoa do Prof. Dr. Erivaldo Sócrates Tabosa do Egito, pela disponibilidade em ajudar na efetivação deste trabalho.

À **Prof^a. Dr^a. Ivonete Araújo Batista**, um agradecimento especial, por toda a sua competente e dedicada ajuda durante todo o decorrer de meu trabalho.

À **FARMÁCIA DE MANIPULAÇÃO “COMPANHIA DA FÓRMULA”**– representada por Dr^a. Maria do Socorro Oliveira Nóbrega de Melo e Dr^a. Maria Eliene Mendes de Farias, pela concessão do suplemento picolinato de cromo, evidenciando, assim, elevado sentido social em favor do tratamento do paciente com diabetes;

a **Dr^a. Carmem Suzana Bassôa Reinstein**, pela disponibilização do Programa de Nutrição Diet Win Profissional, possibilitando a realização das análises dietéticas;

ao **HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ONOFRE LOPES** – na pessoa de seu diretor-geral, Dr. José Ricardo Lagreca de Sales Cabral, que disponibilizou o ambiente hospitalar para a realização deste estudo;

ao **médico Dr. Francisco de Assis de Lima**, que além de ser um incentivador de meu crescimento profissional, ofereceu o espaço físico do Ambulatório para execução da pesquisa;

aos **clínicos gerais e endocrinologistas** do Ambulatório de Clínica Médica e Endocrinologia do HUOL, em especial **Dr. Josivan Gomes de Lima**, pela disponibilidade profissional para colaborar neste trabalho;

aos **enfermeiros e técnicos de enfermagem** do Ambulatório de Clínica Médica e Endocrinologia, na pessoa de **Dr^a. Kátia Veronica Cavalcante Seabra**, pela contribuição dispensada à realização deste estudo;

à **equipe do Laboratório de Análises Clínicas do HUOL**, em nome de **Dr^a. Rute Santos Mendonça**, colaboradora na execução das análises bioquímicas desta pesquisa;

ao **Hospital Monsenhor Walfredo Gurgel**, em nome da Coordenadora do Núcleo de Assistência ao Servidor, **Leila Maria de Moraes e Silva Rodrigues** e **a todos os meus colegas**, pelas evidentes provas de apoio, entendidas como tendo o propósito de propiciar meu efetivo crescimento profissional;

ao **Diretor do Departamento de Assistência ao Servidor**, Francisco Carlúcio Porfírio, e a seu antecessor, Joselino Marques, bem como a todos os meus colegas desse departamento, pela compreensão e pelo apoio durante decorrer deste estudo;

a **Anna Cecília Queiroz de Medeiros**, companheira de desafios, angústias e conquistas, pelas sábias sugestões, que me fizeram crescer como pesquisadora. Obrigada pela dedicação e pelo compromisso com esta pesquisa científica.

A todos os colegas do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa da UFRN, pela acolhida e pela divisão de espaços, em especial aos bioquímicos **Gabriel Araújo da Silva, Leandro Vinícius Fernandes de Moraes, Marcela Abbot Galvão Ururahy e Karla Simone Costa de Souza** e ao funcionário **Heverton do Sacramento**, que contribuíram para meu aprendizado na determinação das atividades das enzimas antioxidantes;

aos alunos de **graduação em Nutrição** Andressa Názara Lucena de Melo, Raiana Lourenço de Andrade, Vanessa Cristina de Medeiros Lourenço, Kayo Emanuel Brandão Nelson, Heverton Araújo de Lima, Luanna Costa Pessanha, Rodrigo Albert Baracho Ruegg, Karina Zaira Silva Marinho, Nínive Rayane de Medeiros Alves, Julianne Sibebe Rodrigues, Pablícia Medeiros da Costa, Denise Gama Jardim de Sá, Amanda Bárbara Rodrigues Avelino, Andressa Soares Sabino e Laise Mota Baracho, também dedicados colaboradores desta pesquisa;

a minha colega, amiga e irmã camarada **Maria Nazaré Batista**, pelo incentivo, pela motivação e orientação em mais uma etapa de nossa vida acadêmica.

Enfim, com emocionada gratidão, aos **PACIENTES**, que, direta ou indiretamente, participaram desta pesquisa, compreendendo o valor de sua contribuição para o avanço da ciência. Tal contribuição foi de fundamental importância para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

***Não é porque certas coisas são difíceis que nós não ousamos. É
justamente porque não ousamos que tais coisas são difíceis.***

Autor desconhecido

RESUMO

Devido à importância do papel do cromo no mecanismo da sensibilidade à insulina, tem sido estudada a suplementação com esse mineral em pacientes com diabetes. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação oral com picolinato de cromo (PicCr) na glicemia, no perfil lipídico e no perfil antioxidante bem como nos parâmetros antropométricos e de cromo plasmático, em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) mal controlado (hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 7\%$). O estudo foi caracterizado como um ensaio clínico controlado, randomizado, desenvolvido com 71 pacientes, de ambos os sexos, divididos em dois grupos: grupo controle (n=32) recebendo placebo e grupo suplementado (n=39), recebendo 600 μ g/dia de PicCr, durante quatro meses. Os pacientes receberam orientação nutricional e mantiveram o uso de sua medicação. Todos os parâmetros (bioquímicos, antropométricos e perfil antioxidante) foram analisados antes e após os quatro meses de suplementação. O grupo suplementado com PicCr apresentou redução significativa da glicemia de jejum ($p < 0,05$) e da glicemia pós-prandial ($p < 0,05$). A HbA1c foi reduzida significativamente em ambos os grupos ($p < 0,001$). No entanto, essa redução foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo suplementado (-1,90), em comparação com o grupo controle (-1,00). Foi observada, ainda, diminuição significativa da circunferência da cintura (CC) e do índice de conicidade (IC) nos pacientes do grupo suplementado ($p < 0,05$). Adicionalmente, houve aumento significativo ($p < 0,001$) da concentração plasmática de cromo no grupo suplementado. Não foi observada diferença estatística entre os grupos, após a intervenção com PicCr, em relação a IMC, perfil lipídico (CLT, LDL-c e TG) e perfil antioxidante (GSH, SOD e GPX). A suplementação com PicCr teve um efeito benéfico sobre o controle glicêmico dos pacientes com DM2 mal controlado e com indicadores de obesidade central (CC e IC). Apesar dos resultados promissores encontrados, mais estudos são necessários para investigar o efeito da suplementação com cromo em longo prazo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA (American Diabetes Association);
ADOs (Antidiabéticos Orais);
AGEs (Produtos finais de glicação avançada);
AI (Adequate Intake);
ALT (Alanina aminotransferase);
AST (Aspartato aminotransferase);
CC (Circunferência da Cintura);
CLT (Colesterol Total);
Cr (Cromo);
Cr³⁺ (Cromo Trivalente);
DM (Diabetes *Mellitus*);
DM2 (Diabetes *Mellitus* tipo 2);
DRI (Dietary Reference Intakes);
EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético);
GGT (Gama Glutamil Transferase);
GJ (Glicemia de Jejum);
GLUTs (Transportadores de Glicose);
GLUT₄ (Transportadores de Glicose da série 4);
GPP (Glicemia Pós prandial);
GPx (Glutaciona peroxidase);
GSH (Glutaciona reduzida);
HAS (Hipertensão Arterial Sistêmica);
HbA1c (Hemoglobina-glicada A1c);
HDL-c (Lipoproteína de Alta Densidade –Colesterol);
Hexokinase/G-6PDH (Hexocinas/Glucose-6-Fosfato-Desidrogenase);
HUOL (Hospital Universitário Onofre Lopes);
IC (Índice de Conicidade);
IMC (Índice de Massa Corporal);
LDL-c (Lipoproteína de Baixa Densidade);

LMWCr (Low-Molecular Weight Chromium-Binding Substance)
MDA (Malonildialdeido);
PicCr (Picolinato de Cromo);
PI (Placebo);
RDA (Recommended Dietary Allowances);
RI (Resistência Insulínica);
SBD (Sociedade Brasileira de Diabetes);
SOD (Superóxido Dismutas);
T4 livre (Tiroxina);
TSH (Hormônio Estimulador da Tireoide);
TG (Triglicerídeos);
UL (Tolerable Upper Intake Level);
USDA (United States Department of Agriculture);
WHO (World Health Organization).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo proposto para a participação do cromo na ação da insulina.....	18
Figura 2 – Fluxograma da seleção dos pacientes estudados.....	24
Figura 3 – Fluxograma de atividades desenvolvidas para seleção e acompanhamentos dos pacientes.....	27
Figura 4 – Composição das cápsulas utilizadas: placebo e picolinato de cromo	29
Figura 5 – Obtenção da amostra biológica.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação do IMC para adultos, segundo a WHO (2004) .	30
Tabela 2 – Pontos de corte estabelecidos pela ABESO para medida da circunferência abdominal e sua relação com o risco de doenças cardiovasculares	30
Tabela 3 – Parâmetros de avaliação do controle glicêmico e perfil lipídico em pacientes com DM2	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	21
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 População e caracterização do estudo	23
4.1.1 Aspectos éticos.....	25
4.1.2 Desenho do estudo.....	28
4.2 Suplementação Nutricional.....	28
4.3 Avaliação Nutricional.....	29
4.3.1 Avaliação antropométrica.....	29
4.3.2 Avaliação dietética.....	31
4.4 Parâmetros Laboratoriais.....	31
4.4.1 Obtenção da amostra biológica.....	31
4.4.2 Análise Bioquímica.....	32
4.4.3 Determinação do <i>Status</i> das defesas antioxidantes.....	33
4.4.3.1 Glutathione Reduzida.....	33
4.4.3.2 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes.....	34
4.4.3.2.1 Preparação do hemolisado.....	34
4.4.3.2.2 Superóxido Dismutase.....	34
4.4.3.2.3 Glutathione Peroxidase.....	34
4.4.4 Avaliação do cromo sérico.....	35
4.4.4.1 Procedimento de desmineralização.....	35
4.4.4.2 Obtenção e análise da amostra	35
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 ARTIGOS PRODUZIDOS.....	36
6 COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICES.....	67
ANEXOS.....	76

1 INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença sistêmica, crônica, resultante de deficiência na secreção de insulina pelo pâncreas, da resistência periférica à ação da insulina ou de ambas. A contribuição relativa de cada uma dessas anormalidades varia tanto de um paciente para outro como em um mesmo paciente ao longo da progressão da doença. Esse quadro será traçado a partir da interação de inúmeros fatores, tanto genéticos quanto ambientais, como a dieta e o estilo de vida (1).

A forma da doença mais comum é o diabetes *mellitus* tipo 2(DM2), atingindo 90-95% dos indivíduos, principalmente os de meia idade ou em idade avançada, obesos ou pacientes com distribuição de gordura corporal na região abdominal (2).

Atualmente, vem sendo registrado um drástico aumento no número de casos de DM2, que deve passar de 382 milhões, em 2013, para 592 milhões até 2035. No Brasil, o diabetes é considerado um dos mais sérios problemas de saúde pública na atualidade, tanto pelo número de pessoas afetadas (aproximadamente 11,5 milhões) quanto pelas incapacitações e custos envolvidos no controle e tratamento das complicações (3).

Muitas complicações do DM são decorrentes das alterações micro e macrovasculares advindas da hiperglicemia constante. Apesar do avanço das intervenções farmacológicas e de mudanças no estilo de vida, ainda é grande o número de pacientes com diabetes que não conseguem um controle glicêmico adequado. Assim, a prevalência de diabetes mal controlado continua sendo um crescente desafio na prática clínica, motivando esforços no sentido de melhor compreender e manejar essa doença (4).

Nessa perspectiva, tem sido investigado o funcionamento dos receptores de insulina como elementos chave para a instauração e a progressão da resistência insulínica (RI) e, conseqüentemente, do DM2 (5-7). Uma importante descoberta foi a de que, para o correto funcionamento desses receptores, é necessária a participação do cromo (Cr) (8).

O Cr é um mineral traço essencial para humanos e animais encontrado na natureza nas valências de -2 a +6. A forma mais comum desse nutriente é o

Cr^{+3} , que tem uma função preponderante no metabolismo de carboidratos, coatuando com a insulina e melhorando a tolerância à glicose (9,10), além de ter uma participação no metabolismo de lipídeos (11). O Cr está presente, em pequenas proporções, em alguns alimentos, como carne, cereais integrais, oleaginosas e leguminosas (12). Vários componentes da dieta, em diferentes proporções, podem interferir na absorção desse mineral, seja diminuindo-a (como é o caso do fitato, carboidratos simples (sacarose), do zinco, do ferro e do vanádio) seja aumentando-a (como fazem os aminoácidos, o oxalato, a vitamina C e o amido) (13). Em termos de suplementação alimentar, a forma mais biodisponível parece ser a do picolinato de cromo (PicCr), como sugerido em estudos com animais e com humanos (14-17).

Apesar de o Cr ser considerado um elemento essencial, não existe ainda uma Recommended Dietary Allowances (RDA) desse mineral, mas, sim, apenas valores de Adequate Intake (AI), ou seja, 25 e 35 $\mu\text{gCr}/\text{dia}$, para mulheres e homens, respectivamente. O Tolerable Upper Intake Level (UL) também não foi estabelecido (18). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece como nível seguro de ingestão o limite máximo de 1000 $\mu\text{g}/\text{dia}$ (19). Os estudos sobre o papel do Cr no metabolismo de carboidratos iniciaram em 1929, com a identificação, em leveduras, de um complexo orgânico de baixo peso molecular contendo Cr^{+3} , denominado fator de tolerância a glicose, ou GTF (20). Porém, o mecanismo pelo qual o Cr atua na sensibilidade a insulina só foi descoberto em 1989, quando foi identificado em humanos um oligopeptídeo, inicialmente denominado substância ligadora de cromo com baixo peso molecular (do inglês, *Low-molecular weight chromium-binding substance*- LMWCr) o qual, de modo, similar ao GTF, contém Cr^{+3} e atua no metabolismo da insulina. Como esse composto tinha semelhança com a calmodulina, foi nomeado apocromodulina, quando na forma livre de minerais, e cromodulina, quando ligado aos quatro íons de Cr^{+3} (8). Foi observado, então, que, após a insulina ligar-se à subunidade *alfa* de seu receptor na membrana plasmática da célula, ocorre uma maior mobilização do Cr (mediada pela transferrina) para a célula alvo. No espaço intracelular, esse mineral se liga á apocromodulina, tornando-a ativa, sob a forma de cromodulina. Na sequência, a cromodulina se liga ao receptor insulínico, completando a ativação deste e amplificando o sinal da insulina. Essa

sinalização, decorrente da ativação de uma cascata de fosforilações, subsequente à autofosforilação dos resíduos de tirosina na subunidade β do receptor de insulina, visa estimular a translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) para a membrana da célula (5, 21, 22) (Figura 1).

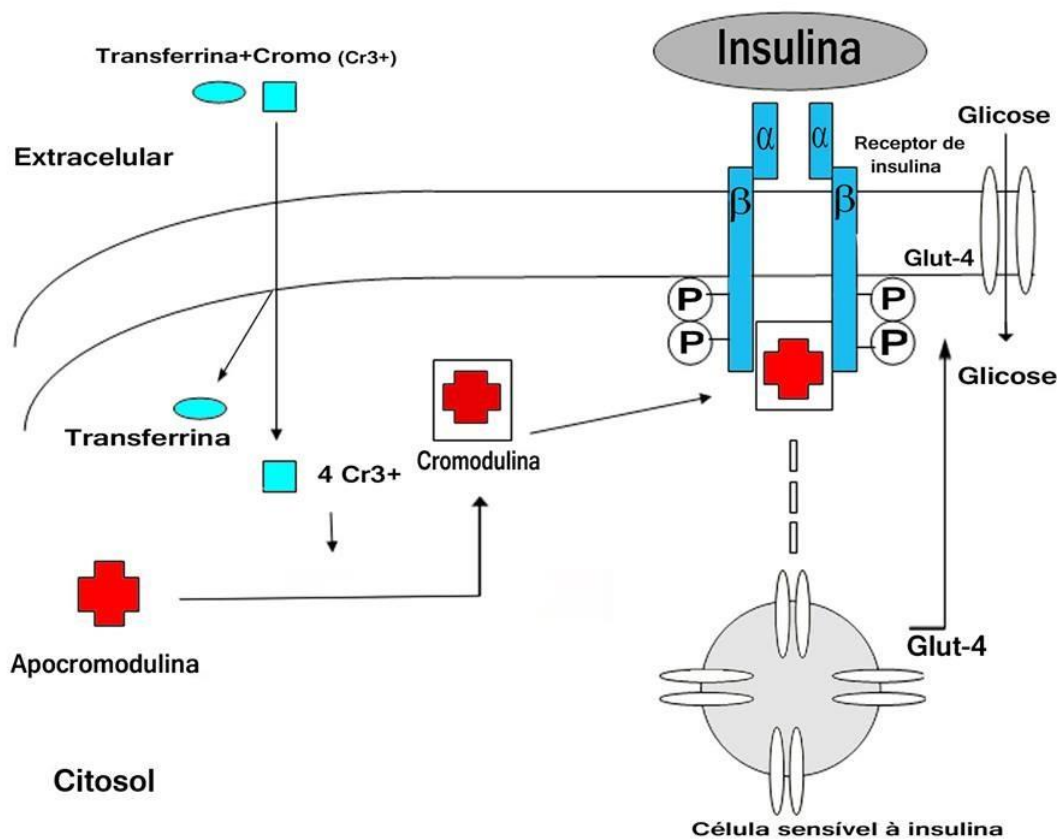


Figura 1- Mecanismo proposto para a participação do cromo na ação da insulina. FONTE: Adaptado de Fantinatti *et al.*(2009)

Cr^{3+} : cromo trivalente; $4 Cr^{3+}$: quatro íons de cromo trivalente; P: fosforilação da tirosina quinase; α : subunidade α do receptor extracelular da insulina; β : subunidade β do receptor transmembrana da insulina; GLUT- 4: transportador de glicose da série 4.

Apesar de este ser o mecanismo mais amplamente divulgado para explicar a atuação do Cr no metabolismo da glicose, não há confirmação ainda da estrutura química do LMWCR (23), nem sobre a existência de um peptídeo de ligação específica, ou se o Cr atua, enquanto íon, na cascata de sinalização insulínica. No entanto, apesar de não ser completamente compreendido, é consenso de que o Cr exerce um papel importante no metabolismo da glicose (24).

Nesta perspectiva, pressupõe-se que uma dieta deficiente desse mineral pode contribuir para desencadear e/ou agravar a DM2. Nesse sentido, tem sido demonstrado que, em indivíduos normoglicêmicos, a excreção de cromo aumenta concomitantemente o grau de resistência insulínica (25). E, em indivíduos portadores de DM, vêm sendo encontradas concentrações séricas de cromo significativamente menores que em pessoas saudáveis, sendo que a hiperglicemia parece levar tanto à diminuição das concentrações séricas de Cr como ao aumento da excreção urinária desse mineral (9, 26,27).

Diante desse quadro, diversos estudos vêm tentando investigar os efeitos da utilização do Cr no controle glicêmico de pacientes com DM (10,28-34). Face à diversidade de suplementos, dosagens e critérios utilizados na avaliação da resposta ao tratamento, embora haja alguns resultados promissores (35-37), ainda não foi possível chegar a um consenso sobre a suplementação com Cr como proposta terapêutica no tratamento de pacientes com DM. Ademais, além da resposta no controle glicêmico, são relatados outros efeitos decorrentes da suplementação com Cr, relativos ao metabolismo lipídico e a distribuição de gordura corporal.

Em alguns trabalhos, é relatada uma melhora nas concentrações de triglicerídeos e de colesterol plasmático, em indivíduos com dislipidemia, após a suplementação de Cr. Esse efeito tem sido creditado a uma provável inibição, pelo mineral, da enzima hepática hidroximetilglutaril-CoA-redutase (11, 37, 38). No entanto, em outros estudos não é encontrada nenhuma alteração do perfil lipídico de pacientes suplementados com Cr (32, 34, 36, 39, 40).

Também é relatada uma redução do peso corporal e da circunferência abdominal quando da utilização de suplementos com Cr (28, 41). Nessa perspectiva, sugere-se que o Cr pode atuar em glicorreceptores cerebrais sensíveis à insulina, suprimindo o apetite e estimulando a termogênese (42).

Essa melhora na sensibilidade à insulina também se refletiria em um menor acúmulo de gordura central (2, 43, 44), de grande importância para o tratamento da DM2, uma vez que a adiposidade na região central, especificamente uma maior quantidade de gordura intra-abdominal, ou visceral, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de DM, além de ser fator de risco independente para essa doença (45-47).

Outro aspecto investigado diz respeito ao possível papel do Cr na melhora do estresse oxidativo. No DM, o estado de constante hiperglicemia leva ao aumento da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), pela via do “estresse carbonílico”. Como resultado, há um aumento da geração de radicais livres, levando à geração do estresse oxidativo (48-50), um dos mecanismos responsáveis pelas complicações vasculares relacionadas ao diabetes (49-52), dentre outras consequências.

Nesse sentido, estudos sobre suplementação com Cr, realizados em portadores de DM2 e em animais, vêm encontrando resultados diversos, demonstrando uma diminuição em metabólitos relativos à peroxidação lipídica (14,53-56) além de resultados controversos em relação às enzimas dos sistemas antioxidantes endógenos (53-55). A hipótese dos pesquisadores é que, face a uma diminuição da glicemia plasmática, haveria diminuição da geração de radicais livres e, portanto, diminuição do estresse oxidativo.

Outro ponto importante a ser ressaltado em relação ao Cr é a interação dele com outros minerais, como, por exemplo, o ferro. Apesar de vários estudos referirem que não foram encontrados efeitos adversos com o uso da suplementação com Cr⁺³, é necessário cautela (10, 30, 35, 41, 54, 56-58). A suplementação isolada com Cr, em altas doses e por um longo período, pode conduzir a uma deficiência de ferro. O Cr é transportado no sangue pela transferrina, competindo com o ferro pelos sítios de ligação dessa proteína (59, 60), podendo, assim, comprometer o estado nutricional do indivíduo relativo ao metabolismo do ferro (58). Porém são escassos trabalhos, na literatura, no intuito de verificar essa condição (58, 61, 62).

Por outro lado, concentrações elevadas de ferritina vêm sendo observadas em pacientes com risco, histórico familiar ou diagnóstico de diabetes e/ou desordens associadas ao metabolismo da insulina, havendo indícios de que as interações entre a insulina e a ferritina são bidirecionais (63-68). Nesse sentido, a suplementação de Cr poderia beneficiar esses indivíduos, reduzindo a concentração de ferritina, tão comum em pacientes com diabetes.

2 JUSTIFICATIVA

O aumento da prevalência do DM bem como das complicações a ela associadas é um problema de saúde pública em todo o mundo. Assim, inúmeras estratégias e intervenções vêm sendo investigadas, buscando melhorar o manejo dessa doença, visando melhorar o prognóstico e minimizar complicações decorrentes do pobre controle glicêmico.

Nesta perspectiva, uma das alternativas que vem sendo investigada é a suplementação com Cr, um mineral que faz parte do oligopeptídeo denominado cromodulina, o qual atua na ativação e amplificação do sinal insulínico na célula. Assim, vem sendo postulado que pacientes com DM apresentam menor quantidade de Cr corporal e maior necessidade desse mineral, o que poderia interferir na sinalização e na homeostase glicêmica, piorando o quadro clínico do DM2. Entretanto os benefícios da suplementação com Cr em indivíduos com diabetes não estão conclusivamente demonstrados.

Desse modo, diante da importância do diabetes como problema de saúde pública, justifica-se a necessidade de mais estudos para investigar os efeitos da suplementação com Cr no controle glicêmico, no perfil lipídico, na composição corporal e no estresse oxidativo em indivíduos com DM2.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação oral de picolinato de cromo (PicCr) em pacientes com DM2.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito da suplementação com PicCr nos parâmetros de controle glicêmico e perfil lipídico.
- Avaliar os parâmetros de obesidade total e central, antes e após a suplementação.
- Identificar o *status* das defesas antioxidantes dos pacientes, nos dois momentos do estudo.
- Determinar as concentrações de Cr sérico dos pacientes, antes e após a suplementação com PicCr.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População e caracterização do estudo

A pesquisa caracteriza-se como um ensaio clínico, controlado, randomizado e unicego, com um grupo de pacientes de ambos os sexos, adultos e idosos, diagnosticados com DM2, atendidos no Ambulatório das Doenças Endócrinas e Metabólicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL/UFRN), na cidade do Natal-RN, durante o período de novembro de 2011 a maio de 2013.

Os pacientes foram selecionados no referido serviço, triados pela pesquisadora e pelo médico responsável, considerando os seguintes critérios de inclusão: ter diagnóstico de DM2 (conforme os critérios da ADA, 2011) (69); apresentar HbA1c maior ou igual a 7%; ter idade entre 30 e 70 anos; não ter utilizado suplementos vitamínicos e minerais nos últimos quatro meses. Como critérios de exclusão, foram definidos: ter diagnóstico de DM2, fazendo uso de insulina; ter diagnóstico de DM1; estar gestante ou lactante; ter diagnóstico de anemia, nefropatia, câncer, esteatohepatite não alcoólica, infecção ou alguma endocrinopatia (síndrome de Cushing, acromegalia, hipertireoidismo ou hipotireoidismo descompensado); utilizar medicamento corticoide.

O tamanho amostral foi calculado considerando-se a diferença a ser detectada de 2mg/dL, para a variável triglicérides, que apresentou menor diferença entre os grupos no estudo, e desvio padrão da diferença de 3mg/dL (70). O poder do teste foi considerado 80%, e o nível de significância 5%, devendo ser arrolados pelo menos 70 pacientes, divididos em dois grupos: controle e suplementado.

Dos 189 pacientes pré-selecionados, a princípio 98 foram excluídos, 91 randomizados e 71 completaram o estudo, (figura 2).

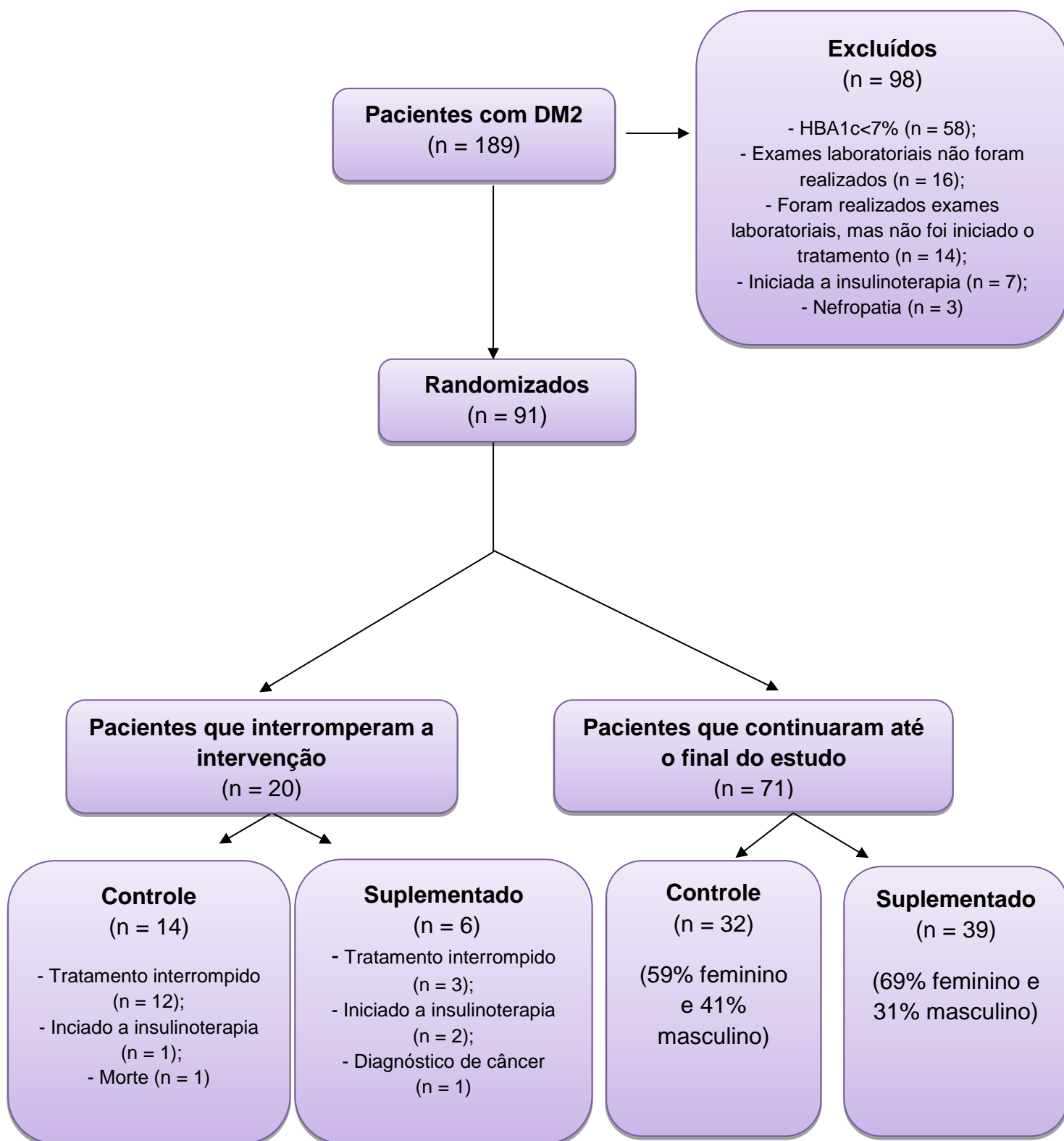


Figura 2: Fluxograma da seleção dos pacientes estudados

4.1.1 Aspectos éticos

O estudo foi realizado em conformidade com as diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, que constam na Resolução 196/96 e 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996) (71). Antes da execução, o trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do referido hospital (CAAE: 6510.0.000.294-10) (Apêndice 1). O estudo foi registrado na plataforma virtual Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (ReBEC) (www.ensaiosclinicos.gov.br), registro nº79nrx8.

4.1.2 Desenho do estudo

Os pacientes selecionados faziam parte da demanda habitual do Ambulatório de Doenças Endócrinas e Metabólicas e permaneceram utilizando sua medicação, inclusive, antidiabéticos orais (ADOs); além de receberem orientação nutricional voltada para o tratamento do DM.

Inicialmente (Tempo 0), foi realizada uma triagem, por meio de consulta dos prontuários dos pacientes, avaliando-se os critérios de inclusão e exclusão. Caso fosse selecionado, após a avaliação clínica o paciente era encaminhado para a pesquisadora. Após serem informados sobre os objetivos e os procedimentos do estudo, oralmente e por escrito, os pacientes que desejassem participar da pesquisa, manifestando sua concordância, assinavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

Após assinatura do TCLE, era preenchido o protocolo de pesquisa, que constava de informações gerais, hábitos sociais e de saúde, história clínica, avaliação dietética e antropométrica (Apêndice 2). Em seguida, eram solicitados os exames laboratoriais, para determinações bioquímicas, que avaliavam os seguintes parâmetros: glicemia de jejum (GJ); glicemia pós-prandial (GPP), hemoglobina glicada A1c (HBA1c), perfil lipídico - (colesterol total (CLT), LDL-colesterol (LDL-c), HDL-colesterol (HDL-c), triglicerídeos (TG); alanina aminotransferase (ALT); aspartato aminotransferase (AST); gama glutamil transferase (GGT); e microalbuminúria isolada); dosagens hormonais –tiroxina (T4livre), hormônio estimulador da tireoide (TSH); avaliação de marcadores antioxidantes, como: conteúdo de glutatona reduzida (GSH), atividade

enzimática da superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx); Cr sérico e sumário de urina (EAS). Esses exames foram realizados no primeiro momento, sendo utilizados para avaliação dos critérios de inclusão e exclusão. No início e após quatro meses de tratamento, foram realizados os seguintes exames: GJ, GPP, HBA1c, CLT, LDL-c, HDL-c, TG, ferritina, GSH, SOD, GPx, e Cr sérico. Realizados os primeiros exames laboratoriais, o paciente retornava ao ambulatório para avaliação dos resultados. Caso preenchesse todos os requisitos do protocolo de pesquisa, era incluído no estudo. A seguir, era realizado o sorteio, no qual o paciente escolhia um envelope, de forma aleatória, contendo o tipo de tratamento ao qual seria submetido: controle (recebendo placebo) ou suplementado (recebendo PicCr).

Após esse procedimento, era disponibilizado ao paciente um frasco com a primeira dose do tratamento, suficiente para 30 dias, e um plano alimentar (calculado de forma individualizada), conforme recomendações da ADA (2011) (69). Os pacientes retornavam ao ambulatório após 30, 60 90 e 120 dias, para avaliação de possíveis efeitos colaterais do tratamento e entrega de nova dose de suplemento ou placebo. Caso houvesse alguma intercorrência, era realizada uma nova avaliação clínica do paciente, com médico endocrinologista. Ao final dos 120 dias de tratamento, era realizada uma nova avaliação nutricional e de parâmetros laboratoriais, entregue a última orientação nutricional, e o paciente era encaminhado à nutricionista responsável pelo ambulatório de nutrição do hospital, para que fosse dada continuidade ao tratamento (Figura 3).

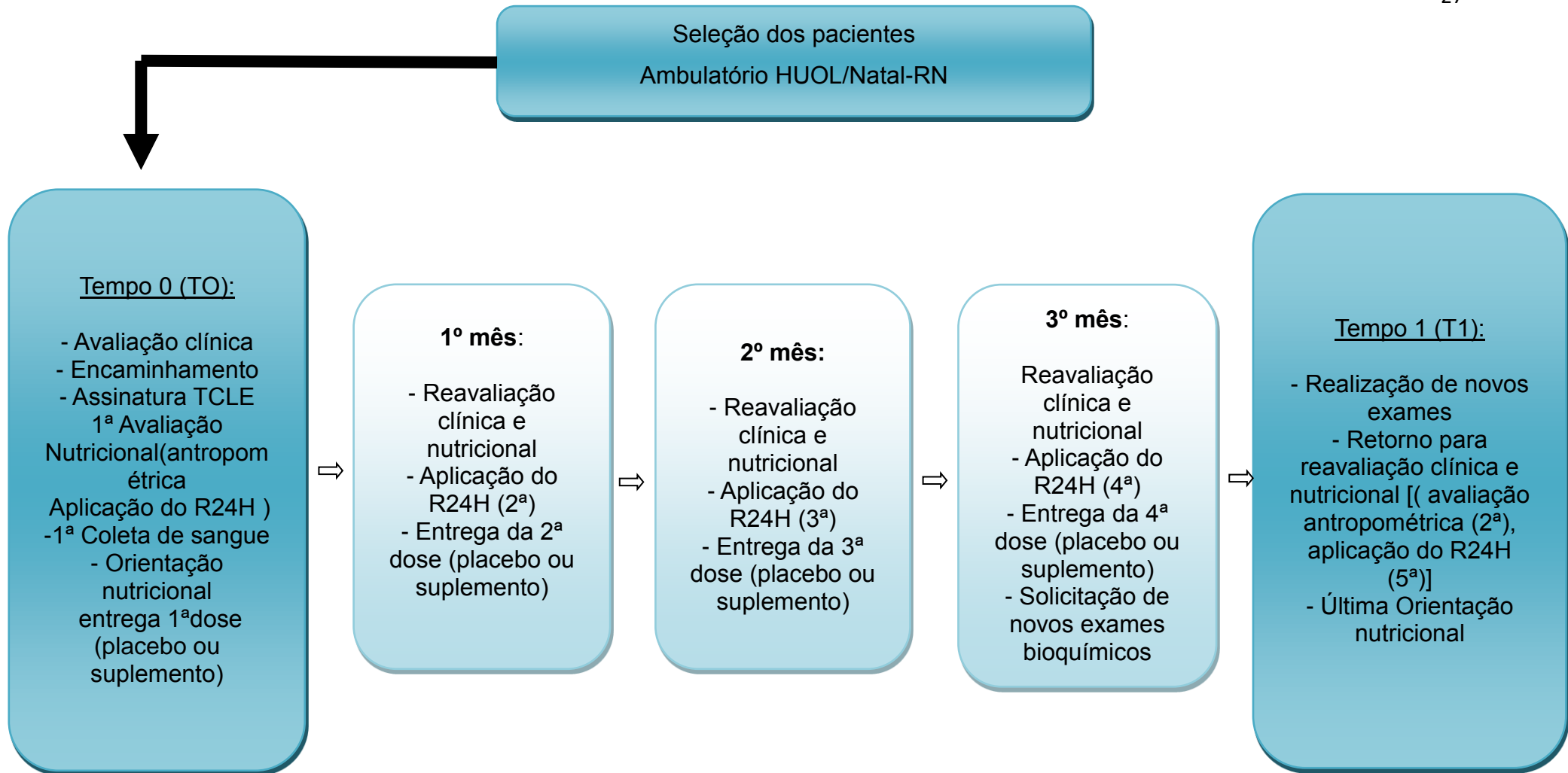


Figura3- Fluxograma de atividades desenvolvidas para seleção e acompanhamento dos pacientes

4.2 Suplementação Nutricional

Os suplementos e placebos foram manipulados, por profissional farmacêutico, em um estabelecimento regulamentado, "Companhia da Fórmula", em Natal-RN, Brasil. O PicCr foi fabricado pela HARIKA DRUGS, lote CHP/004/08/2015 (Telangana, Índia). Cada cápsula ingerida pelos pacientes do grupo suplementado continha 300µg de PicCr mais 120mg do excipiente [estearato de magnésio (SM Empreendimentos Farmacêuticos, São Paulo-SP-Brasil), aerosil (Gemini Indústria de Insumos Farmacêuticos Ltda., Anápolis-GO, Brasil), celulose microcristalina (Pharma Nostra Comercial Ltda, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) e lactose (Galena Química Farmacêutica Ltda. Campinas-SP, Brasil)]. Os pacientes do grupo Controle recebiam cápsulas contendo apenas 120mg de excipiente previamente descrita. As cápsulas utilizadas nos dois tratamentos eram idênticas em cor e tamanho.

Os pacientes recebiam um frasco com 60 cápsulas, quantidade suficiente para 30 dias, sendo orientados a ingerir uma cápsula duas vezes ao dia, uma após o desjejum e a outra após o jantar, totalizando 600µg de PicCr/dia. Essa dosagem foi estabelecida de acordo com a ANVISA, a qual mostra que doses de até 1000 µg de CrPic/d não causam efeitos adversos nos pacientes (19). Além disso, também foi conduzido um estudo piloto (dados não publicados), no qual diabéticos foram suplementados com 200 e 400 µg de CrPic/d, durante três meses, sendo encontrada apenas uma tendência a melhor controle glicêmico nos pacientes que recebiam 400µg de CrPic/d. Diante desses resultados, para o presente estudo, foi estabelecida a dosagem de 600 µg de CrPic/d, e o tempo de tratamento foi aumentado para quatro meses.

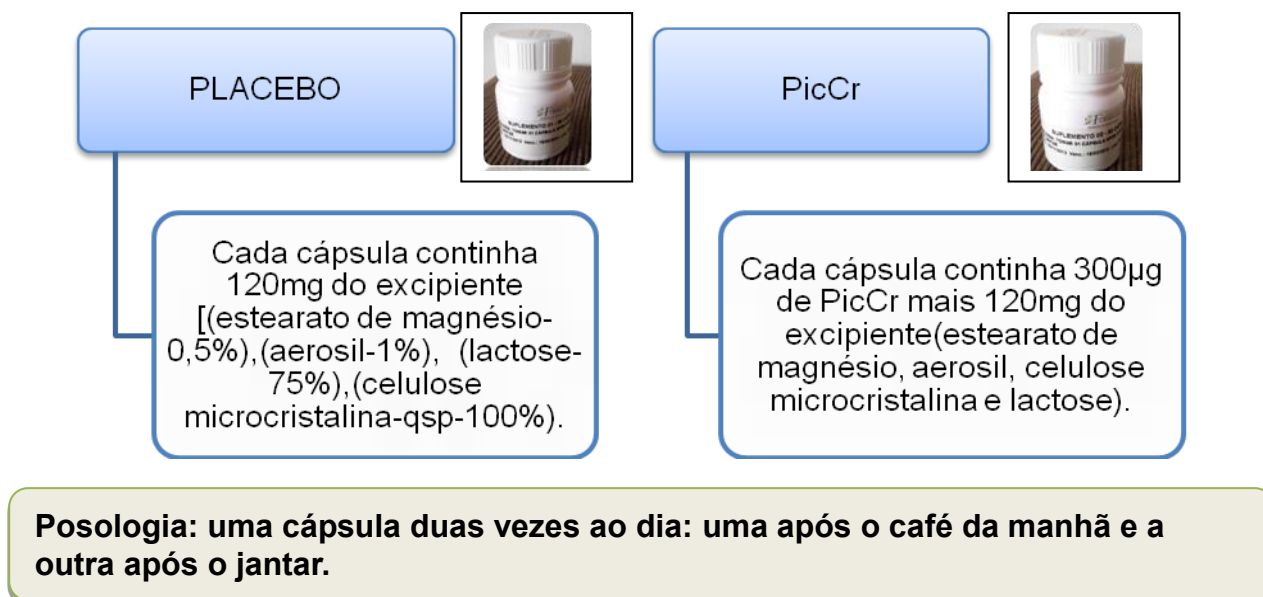


Figura 4 – Composição das cápsulas utilizadas: placebo e picolinato de cromo

4.3 Avaliação Nutricional

4.3.1 Avaliação antropométrica

O índice de massa corporal (IMC) foi utilizado para avaliar a composição da gordura corporal total, utilizando-se as medidas antropométricas peso (Kg) e altura (cm) ($\text{Kg}/\text{altura}^2$) e considerando-se os pontos de corte da WHO, 2004 (72) (Tabela 1). Para a obtenção do peso, foi utilizada uma balança eletrônica de plataforma da marca LIDER (modelo LD1050), com capacidade máxima de 200 Kg e mínima de 2 Kg - São Paulo, Brasil. A altura foi obtida por meio do estadiômetro acoplado a balança com capacidade para 2m e intervalo de 0,5cm, de acordo com as técnicas recomendadas pelo WHO, 1995 (73).

Tabela 1 - Classificação do IMC para adultos, segundo a WHO (2004)

Classificação	IMC (Kg/m²)
Magreza	< 18,5
Eutrófico	18,5 a 24,9
Sobrepeso	25,0 a 29,9
Obesidade Grau I	30,0 a 34,9
Obesidade Grau II	35,0 a 39,9
Obesidade Grau III	≥ 40

Os indicadores de obesidade abdominal utilizados no estudo foram: circunferência da cintura (CC) e índice de conicidade (IC). A medida da CC foi obtida no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Foram realizadas duas medidas consecutivas, utilizando-se o valor médio entre as duas. A leitura foi realizada no momento da expiração, utilizando-se uma fita inextensível, com aproximação a 0,1cm. Para classificação, foram considerados os pontos de corte de acordo com a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO) (74). (Tabela 2)

Tabela 2 – Pontos de corte estabelecidos pela ABESO para medida da circunferência abdominal e sua relação com o risco de doenças cardiovasculares

Sexo	Risco de doenças cardiovasculares	
	Aumentado	Muito aumentado
Homens	≥ 94 cm	≥ 102 cm
Mulheres	≥ 80 cm	≥ 88 cm

Para obter-se o IC, utilizaram-se as seguintes medidas antropométricas: CC (cm), peso (Kg), altura (m). Posteriormente, aplicou-se a equação (75):

$$IC = \frac{CC(\text{cm})}{0,109 \sqrt{\frac{\text{Pesocorporal}(\text{kg})}{\text{altura}(\text{m})}}}$$

Como parâmetro de classificação de obesidade central foi utilizado os seguintes valores: $\geq 1,25$ para homens e $\geq 1,18$ para mulheres até 49 anos e 1,22 a partir de 50 anos (75).

4.3.2 Avaliação dietética

Para avaliação do consumo alimentar, utilizou-se o método recordatório de 24 horas, que foi aplicado no primeiro momento e repetido três vezes, durante os retornos, totalizando quatro recordatórios por paciente.

Para auxiliar na estimativa das porções e dos utensílios, utilizou-se um registro fotográfico de alimentos e utensílios, elaborado a partir de registros publicados (76,77). Para análise das dietas, foi utilizado o programa o software Dietwin®. A avaliação da composição química dos alimentos foi realizada a partir do banco de dados do referido programa, complementado por dados provenientes de tabelas brasileiras (78,79), do *United States Department of Agriculture* (USDA, 2008) (80), e de rótulos dos produtos industrializados.

Para avaliação da ingestão dietética de cromo foi utilizada a média ajustada, para a variação intra-indivíduo, de três recordatórios alimentares de 24 horas, conforme as recomendações (81), para caracterizar o consumo durante o período da intervenção. A ingestão de cromo no período pré-intervenção foi avaliada a partir do primeiro recordatório, aplicado quando do arrolamento dos voluntários. Como parâmetro para avaliar a adequabilidade da ingestão de cromo, foram utilizados os valores propostos pelas *Dietary Reference Intakes* (DRI, 2006) (82), de acordo com o sexo e estágio de vida.

4.4 Parâmetros Laboratoriais

4.4.1 Obtenção da amostra biológica

As coletas de sangue foram realizadas antes de se iniciar o tratamento e 120 dias após. Em cada ocasião, foram coletados 20 mL de sangue, por

punção venosa a vácuo, após jejum de 10 a 12 horas, para a realização das dosagens bioquímicas, avaliação do *status* da defesa antioxidante e do cromo sérico. O sangue foi fracionado em quatro alíquotas (Figura 5). As alíquotas das que não eram analisadas no dia da coleta eram armazenadas em *freezer*, à temperatura de -80°C , para posterior análise.

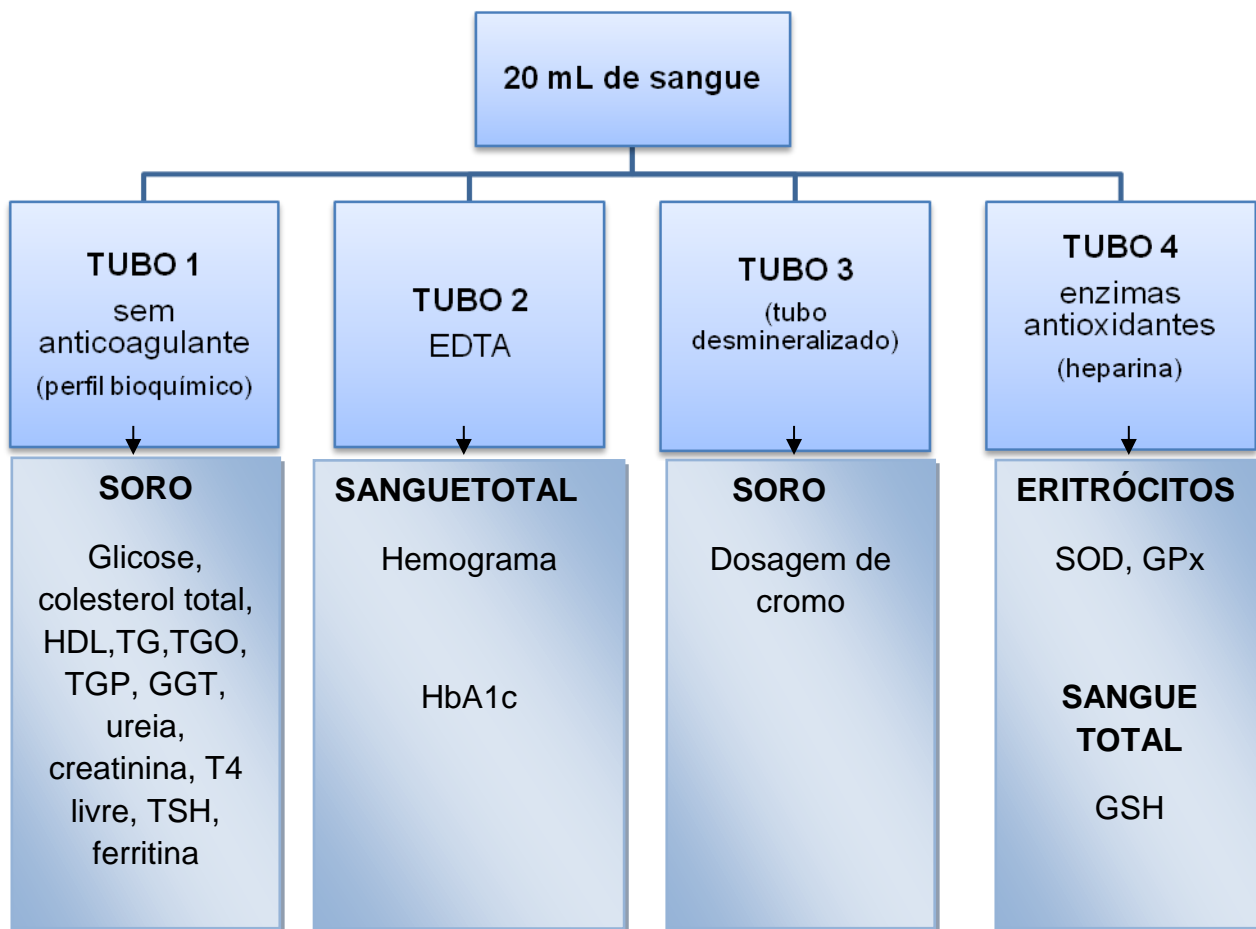


Figura 5 – Obtenção da amostra biológica

4.4.2 Análise Bioquímica

A glicemia de jejum e a pós-prandial foram avaliadas pelo método hexokinase/G-6PDH; a HbA1c pelo sistema fotométrico- imunoturbidimetria; o CLT pelo método *enzymatic*; o HDL-c pelo método *accelerator selective* detergente; O LDL-c pela fórmula de Friedwald: $\text{LDL} = \text{CLT} - (\text{HDL} - \text{TG}/5)$; quando as concentrações de TG eram menores que 400mg/dL, segundo a (ADA, 2013) (83); e o TG pelo glicerol fosfatase oxidase. ALT (alanina

aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) foram avaliadas pelo método enzimático, com detecção no UV. A gama glutamil transferase (GGT) foi quantificada usando-se o método de Szasz modificado. A creatinina e a ureia pelo método cinético, e ácido úrico, quantificado no soro usando-se o método enzimático. A microalbuminúria isolada foi mensurada em uma amostra de urina por imunoturbidimetria. Todas essas dosagens foram realizadas no aparelho ARCHITECT/AEROSSET 68000-Clinical Chemistrx (ABBOTT, Chicago-, USA), utilizando-se reagentes ABBOTT(Chicago-USA). A FeS foi dosada pelo método quimiluminescência, no aparelho ARCHITECT i 2000 SR(ABBOTT, Chicago-, USA), utilizando-se kit ferritina da ABBOT(Chicago-USA). T4 livre e TSH foram determinados por quimioluminescência no aparelho Immulite 2000, utilizando-se o kit da Siemens. Todos os exames foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes/UFRN. Os parâmetros bioquímicos para avaliação dos resultados do controle glicêmico e do lipídêmico seguiram as recomendações da SBD (2) (Tabela 3)

Tabela 3: Parâmetros de avaliação do controle glicêmico e do perfil lipídico em pacientes com DM2

Parâmetro	Glicemia jejum (mg/dL)	Glicemia pós-prandial (mg/dL)	HbA1c (%)	CLT (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	TG (mg/dL)
Valor de referência	< 110	< 140	< 7	< 200	>50 (mulheres) >40 (homens)	< 100	< 150

Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2014)

4.4.3 Determinação do Status das Defesas Antioxidantes - realizada no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde – UFRN.

4.4.3.1 Glutathiona Reduzida (GSH)

O conteúdo de GSH nos eritrócitos foi analisado utilizando-se a metodologia proposta pelo Beutler, Durom, Kelly (1963) (84). Amostras de sangue total (200 µL) eram adicionadas a 800 µL de TCA a 15%. Após centrifugação (4000 rpm/4°C/6 min), era retirada uma alíquota de 200 µL do sobrenadante e misturada com tampão fosfato 0,2 M, pH 8,0 (2,0 mL). No momento da leitura, acrescentavam-se 200 µL de DTNB 2,525 mM. Após homogeneização, a leitura era realizada, num tempo máximo de 3 min calculados a partir da absorbância em 412 nm (*UV-1650 PC Spectrophotometer UV-Visible; Shimadzu, Tokio, Japan*), utilizando-se o coeficiente de extinção de 14,1(84).

4.4.3.2 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

4.4.3.2.1 Preparação do hemolisado

Para determinação das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx), as amostras foram preparadas a partir de 5 mL de sangue total coletados com anticoagulante EDTA. Após a coleta e a separação do plasma, seguiram-se três lavagens com tampão fosfato pH 7,4 rotação de 3500rpm, a 4°C, durante 12 minutos, na centrífuga Supra® 21K (Alemanha). Os eritrócitos foram armazenados a -80°C até as análises.

4.4.3.2.2 Superóxido Dismutase- E.C. 1.1.15.1.1

A atividade foi realizada de acordo com Woolliams (1983) (85), empregando-se o Kit's comercial Ransod® (RANDOX laboratory, Country Antrim, UK). Nesse método, utiliza-se a xantina e a enzima xantina oxidase (XOD), a fim de se gerarem radicais superóxido, que, ao reagirem com duas moléculas de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de fenil tetrazólio (I.N.T.), formam o corante de formazan, de coloração vermelha. A atividade foi medida por espectrofotometria a 505 nm (Shimadzu-1650 PC UV-visível, Tóquio, Japão) e o resultado expresso em U / mg de Hb.

4.4.3.2.3 Glutationa Peroxidase - E.C. 1.6.4.2

A atividade da enzima GPx em eritrócitos foi determinada empregando-se o ensaio comercial Ransel® (RANDOX Laboratory, Country Antrim, UK),

que se baseia na técnica de Paglia, Valentine (1967) (86). Nesse ensaio, GPX catalisa a oxidação da GSH com hidroperóxido de cumeno. Na presença de GR e NADPH a glutatona oxidada (GSSG) é imediatamente convertida em sua forma reduzida com concomitante oxidação do NADPH a NADP+. A absorbância foi determinada a 340 nm (UV-Visível Shimadzu PC-1650, Tokyo, Japão), e a atividade foi expressa em U/mg de Hb.

4.4.4 Avaliação do cromo sérico

4.4.4.1 Procedimento de desmineralização

Toda vidraria e todo recipiente plástico utilizado na coleta de sangue e nas análises de minerais foram cuidadosamente desmineralizados em banho de ácido clorídrico 1N por 24 horas, em banho de EDTA a 0,1% por 24 horas e, após cada banho, eram enxaguados em água ultrapura (Milli-Q[®]) no mínimo três vezes, além de permanecer por mais 24h de molho para retirada dos resíduos.

4.4.4.2 Obtenção e análise da amostra

Após a coleta, a amostra foi centrifugada a 3500rpm durante 4 min. a 4°C. Posteriormente, do sobrenadante (soro), foram retiradas duas alíquotas de aproximadamente 1mL, e transferidas para dois tubos desmineralizados. Em seguida, as duas alíquotas foram armazenadas em um *freezer* a -20°C, permanecendo até a realização das análises. Para determinação da concentração do cromo sérico, empregou-se a metodologia: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP/MS), AGILENT 7700 (Santa Clara-CA, USA). Estas análises foram realizadas no Laboratório Sérgio Franco - Rio de Janeiro - RJ.

4.5 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada por meio do *software* SPSS, v. 19, IBM, sendo inicialmente realizada uma análise descritiva das variáveis. As variáveis qualitativas foram expressas em frequência simples e percentuais, e as quantitativas em média, desvio padrão ou mediana [quartil inferior-quartil superior] dependendo da normalidade dos dados. Para avaliar a normalidade na distribuição da população amostral foi utilizado o teste de Shapiro Wilk (87).

Como a amostra não apresentou distribuição normal foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras emparelhadas, para avaliação dos resultados antes e após a intervenção, dentro de cada grupo (controle e suplementado). Para comparar o resultado, ou a diferença das respostas da intervenção entre os grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, para amostras independentes. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5 ARTIGOS PRODUZIDOS

5.1 Artigo 1

O artigo "BENEFICIAL EFFECTS OF ORAL CHROMIUM PICOLINATE SUPPLEMENTATION ON GLYCEMIC CONTROL IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES: A RANDOMIZED CLINICAL STUDY" foi publicado no periódico *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* que possui fator de impacto 2.491, e Qualis B1 da CAPES para área de Medicina II.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jtemb

Beneficial effects of oral chromium picolinate supplementation on glycemic control in patients with type 2 diabetes: A randomized clinical study

Ana N. Paiva^{a,1}, Josivan G. de Lima^{b,2}, Anna C.Q. de Medeiros^{c,3},
Heverton A.O. Figueiredo^{d,1}, Raiana L. de Andrade^{d,1}, Marcela A.G. Ururahy^{e,1},
Adriana A. Rezende^{f,1}, José Brandão-Neto^{b,2}, Maria das G. Almeida^{f,*}

^a Post-Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Rua General Gustavo Cordeiro de Farias, S/N-Petrópolis, Natal-RN CEP 59012-570, Brazil

^b Department of Internal Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Avenida: Nilo Peçanha, 620, Petrópolis, Natal-RN CEP 59012-300, Brazil

^c Health Sciences College of Trairi, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN) Rua Trairi, S/N-Centro-Santa Cruz/RN, CEP 59200-000, Brazil

^d Graduate Student in the Department of Nutrition, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Av. Senador Salgado Filho, 3000 Lagoa Nova, Natal-RN CEP 59078-970, Brazil

^e Post Doctoral Fellow in the Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Rua General Gustavo Cordeiro de Farias, S/N-Petrópolis, Natal-RN CEP 59012-570, Brazil

^f Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Rua General Gustavo Cordeiro de Farias, S/N-Petrópolis, Natal-RN CEP 59012-570, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 November 2014

Received in revised form 7 May 2015

Accepted 26 May 2015

Keywords:

Type 2 diabetes mellitus

Chromium picolinate

Dyslipidemia

Dietary supplements

ABSTRACT

Background: Chromium is an essential mineral that contributes to normal glucose function and lipid metabolism. This study evaluated the effect of chromium picolinate (CrPic) supplementation in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Methods: A four month controlled, single blind, randomized trial was performed with 71 patients with poorly controlled (hemoglobin A1c [HbA1c] > 7%) T2DM divided into 2 groups: Control (n=39, using placebo), and supplemented (n=32, using 600 µg/day CrPic). All patients received nutritional guidance according to the American Diabetes Association (ADA), and kept using prescribed medications. Fasting and postprandial glucose, HbA1c, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, triglycerides and serum ferritin were evaluated.

Results: CrPic supplementation significantly reduced the fasting glucose concentration (−31.0 mg/dL supplemented group; −14.0 mg/dL control group; $p < 0.05$, post- vs. pre-treatment, in each group) and postprandial glucose concentration (−37.0 mg/dL in the supplemented group; −11.5 mg/dL in the control group; $p < 0.05$). HbA1c values were also significantly reduced in both groups ($p < 0.001$, comparing post- vs. pre-treatment groups). Post-treatment HbA1c values in supplemented patients were significantly lower than those of control patients. HbA1c lowering in the supplemented group (−1.90), and in the control group (−1.00), was also significant, comparing pre- and post-treatment values, for each group ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). CrPic increased serum chromium concentrations ($p < 0.001$), when comparing the supplemented group before and after supplementation. No significant difference in lipid profile was observed in the supplemented group; however, total cholesterol, HDL-c and LDL-c were significantly lowered, comparing pre- and post-treatment period, in the control group ($p < 0.05$).

* Corresponding author.

E-mail addresses: ananpaiva@gmail.com (A.N. Paiva), josivanlima@gmail.com (J.G.d. Lima), annacqm@yahoo.com.br (A.C.Q.d. Medeiros), figueiredoheverton@gmail.com (H.A.O. Figueiredo), raianalourengo.a@hotmail.com (R.L.d. Andrade), marcelaururahy@yahoo.com.br (M.A.G. Ururahy), adrirezende@yahoo.com (A.A. Rezende), brandao-neto@live.com (J. Brandão-Neto), mgalmeida84@gmail.com (M.d.G. Almeida).

¹ Tel.: +55 84 3342-9807.

² Tel.: +55 84 3342-9705/5048.

³ Tel.: +55 84 3291-2411.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2015.05.006>

0946-672X/© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Conclusions: CrPic supplementation had a beneficial effect on glycemic control in patients with poorly controlled T2DM, without affecting the lipid profile. Additional studies are necessary to investigate the effect of long-term CrPic supplementation.

© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease, resulting from progressive defects in insulin secretion and/or peripheral insulin resistance. The prevalence of poorly controlled diabetes remains a growing challenge, and is associated with micro- and macro-vascular alterations that may lead to severe complications and the development of co-morbidities. Thus, DM is considered a public health problem [1]. Even with advances in therapeutic interventions and lifestyle changes, the number of patients that cannot maintain glycemic control remains large [2].

In spite of controversies [3], chromium (Cr) supplementation has been studied as a co-adjunct diabetes therapy, due to its role in glucose/insulin metabolism [4]. Chromium may enhance insulin sensitivity by activating intracellular signaling pathways involved in glucose transporter 4 (GLUT4) translocation, consequently increasing glucose and amino acids transport [5,6]. Furthermore, Cr interferes with cholesterol metabolism, most likely by inhibiting the hepatic enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase [7]. Additionally, data suggests that patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) exhibited alterations in Cr metabolism, most likely due to increased Cr excretion as a result of glucose/insulin homeostasis imbalance [6,8,9].

Based on these data, administration of Cr as a supplement could improve glycemic parameters in patients with T2DM. Although the World Health Organization (WHO) [10] reported that doses from 125 to 200 µg/d might improve glucose and lipid control, Anderson [8] found that patients with T2DM showed a better response when receiving 400–600 µg Cr/d.

Thus, the present study investigated the effect of oral Cr picolinate (CrPic) supplementation (600 µg/d) in patients with poorly controlled T2DM (hemoglobin A1c [HbA1c] ≥ 7%).

2. Subjects and methods

2.1. Study population

Seventy-one patients participated in this study (Brazilian Clinical Trials Registry – ReBEC, Universal Trial Number 79nrx8). All participants (male and female) were adults diagnosed with T2DM, at the Clinical Endocrinology and Metabolic Diseases at University Hospital Onofre Lopes (HUOL), Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, Brazil.

Inclusion criteria were: T2DM diagnosis (according to American Diabetes Association, 2011) [11], hemoglobin A1c (HbA1c) ≥ 7% (characterization of poorly controlled diabetes, according to the goals for good glycemic control suggested by the ADA) [11], age from 30 to 70 years, and no use of Cr supplements within the 4 months prior to the study. Exclusion criteria included: patients with T2DM undergoing insulin treatment; type 1 DM (T1DM) diagnosis; pregnant or lactating women; diagnosis of anemia, nephropathy, cancer, steatohepatitis, infection, or other endocrinopathies (Cushing's syndrome, acromegaly, active hyperthyroidism and hypothyroidism); and patients undergoing corticosteroid therapy.

Approval from the Research Ethics Committee at University Hospital Onofre Lopes (HUOL) (Protocol number: 507/10) was obtained prior to the study. After being informed about the aims

and procedures of the study, all the participants provided written informed consent.

2.2. Study design

The study was a single blind, controlled, and randomized clinical trial. Sample size was calculated considering the difference to be detected in triglycerides (2 mg/dL), the parameter that presented the lower difference between the groups, with a standard deviation difference of 3 mg/dL. The power of the test was 80% and the significance level was 5%. Thus, at least a total of 70 patients should have been enrolled (distributed in 2 groups: supplemented and control) [12].

Oral anti-diabetic drugs (OADs) were administered during the supplementation period. The enrollment and procedures occurred from November 2011 to May 2013.

Selections using the medical records for patients scheduled that day were performed to evaluate the inclusion and exclusion criteria. If they met the criteria, clinical and nutritional evaluations, as well as blood analyses, were performed. The patients returned to the clinic for the analysis of the results and, if they met all the research protocol requirements, they were included in the study.

Next, randomization was performed. Each patient chose an unidentified envelope containing the type of treatment, placebo or CrPic. The patient received a bottle with the number of capsules required for the first 30 days of treatment (60 capsules/bottle), and a dietary plan (individually calculated, according to ADA (2011) [11] recommendations). The patients returned to the clinic after 30, 60, and 90 days for evaluation of possible treatment adverse effects and to receive another bottle of supplement or placebo in each time point (each patient received 4 bottles of capsules and took a total of 240 capsules at the end of the 120 days). In the case of any complications, a new clinical evaluation by an endocrinologist was performed. After 120 days of treatment, another nutritional evaluation and a blood collection was performed to determine laboratory parameters.

2.3. Nutritional supplementation

The CrPic supplement and placebo capsules were manufactured at the pharmacy *Companhia da Fórmula* (Natal-RN, Brazil). Each capsule consumed by the supplemented group contained 300 µg CrPic (HarikaDrugs, Telangana, India, lot CHP/004/08/2015) and 120 mg excipient (90 mg lactose [Galena Química Farmacêutica Ltda., Campinas-SP, Brazil]; 23.5 mg microcrystalline cellulose [Pharma Nostra Comercial Ltda., Rio de Janeiro-RJ, Brazil]; 1.2 mg aerosil [Gemini Indústria de Insumos Farmacêuticos Ltda., Anápolis-GO, Brazil]; and 0.5 mg magnesium stearate [SM Empreendimentos Farmacêuticos, São Paulo-SP, Brazil]). The capsules consumed by the control group contained 120 mg of the excipient. Both treatment capsules were identical in color, size, and shape.

The patients received a bottle with 60 capsules, a quantity sufficient for 30 days of treatment, and were directed to take one capsule twice a day, one after breakfast and another after dinner, for a total 600 µg CrPic/day. This dosage was established according to the literature that revealed doses up 1000 µg CrPic/day have no negative effects on patients [13]. Moreover, a pilot study with a dif-

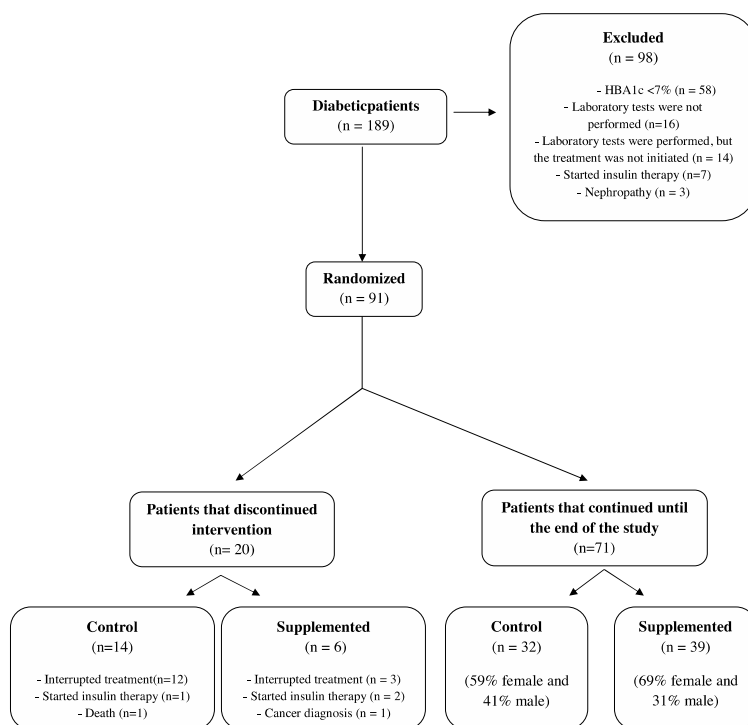


Fig. 1. Patients flow chart.

ferent group of patients was also performed (data not shown) for 3 months with 200 and 400 μg of CrPic/day. As treatment with 400 μg CrPic/day had better effects when compared to the control, however without statistical difference, a dosage of 600 μg CrPic/day was established and the treatment time was lengthened to 4 months.

2.4. Laboratory parameters

Blood samples (20 mL) were obtained after a 12 h fasting by vacuum venipuncture. Samples were collected at the first appointment and after 120 days of treatment.

Fasting and postprandial glycemia were evaluated by the hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase method; HbA1c by a photometry-immunoturbidimetry system; total cholesterol by an enzymatic method, high density lipoprotein cholesterol (HDL-c) by the detergent accelerator selective method; low density lipoprotein cholesterol (LDL-c) by the Friedewald formula ($\text{LDL} = \text{total cholesterol} - (\text{HDL-c} + \text{triglycerides}/5)$); and triglycerides by the glycerol phosphatase oxidase method. All the measurements were performed using ARCHITECT/AEROSET 68.000-Clinical Chemistry equipment, (ABBOTT, Chicago-IL, USA) and ABBOTT reagents. Serum ferritin was determined by a chemiluminescence method using ARCHITECT i2000SR equipment (ABBOTT), using ABBOTT reagents. All measurements were performed in the Clinical Analyses Laboratory at HUOL (Natal-RN, Brazil).

Serum chromium was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP/MS) using AGILENT 7700 series equipment (Santa Clara, CA, USA). These analyses were performed in the Sergio Franco Laboratory (Rio de Janeiro – RJ, Brazil).

2.5. Nutritional evaluation

Nutritional status was classified according to the WHO (2004) [14], using the body mass index (BMI) values, which were calculated using the formula: $\text{weight in kg}/(\text{height in cm})^2$. In order to assess the dietary intake, the 24h-recall method was used. Before the supplementation one recall was performed and to evaluate the patients after supplementation, the adjusted average of 3 recalls was calculated, according to the recommendations [15]. The diets were analyzed using the Dietwin software® [16]. The food chemical composition was obtained according to the Brazilian [17,18] and American [19] tables, and according to the Dietwin software® [16]. Chromium intake was evaluated as dietary reference intakes (DRI) [20].

2.6. Statistical analysis

Data was analyzed using SPSS software, v. 19 (IBM, Armonk, NY, USA). For descriptive statistics, nominal variables are presented as absolute frequencies and interval variables as median and interquartile range.

The Shapiro–Wilk test was performed to evaluate the normality of the distributions [21]. Since the distributions were not normal, nonparametric tests were used throughout. The Wilcoxon signed rank test was used before and after treatment for intra group comparisons. To evaluate the treatment effect, the differences between the control and supplemented groups with respect to the change from baseline of the study variables was tested by the Wilcoxon Mann–Whitney rank sum test.

Table 1
General characteristics of control and supplemented groups before the intervention.

Variable	Control (n = 32)	Supplemented (n = 39)	Total (n = 71)	p-Value
Age (years)	51.9 ± 7.6	55.9 ± 9.1	54.1 ± 8.6	NS
BMI (kg/m ²)	31.1 ± 6.1	32.2 ± 7.3	31.7 ± 6.8	NS
Gender (n)				
Male	13	12	25	NS
Female	19	27	46	
Time of disease (n)				
<5 years	23	20	43	NS
5–10 years	5	7	12	
>10 years	3	10	13	
Did not know	1	2	3	
Anti-diabetic drugs therapy (n)				
Biguanides	8	9	17	NS
Sulfonylureas	3	1	4	
Biguanides + sulfonylureas	20	26	46	
Other OAD	1	2	3	
No OAD	0	1	1	
Dyslipidemia (n)				
Diagnosis	17	30	47	NS
Treatment	16	24	40	NS
Life habits (n)				
Alcohol intake	3	3	6	NS
Smoking	1	1	2	NS
Physical activity	15	14	29	NS

Results are shown as mean ± standard deviation for age and BMI. Other results are expressed as number of subjects (n). Mann-Whitney (age and BMI) and Fisher exact (categorical variables) tests were used. Significance level adopted was $p < 0.05$. NS: not significant; BMI: body mass index; OAD: oral anti-diabetic drugs.

Differences with a p -value < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

From the 189 pre-selected patients, 91 were randomized and 71 completed the study (Fig. 1). Most of the subjects included in the study had T2DM for a maximum of 5 years (60.6%), used 2 OADs (64.8%), presented with dyslipidemia (66.2%), did not smoke (97.2%), did not consume alcoholic beverages (91.5%), and were not physically active (59.2%) (Table 1).

In Table 2, the results of the intervention on laboratory parameters are shown according to group. Statistical differences ($p < 0.05$, post- vs. pre-treatment, in each group) were found in fasting and postprandial glycemia, suggesting that CrPic has a positive effect on glycemic control. HbA1c was significantly reduced in both the control and the supplemented groups ($p < 0.001$). The HbA1c reduction in the supplemented group was significantly greater, compared to that in the control group ($p < 0.05$). Furthermore, 15 of 39 patients in the supplemented group reduced their OAD intake, 5 subjects required increased OAD doses, and 19 were unchanged. Among the 32 participants in the control group, 8 required an increase in OAD dose to maintain glucose control and 24 remained unchanged, with no reductions.

CrPic had no effect on the lipid profile. Although total cholesterol, HDL-c, and LDL-c levels were different before and after intervention in the control group, no significant difference was found when comparing the control and supplemented groups (Table 2).

Among all patients, 33.8% ($n = 24$) presented with hyperferritinemia. Of these patients, 41.7% ($n = 10$) were in the control group and 58.3% ($n = 14$) were in the supplemented group. Although a reduction ($p < 0.05$) in serum ferritin was found after supplementation, no difference was observed when comparing the groups (Table 2).

Overall, CrPic supplementation was well tolerated, with no major adverse effects. Moreover, serum Cr concentrations were sig-

nificantly increased in the Supplemented group when compared to the control group at the end of the intervention. Furthermore, Cr was increased when comparing patients in the supplemented group before and after treatment.

Before supplementation, nearly half of all subjects ($n = 32$) presented with Cr intake lower than that recommended by the DRI [20]. After supplementation, approximately one-third ($n = 26$) had lower chromium dietetic intake than recommended, although the difference was not significant, either between before and after intervention, or between supplemented and control subjects.

4. Discussion and conclusion

In the present study, a significant reduction ($p < 0.01$) in fasting and postprandial glucose was observed in the patients administered 600 μg CrPic/day over 4 months.

Hyperglycemia, especially postprandial hyperglycemia, has a direct and toxic effect on the vascular epithelium [22]. Evidences indicate that high glucose levels (2 h after food intake) are correlated with increased risk of cardiovascular diseases in populations with DM [23]. Besides improving glycemic control, the reduction of postprandial glycemia, shown in this study using CrPic can decrease the risk of cardiovascular disease, a frequent complication in poorly controlled DM patients.

Another important finding was the significant reduction ($p < 0.01$) in HbA1c in all tested subjects. HbA1c is an important parameter used to evaluate long-term glycemic control. A higher HbA1c indicates a higher risk of developing complications, including renal disease, neuropathy, and cardiovascular disorder [24,25]. The diminished HbA1c values in both groups were probably due to continued administration of anti-hyperglycemic agents and nutritional guidance in patients from both groups, which may have improved carbohydrate metabolism. However, when comparing the changes from baseline HbA1c values, the change was greater in the supplemented group than in the control group (-1.90% vs -1.00% ; $p < 0.05$).

Table 2
Biochemical parameters and chromium intake, before and after treatment of control and supplemented groups.

Variables	Control (n = 32)			Supplemented (n = 39)			Change from baseline		
	Baseline	Final	p-Value	Baseline	Final	p-Value	Control	Supplemented	p-Value
Fasting glucose (mg/dL)	163.5 (68.9)	145.0 (101.0)	NS	177.0 (48.5)	146.0 (50.0)	<0.001	-14.0 (54.0)	-31.0 (44.0)	0.022
Postprandial glucose (mg/dL)	260.0 (143.5)	221.5 (163.0)	NS	263.0 (159.5)	212.0 (116.0)	0.001	-11.5 (92.3)	-37.0 (12.0)	0.039
HbA1c (%)	8.15 (1.65)	7.35 (1.93)	<0.001	8.50 (2.55)	6.80 (1.52)	0.001	-1.00 (2.20)	-1.90 (2.10)	0.015
Total cholesterol (mg/dL)	192.5 (64.2)	179.5 (57.5)	0.006	197.0 (57.0)	183.0 (57.5)	NS	-10.5 (37.0)	-14.0 (54.0)	NS
HDL-c (mg/dL)	46.0 (14.0)	41.0 (15.5)	0.018	52.0 (13.5)	45.0 (11.0)	0.001	-3.00 (10.0)	-6.00 (15.0)	NS
LDL-c (mg/dL)	110.0 (46.6)	89.0 (52.3)	0.021	105.5 (47.7)	102.5 (48.7)	NS	-12.6 (53.2)	-5.00 (56.1)	NS
Triglycerides (mg/dL)	178.0 (83.0)	163.5 (101.2)	NS	180.0 (94.5)	166.0 (84.0)	NS	-3.50 (77.8)	-4.00 (71.0)	NS
Ferritin (ng/mL)	161.0 (208.1)	152.0 (188.3)	NS	139.3 (192.3)	131.0 (181.7)	0.011	-5.99 (41.1)	-11.75 (59.3)	NS
Serum chromium (µg/dL)	0.53 (0.18)	0.48 (0.10)	NS	0.49 (0.11)	0.74 (0.20)	<0.001	0.48 (0.10)	0.74 (0.19)	<0.001
Chromium dietetic intake (µg/day)	36.0 (51.7)	25.5 (37.0)	NS	32.8 (19.9)	29.3 (20.6)	NS	-1.06 (35.9)	-0.74 (38.2)	NS

Results are shown as median (interquartile range). Wilcoxon test was used to evaluate the differences in each group before and after the treatment. Mann-Whitney test was used to compare both groups after treatment. Significant p-values (<0.05) are shown in bold. NS: not significant; HbA1c: hemoglobin A1c; HDL-c: high-density lipoprotein, LDL-c: low-density lipoprotein.

Our results are similar to those found by Anderson et al. [13], which demonstrated a significant reduction in fasting and postprandial glycemia, and HbA1c values in patients with T2DM with poor glycemic control (HbA1c: 8–12%), supplemented with 1000 µg CrPic/day, a greater dose than used in our study, after 2 and 4 months of treatment. However, those patients [13] presented with lower BMI (24.8–25 kg/m²) than the patients from the present study. Moreover, none of the patients evaluated in the present study used traditional Chinese medicines, which differed from the Anderson et al.'s study [13], and may have influenced the results.

In their study, evaluating patients with T2DM, Martin et al. [26] also showed significant reductions in HbA1c and fasting glucose values after 6 months following supplementation with 1000 µg CrPic and sulfonylurea, as compared to patients treated with sulfonylurea alone.

However, a different study [27] that evaluated treatment with 600 µg CrPic associated with biotin over 30 days in patients with poorly controlled T2DM showed a beneficial effect only when measuring postprandial glycemia within 30 min of the oral glucose tolerance test. Furthermore, another study [28] testing the same association (600 µg of CrPic and biotin) over 90 days found a significant reduction in fasting glycemia and HbA1c in patients with T2DM, overweight, obesity, and poor glycemic control. Recent studies [29–31], using other forms of oral Cr supplementation, such as Cr yeast, also showed diminished fasting glycemia and HbA1c values. Thus, the reduction observed after co-treatment with ADOs and CrPic is probably due to improved glycemic control, as evidenced in other studies and described in a review paper [32].

Several possibilities are being studied in order to explain the role of Cr in glucose/insulin metabolism. The most promising possibility is the role of Cr in glucose transporters, like GLUT-4. Although the mechanisms of Cr action are unclear, it seems to stimulate the activity of insulin receptor kinases in the plasma membrane, triggering a signaling pathway that culminates in GLUT4 translocation and insulin signaling amplification [5,6]. Besides its role in enhancing receptor phosphorylation, Cr may also enhance insulin receptor mRNA synthesis and increase the synthesis of insulin-like growth factor receptors, which are able to functionally replace failing insulin receptors [33].

In addition to its role in glucose metabolism, it has been shown [29,34] that Cr supplementation could improve the lipid profile, primarily in relation to triglycerides. However, in spite of better glycemic control in the present study, we did not observe differences in the total cholesterol, HDL-c, LDL-c, and triglyceride levels after CrPic treatment as compared to the control. These results are similar to other studies, which evaluated the effect of Cr supplementation on lipid profile [35–37].

The results of the lipid profile evaluation may be in part explained by the fact that not all of the patients presented with dyslipidemia (33.8%), as suggested by Albarracín et al. [28]. Another possible confounding factor was lipid-lowering drug treatments. Although the supplemented group had a larger number of patients with dyslipidemia, only 80% of the patients in this group used lipid-lowering drugs, whereas 94.1% of the patients from the control group used the same drug class. Thus, further studies testing different doses and time periods are necessary to better evaluate the effect of Cr supplementation on lipid metabolism in patients with DM.

In spite of dietary counseling, a large percentage of patients (36.6%) had Cr intake levels lower than recommended [20]. These results are in accordance with the literature [38], which describes the difficulties in achieving the dietary Cr intake goals, particularly due to the predominance of processed food in the diet and, variations in the bioavailability of this nutrient. Therefore, increased plasma chromium in the supplemented group was likely due to supplement consumption, and not to the increased dietary intake.

A significant reduction ($p < 0.05$) in serum ferritin was observed in the supplemented group; however, there was no difference in this parameter when comparing both groups. Although it is not possible to draw any conclusions regarding these findings, as no other iron-related parameters were evaluated, further investigations are necessary to evaluate the influence of Cr on iron metabolism.

Serum ferritin is commonly used as a marker of iron stores, and a negative correlation between serum ferritin and insulin sensitivity has been reported [39]. Further, patients with DM are more prone to high concentrations of ferritin compared to patients without DM [39,40]. This can be explained by the fact that iron metabolism is bidirectional, i.e., as iron affects glucose metabolism and glucose metabolism may also influence iron metabolism [41]. In addition,

iron stores may interfere with hepatic insulin extraction, leading to peripheral hyperinsulinemia [39]. Furthermore, data suggests that iron may catalyze the formation of reactive oxygen species, altering insulin sensitivity to its receptor and providing a pro-inflammatory state [42].

Evidence regarding the adverse effects of CrPic supplementation on iron status in humans is still contradictory [43,44], sometimes showing a reduction in the mineral status, mainly due to decreased serum ferritin [45]. This is likely due to competition between Cr and iron for the same binding site in transferrin, interfering in its transport and use [43].

Thus, our results indicate that CrPic has a beneficial effect on glycemic control in patients with poorly controlled T2DM. Thus, CrPic may be a promising possibility for co-adjunct therapy in T2DM. Nevertheless, CrPic did not influence the lipid profile. In addition, although no major adverse events were observed, further studies are necessary to investigate the effect of Cr supplementation after long-term administration, particularly regarding iron metabolism. The study of the multi-element profiles, including major and trace element concentrations, in different biological matrices, could provide additional evidence for the role of chromium in human T2DM.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

We thank all the physicians, nurses, and hospital staff at HUOL/UFRRN who were involved in the study. We are grateful to all the patients who gave their consent and participated in the study. We are thankful to the Manipulation Pharmacy Companhia da Fórmula who donated the chromium picolinate supplement. We also thank the technical support provided by the Nutrition Undergraduate students, who collaborated with us in this research.

References

- [1] International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*, 6th ed., IDF, 2013.
- [2] G.M. Singer, J. Geohas, The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial, *Diabetes Technol. Ther.* 8 (2006) 636–643.
- [3] G.W. Landman, H.J. Bilo, S.T. Houweling, N. Kleefstra, Chromium does not belong in the diabetes treatment arsenal: current evidence and future perspectives, *World J. Diabetes* 5 (2014) 160–164.
- [4] Z.Q. Wang, W.T. Cefalu, Current concepts about chromium supplementation in type 2 diabetes and insulin resistance, *Curr. Diabetes Rep.* 10 (2010) 145–151.
- [5] S. Lewicki, R. Zdanowski, M. Krzyzowska, A. Lewicka, B. Debski, M. Niemcewicz, et al., The role of chromium III in the organism and its possible use in diabetes and obesity treatment, *Ann. Agric. Environ. Med.* 21 (2014) 331–335.
- [6] J.B. Vincent, Chromium celebrating 50 years as an essential element? *Dalton Trans.* 39 (2010) 3787–3794.
- [7] M.R. Gomes, M.M. Rogero, J. Tirapegui, Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico, *Rev. Bras. Med. Esporte.* 11 (2005) 262–266.
- [8] R.A. Anderson, Chromium and insulin resistance, *Nutr. Res. Rev.* 16 (2003) 267–275.
- [9] K.N. Jeejeebhoy, R.C. Chu, E.B. Marliss, G.R. Greenberg, A. Bruce-Robertson, Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition, *Am. J. Clin. Nutr.* 30 (1977) 531–538.
- [10] Organização Mundial de Saúde (OMS), *Cromo*. In: *Elementos traço na nutrição e saúde humanas*, OMS, São Paulo: Rocca, 1998, pp. 135–138.
- [11] Standards of medical care in diabetes—2011, *Diabetes Care*, 2011, 34 (Suppl 1), S11–61.
- [12] P. Armitage, G. Berry, The planning of statistical investigations, in: *Statistical Methods in Medical Research*, 2nd ed., Blackwell, Oxford, 1987, pp. 179–185.
- [13] R.A. Anderson, N. Cheng, N.A. Bryden, M.M. Polansky, N. Cheng, J. Chi, et al., Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes, *Diabetes* 46 (1997) 1786–1791.
- [14] World Health Organization, *Obesity: preventing and managing the global epidemic Report of a WHO Consultation*, WHO Technical Report Series 894, 2, WHO, 2004, pp. 6–15.
- [15] IOM, *Dietary Reference Intakes: Application in Dietary Assessment*, National Academic Press, Washington, D.C., 2000.
- [16] C.S. Reinstein, *DIETWIN [computer program]*, Versão Profissional 2011, Porto Alegre (RS), 2011.
- [17] A.B.V. Pinheiro, E.M.A. Lacerda, E.H. Benzecry, M.C.S. Gomes, V.M. Costa, *Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras*, 4th ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2000.
- [18] *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/NEPA – UNICAMP*, 4th ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011.
- [19] United States Department of Agriculture (USDA), U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. Nutrient Data Laboratory Home Page, 2008. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.
- [20] Institute of Medicine, *Dietary Reference Intakes: for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*, National Academy Press, Washington, D.C., 2001.
- [21] A. Field, *Descobrimos a estatística usando o Spss*, 2 ed., Porto Alegre: Artmed, 2009.
- [22] M. Brownlee, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature* 414 (2001) 813–820.
- [23] J.B. Meigs, D.M. Nathan, R.B. D'Agostino, P.W. Wilson, Fasting and postchallenge glycemia and cardiovascular disease risk: the Framingham Offspring Study, *Diabetes Care* 25 (2002) 1845–1850.
- [24] M. Monami, J.E. Adalsteinsson, C.M. Desideri, B. Raggianti, I. Decembrini, E. Mannucci, Fasting and post-prandial glucose and diabetic complication, a meta-analysis, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 23 (2013) 591–598.
- [25] Standards of medical care in diabetes—2014, *Diabetes Care*, 2014, 37 (Suppl 1) S14–80.
- [26] J. Martin, Z.Q. Wang, X.H. Zhang, D. Wachtel, J. Volaufova, D.E. Matthews, et al., Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes, *Diabetes Care* 29 (2006) 1826–1832.
- [27] G.M. Singer, J. Geohas, The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial, *Diabetes Technol. Ther.* 8 (6) (2006) 636–643.
- [28] C.A. Albarracín, B.C. Fuqua, J.L. Evans, I.D. Goldfine, Chromium picolinate and biotin combination improves glucose metabolism in treated, uncontrolled overweight to obese patients with type 2 diabetes, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24 (2008) 41–51.
- [29] S. Sharma, R.P. Agrawal, M. Choudhary, S. Jain, S. Goyal, V. Agarwal, Beneficial effect of chromium supplementation on glucose, HbA1c and lipid variables in individuals with newly onset type-2 diabetes, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25 (2011) 149–153.
- [30] J. Ráček, C.D. Sindberg, S. Moesgaard, J. Mainz, J. Fabry, L. Müller, et al., Effect of chromium-enriched yeast on fasting plasma glucose, glycated haemoglobin and serum lipid levels in patients with type 2 diabetes mellitus treated with insulin, *Biol. Trace Elem. Res.* 155 (2013) 1–4.
- [31] M.H. Lai, Antioxidant effects and insulin resistance improvement of chromium combined with vitamin C and e supplementation for type 2 diabetes mellitus, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 43 (2008) 191–198.
- [32] C.L. Broadhurst, P. Domenico, Clinical studies on chromium picolinate supplementation in diabetes mellitus—a review, *Diabetes Technol. Ther.* 8 (2006) 677–687.
- [33] N. Wiernsperger, J. Rapin, Trace elements in glucometabolic disorders: an update, *Diabetol. Metab. Syndr.* 2 (2010) 1–9.
- [34] S.M. Bahijiri, S.A. Mira, A.M. Mufti, M.A. Ajabnoor, The effects of inorganic chromium and brewer's yeast supplementation on glucose tolerance, serum lipids and drug dosage in individuals with type 2 diabetes, *Saudi Med. J.* 21 (2000) 831–837.
- [35] E. Krol, Z. Krejpcio, H. Byks, P. Bogdanski, D. Pupek-Musialik, Effects of chromium brewer's yeast supplementation on body mass, blood carbohydrates, and lipids and minerals in type 2 diabetic patients, *Biol. Trace Elem. Res.* 143 (2011) 726–737.
- [36] M.M. Guimarães, A.C. Martins Silva Carvalho, M.S. Silva, Chromium nicotinate has no effect on insulin sensitivity, glycemic control, and lipid profile in subjects with type 2 diabetes, *J. Am. Coll. Nutr.* 32 (2013) 243–250.
- [37] N. Iqbal, S. Cardillo, S. Volger, L.T. Bloedon, R.A. Anderson, R. Boston, et al., Chromium picolinate does not improve key features of metabolic syndrome in obese nondiabetic adults, *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 7 (2009) 143–150.
- [38] R.A. Anderson, Chromium as an essential nutrient for humans, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 26 (1997) S35–S41.
- [39] B. Batchuluun, T. Matsumata, N. Erdenebileg, G. Tsaagaantsooj, K. Boldbaatar, A. Khasag, Serum ferritin level is higher in poorly controlled patients with Type 2 diabetes and people without diabetes, aged over 55 years, *Diabet. Med.* 31 (2013) 419–424.
- [40] L.H. Dekker, M. Nicolaou, A.D. van der, W.B. Busschers, L.M. Brewster, M.B. Snijder, et al., Sex differences in the association between serum ferritin and fasting glucose in type 2 diabetes among South Asian Surinamese, African Surinamese, and ethnic Dutch: the population-based SUNSET study, *Diabetes Care* 36 (2013) 965–971.

- [41] L. Sun, G. Zong, A. Pan, X. Ye, H. Li, Z. Yu, et al., Elevated plasma ferritin is associated with increased incidence of type 2 Diabetes in middle-aged and elderly Chinese adults, *J. Nutr.* 143 (1) (2013) 459–465.
- [42] M. Silva, *Participação e homeostase do ferro no diabetes tipo 1 em modelos animais* [Thesis], Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto, 2011.
- [43] H.C. Lukaski, A.J. Williams, Siders, G.P. James, Chromium picolinate supplementation in women: effects on body weight, composition, and iron status, *Nutrition* 23 (2007) 187–195.
- [44] W.W. Campbell, J.L. Beard, L.J. Joseph, S.L. Davey, W.J. Evans, Chromium picolinate supplementation and resistive training by older men: effects on iron-status and hematologic indexes, *Am. J. Clin. Nutr.* 66 (1997) 944–949.
- [45] H.C. Lukaski, W.W. Bolonchuk, W.A. Siders, D.B. Milne, Chromium supplementation and resistance training: effects on body composition, strength, and trace element status of men, *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1996) 954–965.

5.2 Artigo 2

O artigo "CHROMIUM PICOLINATE EFFECTS ON ANTHROPOMETRIC PARAMETERS AND ANTIOXIDANT PROFILE IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS" está em fase final de formatação e será submetido para publicação no periódico *International Journal of Obesity*, que possui fator de impacto 5.004, e Qualis A1 da CAPES para área de Medicina II.

Authors:

Ana N. Paiva¹, Josivan G. de Lima², Anna C. Q. de Medeiros³; Andressa S. de B. Araújo⁴; Andressa N. L. de Melo⁴ L. Marcela A G Ururahy⁵; Adriana A. de Rezende⁶; Maria G. Almeida^{6,*}

¹ Post-Graduate Program in Health Sciences, The Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, Brazil

² Department of Internal Medicine, The Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, Brazil

³ Health Sciences College of Trairi, The Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Santa Cruz-RN, Brazil

⁴ Department of Nutrition, The Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, Brazil

⁵ Post doctoral fellow in the Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, The Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, Brazil

⁶ Department of Clinical and Toxicological Analyses, The Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, Brazil

*Corresponding author:

Maria das Graças Almeida

Department of Clinical and Toxicological Analyses, The Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN). Rua General Gustavo Cordeiro de Farias, S/N- Petrópolis, Natal-RN, Brazil, CEP 59012-570, E-mail: mgalmeida87@gmail.com, Phone: +55 (84) 3342-9807, Fax: +55 (84) 3342-9733

CHROMIUM PICOLINATE EFFECTS ON ANTHROPOMETRIC PARAMETERS AND ANTIOXIDANT PROFILE IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

The present study aimed to evaluate the effect of Chromium picolinate (PicCr) supplementation on anthropometric parameters and antioxidant profile in patients with Type 2 diabetes mellitus (T2DM). A placebo-controlled, randomized and single blind trial was performed with 71 patients with T2DM and poor glycemic control (Hemoglobin A1c \geq 7%), of both sexes, divided in 2 groups: control (n = 32) and supplemented (n = 39, receiving 600 μ g/day of CrPic), during 4 months. Waist circumference (WC), conicity index (CI), bone mass index (BMI) and antioxidant profile – reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) – parameters were evaluated. All the patients received nutritional counseling and kept using the prescribed drugs. Wilcoxon and Mann-Whitney tests were used to evaluate the data. A significance level of $p < 0.05$ was adopted. CrPic supplementation reduced significantly CC ($p = 0.037$) and CI ($p = 0.016$) parameters. No difference was found in the antioxidant enzymes activity and GSH content when comparing both groups. CrPic had a benefic effect on central obesity parameters in patients with T2DM. However, did not affect the antioxidant profile parameters evaluated.

Keywords: Type 2 Diabetes mellitus, total antioxidant status, chromium, visceral obesity

Study Registry number: 79nrx8 (Brazilian Clinical Trials Registry – ReBEC: www.ensaiosclinicos.gov.br)

ABBREVIATIONS:

ACC1 (Acetyl CoA Carboxylase 1); ADA (American Diabetes Association); BMI (Body Mass Index); CI (Conicity Index); CrPic (Chromium picolinate); GPx (Glutathione Peroxidase); GSH (Reduced Glutathione); HbA1c (Glycated hemoglobin A1c); HUOL (University Hospital Onofre Lopes); OADs (Oral anti-diabetic drugs); SOD (Superoxide Dismutase); T1DM (Type 1 *Diabetes Mellitus*); T2DM (Type 2 *Diabetes Mellitus*); UFRN (Federal University of Rio Grande do Norte); WC (Waist circumference).

INTRODUCTION

Chromium (Cr) is a trace element essential to mammals, whose deficiency has been associated to insulin sensitivity alterations similar to those found in central obesity, and to an increased risk of glucose intolerance and Type 2 diabetes mellitus (T2DM) development (1).

Recently Cr importance to obese and elderly patients has been investigated, since these groups of patients are prone to present reduced serum levels of this mineral (1). Another pathophysiologic aspect in common in these two groups of patients is the increased generation of free radicals (2).

In this perspective, the effect of Cr supplementation in patients with diabetes, regarding central and total obesity parameters (3,4) and oxidative stress (5) has been investigated, however, the results remain inconclusive.

Thus, the present study aimed to investigate the effect of chromium picolinate (CrPic) supplementation on obesity and antioxidant profile parameters in patients with poorly controlled T2DM.

SUBJECTS AND METHODS

This is a placebo-controlled, randomized and single blind clinical trial, including both sexes individuals, adults or elderly, with T2DM diagnosis who attended the Clinical Endocrinology and Metabolic Diseases Clinics at University Hospital Onofre Lopes (HUOL), in Natal-RN, Brazil.

The study was performed from November 2011 to May 2013, was approved by the Ethics in Research Committee of HUOL (Protocol number 507/10) and all the participants given their written informed consent to participate.

Inclusion criteria were: T2DM diagnosis (according to the American Diabetes Society criteria in 2011) (6), hemoglobin A1c (HbA1c) $\geq 7\%$, and no use of vitamin and minerals within the 4 months prior to the study. Exclusion criteria were: insulin treatment, pregnant or lactating women, patients undergoing corticosteroid therapy; and diagnosis of anemia, nephropathy, cancer, non-alcoholic steatohepatitis, infection, or other endocrinopathies (Cushing's syndrome, acromegaly, active hyperthyroidism and hypothyroidism).

After an initial evaluation, by medical records analyses, the patients were submitted to a clinical, laboratory and nutritional evaluation. If they fulfilled all the protocol criteria they were included in the study, being randomly allocated in one of the study groups (Control or Supplemented).

The patients returned to the clinic 30, 60, 90 and 120 days after the beginning of the intervention for evaluation of possible treatment side effects and to receive another bottle of supplement or placebo. After 120 days of treatment, a new evaluation of the anthropometric and laboratory parameters was performed. All the patients kept taking their prescribed drugs, including oral anti-diabetic drugs (OADs). They also received nutritional counseling and a dietary plan calculated according to ADA (6) recommendations during the entire study period.

The capsules of supplement or placebo, same color and size, were manufactured at the pharmacy "Companhia da Fórmula" (Natal-RN, Brazil). Each capsule of supplement contained 300 μ g of CrPic (Harika Drugs, Telengana, India) and 120 mg excipient (magnesium stearate [SM Empreendimentos Farmacêuticos, São Paulo, Brazil], aerosil [Gemini Indústria de Insumos Farmacêuticos Ltda., Anápolis, Brazil], microcrystalline cellulose [Pharma Nostra Comercial Ltda., Rio de Janeiro, Brazil] and lactose [Galena Química Farmacêutica Ltda., Campinas, Brazil]). The patients from

control group received placebo capsules, containing only 120mg of the previously described excipient.

The patients were directed to take one capsule twice a day, after breakfast and after dinner, for a total 600µg CrPic/day. Anthropometric and laboratory parameters were evaluated before and after 120 days of treatment.

Central obesity was evaluated by bone mass index (BMI), calculated using the formula: body weight in kg/(height in cm)², obtained according to World Health Organization (WHO) (7). Body weight was measured in electronic platform scale, maximum capacity 200kg. Height was verified using stadiometer connected to scale, with capacity to 2m and 0.5cm interval.

Waist circumference (WC) and conicity index (CI) were used to evaluate central obesity (8). WC was measured in the medium point between the last rib and the iliac crest (9). The measurement was performed during expiration, using an inextensible tape measure with 200 cm and scale interval of 0.1cm. The CI was calculated according to the formula: $CI = \text{waist circumference (m)} / 0.109 \times (\sqrt{\text{body weight (kg)} / \text{height (m)}})$ (8).

To evaluate the antioxidant profile 20 mL of blood were collected by venous puncture after 10 to 12 fasting. GSH content was measured in total blood, according to Beutler, Durom, Kelly (10). Superoxide dismutase (SOD) activity and glutathione peroxidase activities were measured in erythrocytes using Ransod® (RANDOX Laboratory, Country Antrim, UK) and Ransel® (RANDOX Laboratory) commercial kits, respectively. All the analyses were performed in the Multidisciplinary Laboratory of the Pharmacy College (UFRN). The spectrophotometer Shimadzu 1650-PC (Tokyo, Japan) was used for quantification. GSH results were expressed in mmol/L; and SOD and GPx in U/mg of Hb.

To more details of the methodology and complimentary results of this study, consult Paiva et al. (11).

Statistical analyses were performed in SPSS software, v. 19 (IBM, Armonk, NY, USA). Quantitative variables were expressed in frequency and percentage, and the quantitative ones in median (lower quartile-upper quartile). Since the studied variables did not present normal distribution, non-parametric Wilcoxon test for paired samples was used to evaluate the effect of the intervention inside each group (control and supplemented). To compare the groups, Mann-Whitney test for independent samples was used. Significance level of $p < 0.05$ was adopted.

RESULTS

From the 189 patients initially selected through medical records analyses, 91 were randomized after laboratory and clinical evaluation, and 71 completed the study.

Table 1 shows the general characteristics of control and supplemented groups. Most of the patients (60.6%) had up to 5 years of T2DM diagnosis and used 2 OADs (64.8%). Regarding life style, 2.8% of the patients smoked, and 8.5% related alcoholic beverages consumption and most of them (40.8%) referred not doing any physical activity.

As presented in Table 1, significant reductions ($p < 0.05$) in BMI, WC and CI were found in the group that received CrPic supplementation, however, when comparing the changes from baseline no difference was found for BMI between the groups.

Considering the antioxidant profile, reduced values of GPx in Control group, as well as, reduced activity of SOD in both Control and Supplemented groups were found.

However, no significant difference was found when comparing the changes from the baseline of the groups (Table 2).

DISCUSSION

In the present study, after 4 months of supplementation with 600 μ g of CrPic, significant reductions ($p < 0.05$) in the central obesity related parameters (WC and CI) were found, without alterations in the BMI.

Other authors have found conflicting results about the Cr supplementation effect in obesity related parameters (4, 12, 13), despite the suggestion of a positive relation of Cr with fat reduction in animals and human (14, 15).

One of the suggested hypothesis to explain these findings concerns the action of this mineral in glucose/insulin metabolism, probably stimulating the plasmatic membrane insulin receptor activity (1), which would lead to a higher efficiency in glucose use as energy source, besides a reduction in food craving (16).

Another possible explanation for Cr effect in body fat regards the down regulation of *ACCI*, the gene encoding the Acetyl CoA Carboxylase 1 enzyme, in lipogenic tissues. Thus, Cr would act inhibiting the expression of genes and/or enzymes related to lipogenesis, and increasing the activity of enzymes or the expression of genes involved in lipolysis (15).

Furthermore, this reduction in central obesity in patients with diabetes is particularly important once it is related to an improved glycemic control and a reduced metabolic risk (17).

At the end of the supplementation period it was also observed a reduction in SOD activity, in both Control and Supplemented groups, and a reduction in GPx activity in

Control group. However, when comparing the changes from baseline of the groups, no difference was found.

Other studies also point inconclusive results about the effect of Cr supplementation in the antioxidant profile (5, 18, 19).

Due to the chronicity of endogenous signaling pathways activation, the pattern of presentation of the antioxidant profile in patients with diabetes is still not well established, so interpreting these parameters requires caution (20). Another limitation to the evaluation of the results of the antioxidant profile was the lack of evaluation of a free radicals generation parameter.

Thus our results indicate a benefic effect of CrPic supplementation on central obesity parameters of patients with T2DM and poor glycemic control. Moreover, they point the need of more studies to comprehend this supplementation impact in these patients' antioxidant profile.

REFERÊNCIAS

- 1 Lewicki S, Zdanowski R, Krzyzowska M, Lewicka A, Debski B, Niemcewicz M, *et al.* The role of Chromium III in the organism and its possible use in diabetes and obesity treatment. *Ann Agric Environ Med* 2014; **21**: 331-5.
- 2 Stefanovic A, Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Bogavac-Stanojevic N, Bujisic N. The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; **79**: 156-63.
- 3 Martin J, Wang ZQ, Zhang XH, Wachtel D, Volaufova J, Matthews DE, *et al.* Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006; **29**: 1826-32.
- 4 Albarracin CA, Fuqua BC, Evans JL, Goldfine ID. Chromium picolinate and biotin combination improves glucose metabolism in treated, uncontrolled overweight to obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Rev* 2008; **24**: 41-51.
- 5 Racek J, Trefil L, Rajdl D, Mudrova V, Hunter D, Senft V. Influence of chromium-enriched yeast on blood glucose and insulin variables, blood lipids, and markers of oxidative stress in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res* 2006; **109**: 215-30.
- 6 American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care* 2011; **34**(S1): S11-61.34.
- 7 Organización Mundial de la Salud. El estado físico: uso e interpretación de la antropometria: informe de um Comitê de Expertos de la OMS. OMS, Serie de Informes Técnicos 854. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1995.
- 8 Pitanga FJG. Antropometria na avaliação da obesidade abdominal e risco coronariano. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum* 2011; **13**: 238-41.
- 9 Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010. 3.ed. Itapevi, SP: AC Farmacêutica, 2009.
- 10 Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; **61**: 882-90.
- 11 Paiva AN, Lima JG, Medeiros ACQ, Figueirêdo HAO, Andrade RL, Ururahy MAG, *et al.* Beneficial effects of oral chromium picolinate supplementation on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized clinical study. *J Trace Elem Med Biol* 2015; doi:10.1016/j.jtemb.2015.05.006.
- 12 Krol E, Krejpcio Z, Byks H, Bogdanski P, Pupek-Musialik D. Effects of chromium brewer's yeast supplementation on body mass, blood carbohydrates, and lipids and minerals in type 2 diabetic patients. *Biol Trace Elem Res* 2011; **143**: 726-37.

- 13 Kleefstra N, Houweling ST, Jansman FG, Groenier KH, Gans RO, Meyboom-de Jong B, Bakker SJ, Bilo HJ. Chromium treatment has no effect in patients with poorly controlled, insulin-treated type 2 diabetes in an obese Western population: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Care* 2006; **29**: 521-5.
- 14 Onakpoya I, Posadzki P, Ernst E. Chromium supplementation in overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Obes Rev.* 2013; **14**: 496-507.
- 15 Najafpanah MJ, Sadeghi M, Zali A, Moradi-Shahrehabak H, Mousapour H. Chromium downregulates the expression of Acetyl CoA Carboxylase 1 gene in lipogenic tissues of domestic goats: a potential strategy for meat quality improvement. *Gene* 2014; **543**: 253-8.
- 16 Nachtigal MC, Patterson RE, Stratton KL, Adams LA, Shattuck AL, White E. Dietary supplements and weight control in a middle-age population. *J Altern Complement Med* 2005; **11**: 909-15.
- 17 Gautier A, Roussel R, Ducluzeau PH, Lange C, Vol S, Balkau B, *et al.* Increases in waist circumference and weight as predictors of type 2 diabetes in individuals with impaired fasting glucose: influence of baseline BMI: data from the DESIR study. *Diabetes care* 2010; **33**: 1850-2.
- 18 Lai MH. Antioxidant effects and insulin resistance improvement of chromium combined with vitamin C and e supplementation for type 2 diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr* 2008; **43**: 191-8.
- 19 Cheng HH, Lai MH, Hou WC, Huang CL. Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects. *J Agric Food Chem.* 2004; **52**: 1385-9.
- 20 Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1840**: 2709-29.

6 COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E CONCLUSÕES

O projeto inicial, intitulado "Efeito da suplementação de picolinato de cromo sobre a glicemia de indivíduos com diabetes tipo 2" teve como objetivo principal determinar o efeito da suplementação de PicCr nas concentrações glicêmicas e lipídêmicas em pacientes diabéticos tipo2 com mau controle glicêmico. O estudo foi delineado como um ensaio clínico, aleatório, controlado e randomizado cruzado (*cross over*) e unicego, porém, em virtude da não realização do tempo de intervalo (*wash-out*) entre as etapas de suplementação, o desenho foi modificado para um ensaio clínico, controlado, randomizado e unicego.

Uma das principais dificuldades no desenvolvimento da pesquisa foi em relação aos recursos financeiros. O projeto foi submetido ao edital Universal 14/2012-faixa B, mas não foi aprovado. Para conseguir realizar todas as análises previstas, bem como a suplementação com cromo, foi necessário estabelecer-se uma série de parcerias, com uma instituição pública (Hospital Universitário Onofre Lopes) e instituições privadas (por exemplo, Farmácia de Manipulação Companhia da Fórmula e *DietWin Software* de Nutrição), a fim de se conseguirem os insumos e os serviços necessários. Também foi necessária a colaboração de outros projetos desenvolvidos no Laboratório Multidisciplinar da Pós-Graduação (Labmult) que contavam com financiamento, particularmente no tocante a reagentes e insumos para as dosagens relacionadas ao *status* de defesa antioxidante.

Dentre as limitações identificadas, está a não avaliação da peroxidação lipídica, através da produção de malonildialdeído (MDA), que permitiria a avaliação de um dos biomarcadores do estresse oxidativo, o que se constituiu em uma lacuna do estudo, pois a comercialização do reagente utilizado para avaliar esse marcador está proibida no país. Outra limitação que ocorreu relaciona-se ao tamanho amostral. Apesar de ter sido cumprida a meta estabelecida, durante as análises foi verificada a necessidade de um número maior de pacientes para poder melhor avaliar-se o efeito do cromo em relação ao perfil lipídêmico.

No entanto, apesar dessas dificuldades, os resultados encontrados

foram de grande valia para melhor esclarecerem-se os efeitos da suplementação de cromo em pacientes diabéticos. A utilização desse nutriente não é consensual até o momento e necessita de mais dados para ser implementada na prática clínica de forma rotineira.

Assim, esta pesquisa contribui com subsídios para auxiliar, no esclarecimento de tal questão, que perpassa os campos da nutrição, de bioquímica e de medicina. Ademais, dada a grande prevalência mundial do diabetes *mellitus* tipo 2, é de grande relevância a investigação de práticas que possibilitam melhor controle glicêmico do diabético e, conseqüentemente, melhora de sua qualidade de vida.

A execução deste trabalho permitiu o aprofundamento e a ampliação dos estudos em uma temática na qual a pesquisadora é interessada desde o curso de mestrado e que perpassa sua atuação profissional como nutricionista. No transcorrer desse processo, foi desenvolvida uma série de habilidades em relação ao conhecimento e à execução de técnicas de laboratório necessárias para a realização das análises, além da aquisição de muitos conhecimentos imprescindíveis ao desenvolvimento de trabalhos científicos, adquiridos em disciplinas como Bioestatística, Redação de Trabalho Científico e Bioética.

As metas de investigação do impacto da suplementação de cromo em diabéticos, no controle glicêmico, foram alcançadas devido ao comprometimento e à dedicação da equipe envolvida no projeto. Como perspectiva futura, está a realização de trabalhos visando esclarecer melhor o efeito dessa suplementação tanto no perfil lipidêmico quanto no metabolismo do ferro. Quando da investigação em curso, foi detectada uma redução nas concentrações de ferritina sérica dos pacientes suplementados, o que suscitou uma inquietação sobre possíveis implicações do cromo sobre parâmetros relativos ao *status* do ferro no organismo.

Outra perspectiva futura é a implementação, em uma equipe multidisciplinar, de atividades de educação nutricional para pacientes diabéticos, no Departamento de Assistência ao Servidor da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e no Núcleo de Assistência à Saúde do Trabalhador do Hospital Monsenhor Walfredo Gurgel, instituições das quais a pesquisa faz parte e onde já desenvolve trabalhos de pesquisa e de extensão.

Concomitante às atividades de pesquisa, foi realizado um projeto de

extensão intitulado "Terapia Nutricional em pacientes diabéticos tipo 2", no período 2011 a 2014, no qual foram orientados oito alunos de graduação. Do final do trabalho, até o momento, a pesquisa gerou dois artigos: um já submetido ao Journal of Trace Elements in Medicine and Biologie outro ao Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, ainda em fase de elaboração. Esta produção técnico-científica gerada pelo projeto de pesquisa é detalhada a seguir.

- Artigo publicado

"BENEFICIAL EFFECTS OF ORAL CHROMIUM PICOLINATE SUPPLEMENTATION ON GLYCEMIC CONTROL IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES: A RANDOMIZED CLINICAL STUDY", publicado no Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.

-Artigo em fase de elaboração

O artigo "CHROMIUM PICOLINATE EFFECTS ON ANTHROPOMETRIC PARAMETERS AND ANTIOXIDANT PROFILE IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS" está em fase final de formatação e será submetido para publicação no periódico International Journal of Obesity, que possui fator de impacto 5.004, e Qualis A1 da CAPES para área de Medicina II.

- Orientações acadêmicas de natureza diversa

ANDRESSA NÁZARO LUCENA DE MELO- BOLSISTA Terapia Nutricional em Pacientes Diabéticos Tipo 2 (Orientadora)- 2011

ANDRESSA SOARES DE BATISTA ARAÚJO - BOLSISTA Terapia Nutricional em Pacientes Diabéticos Tipo 2 (Orientadora) – 2014.

AMANDA BÁRBARA RODRIGUES AVELINO – BOLSISTA Terapia Nutricional em Pacientes Diabéticos Tipo 2 (Orientadora) – 2013, 2014

CLÉSIA JORDANIA NUNES DA COSTA – VOLUNTÁRIO Terapia Nutricional em Pacientes Diabéticos Tipo 2 (Orientadora) – 2014

DENISE GAMA JARDIM DE SÁ- BOLSISTA Terapia Nutricional em Pacientes Diabéticos Tipo 2 (Orientadora) – 2013, 2014

HEVERTON ARAÚJO DE OLIVEIRA FIGUEIRÊDO - VOLUNTÁRIO Terapia Nutricional em Pacientes Diabéticos Tipo 2 (Orientadora) – 2012, 2013, 2014;

KAYO EMMANUELL BRANDAO NELSON GABRIEL – BOLSISTA - Terapia Nutricional em Pacientes Diabéticos Tipo 2(Orientadora) – 2011

KARINA ZÁIRA SILVA MARINHO BOLSISTA- VOLUNTÁRIA Terapia Nutricional em Pacientes Diabéticos Tipo 2 (Orientadora) – 2012, 2013

LAISE MOTA BARACHO – BOLSISTA Terapia Nutricional em Pacientes Diabéticos Tipo 2 (Orientadora) – 2014

NÍNIVE RAYANE DE MEDEIROS ALVES - VOLUNTÁRIA Terapia Nutricional em Pacientes Diabéticos Tipo 2 (Orientadora) – 2012, 2013

RAIANA LOURENÇO DE ANDRADE – VOLUNTÁRIO. Terapia Nutricional em Pacientes Diabéticos Tipo 2 (Orientadora) – 2011, 2013 2014

RODRIGO ALBERT BARACHO RÜEGG - BOLSISTA Terapia Nutricional em Pacientes Diabéticos Tipo 2 (Orientadora) – 2011,2013

Enfim, chegando ao término de mais uma etapa de formação profissional, o sentimento é de realização pelo cumprimento deste trabalho e pelo percurso trilhado com muito esforço e dedicação durante toda a fase de pós-graduação.

REFERÊNCIAS

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care*. 2014;37 (S1):S14-80.
2. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014; 2014.
3. Diabetes Atlas, 6º edição. Internacional Diabetes Federation, 2013.
4. Singer GM, Geohas J. The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial. *Diabetes Technol Ther*. 2006;8(6):636-43.
5. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46(4):419-25.
6. Zecchin HG, Carvalheira JBC, Saad MJA. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. *Ver Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2004;14(4):574-89.
7. Cesaretti MLR, Junior OK. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(2):190-7.
8. Vincent JB. The biochemistry of chromium. *J Nutr*. 2000;130(4):715-8.
9. Vincent JB. Chromium: celebrating 50 years as an essential element? *Dalton Trans*. 2010;39(16):3787-94.
10. Suksomboon N, Poolsup N, Yuwanakorn A. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of chromium supplementation in diabetes. *J Clin Pharm Ther*. 2014;39(3):292-306.
11. Khosravi-Boroujeni H, Rostami A, Ravanshad S, Esmailzadeh A. Favorable effects on metabolic risk factors with daily brewer's yeast in type 2 diabetic patients with hypercholesterolemia: A semi-experimental study. *Journal of Diabetes*. 2012;4:153-8.
12. Silva AGH, Cozzolino SMF. Cromo. In: Cozzolino, S.M.F e cols. *Biodisponibilidade de Nutrientes*. 2nd Ed. São Paulo: Manole Ltda; 2007. p.651-9.
13. Wang ZQ, Cefalu WT. Current concepts about chromium supplementation in type 2 diabetes and insulin resistance. *Curr Diab Rep*. 2010;10(2):145-51.

14. Sundaram B, Aggarwal A, Sandhir R. Chromium picolinate attenuates hyperglycemia-induced oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2013;27(2):117-21.
15. Cefalu WT, Rood J, Pinsonat P, Qin J, Sereda O, Levitan L, et al. Characterization of the metabolic and physiologic response to chromium supplementation in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2010;59(5):755-62.
16. Anderson RA, Bryden NA, Polansky MM, Gautschi K. Dietary chromium effects on tissue chromium concentrations and chromium absorption in rats. *J Trace Elem Exper Med* 1996; 9: 11-25.
17. Armendariz-Anguiano AL, Bacardí-Gascón M, Cruz AJ. Evidencias del efecto del cromo en personas con diabetes: revisión sistemática. *Rev Biomed.* 2007;18(2):117-126.
18. Padovani RM, Amaya-Farfán J, Colugnati FAB, Domene SMA. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. *Revista de Nutrição.* 2006;19(6):741-60.
19. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estabelece normas para níveis de dosagens diárias de vitaminas e minerais em medicamentos. Portaria nº 40 de 13 de janeiro de 1998.
20. Schwartz K, Mertz W. A glucose tolerance factor and its differentiation from factor 3. *Arch Biochem Biophys.* 1957;72:515-8.
21. Vincent JB. Is the pharmacological mode of action of chromium (III) as a second Messenger? *Biol Trace Elem Res.* 2015.
22. Fantinatti MC, Zemdegs JCS, Theodoro JFA. Suplementação de cromo melhora a resistência insulínica. *Nutrição em Pauta.* 2009;17(96):9-15.
23. Chen Y, Watson HM, Gao J, Sinha SH, Cassady CJ, Vincent JB. Characterization of the organic component of low-molecular-weight chromium-binding substance and its binding of chromium. *J Nutr.* 2011;141(7):1225-32.
24. Lewicki S, Zdanowski R, Krzyzowska M, Lewicka A, Debski B, Niemcewicz M, Goniewicz M. The role of Chromium III in the organism and its possible use in diabetes and obesity treatment. *Ann Agric Environ Med.* 2014;21(2):331-5.
25. Bahijri SM, Alissa EM. Increased insulin resistance is associated with increased urinary excretion of chromium in non-diabetic, normotensive Saudi adults. *J Clin Biochem Nutr.* 2011;49(3):164-8.

26. AlvaSharrado-Gómez A, Blanco-Sáenz R, Mora-Morales E. El cromo como elemento esencial en los humanos. *Rev Costarric Cienc Méd.* 2002;23(1-2).
27. Forte G, Bocca B, Peruzzi A, Tolu F, Asara Y, Farace C, et al. Blood metals concentration in type 1 and type 2 diabetics. *Biol Trace Elem Res.* 2013;156(1-3):79-90.
28. Martin J, Wang ZQ, Zhang XH, Wachtel D, Volaufova J, Matthews DE, Cefalu WT. Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2006;29(8):1826-32.
29. Anderson RA. Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity. *Proc Nutr Soc.* 2008;67(1):48-53.
30. Albarracin CA, Fuqua BC, Evans JL, Goldfine ID. Chromium picolinate and biotin combination improves glucose metabolism in treated, uncontrolled overweight to obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008;24(1):41-51.
31. Iqbal N, Cardillo S, Volger S, Bloedon LT, Anderson RA, Boston R, Szapary PO. Chromium picolinate does not improve key features of metabolic syndrome in obese nondiabetic adults. *Metab Syndr Relat Disord.* 2009;7(2):143-50.
32. Krol E, Krejpcio Z, Byks H, Bogdanski P, Pupek-Musialik D. Effects of chromium brewer's yeast supplementation on body mass, blood carbohydrates, and lipids and minerals in type 2 diabetic patients. *Biol Trace Elem Res.* 2011;143(2):726-37.
33. Yerlikaya FH, Toker A, Aribas A. Serum trace elements in obese women with or without diabetes. *Indian J Med Res.* 2013;137(2):339-45.
34. Racek J, Sindberg CD, Moesgaard S, Mainz J, Fabry J, Muller L, Racova K. Effect of chromium-enriched yeast on fasting plasma glucose, glycated haemoglobin and serum lipid levels in patients with type 2 diabetes mellitus treated with insulin. *Biol Trace Elem Res.* 2013;155(1):1-4.
35. Anderson RA, Cheng N, Bryden NA, Polansky MM, Cheng N, Chi J, Feng J. Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes.* 1997;46(11):1786-91.
36. Kleefstra N, Houweling ST, Bakker SJ, Verhoeven S, Gans RO, Meyboom-de Jong B, Bilo HJ. Chromium treatment has no effect in

- patients with type 2 diabetes in a Western population: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Care*. 2007;30(5):1092-6.
37. Sharma S, Agrawal RP, Choudhary M, Jain S, Goyal S, Agarwal V. Beneficial effect of chromium supplementation on glucose, HbA1C and lipid variables in individuals with newly onset type-2 diabetes. *J Trace Elem Med Biol*. 2011;25(3):149-53.
 38. Kleefstra N, Houweling ST, Jansman FG, Groenier KH, Gans RO, Meyboom-de Jong B, Bakker SJ, Bilo HJ. Chromium treatment has no effect in patients with poorly controlled, insulin-treated type 2 diabetes in an obese Western population: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Care*. 2006;29(3):521-5.
 39. Gunton JE, Cheung NW, Hitchman R, Hams G, O'Sullivan C, Foster-Powell K, McElduff A. Chromium supplementation does not improve glucose tolerance, insulin sensitivity, or lipid profile: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial of supplementation in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*. 2005;28(3):712-3.
 40. Guimaraes MM. Efeito do nicotinato de cromo na sensibilidade à insulina e antropometria em indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2012.
 41. Cefalu WT, Hu FB. Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(11):2741-51.
 42. Yazaki Y, Faridi Z, Ma Y, Ali A, Northrup V, Njike VY, *et al*. A pilot study of chromium picolinate for weight loss. *J Altern Complement Med*. 2010;16(3):291-9.
 43. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(4):473-81.
 44. Marcadenti A, Oliveira VG, Bertoni VM, Wittke E, Dourado LP, Souza RB, *et al*. Resistência à insulina e indicadores antropométricos em pacientes com síndrome coronariana aguda. *Rev Bras Cardiol*. 2013;26(4):259-66.
 45. Lima ACS, Araújo MFM, Freitas, RWJF, Zanetti ML, Almeida PC, Damasceno MMC. Fatores de risco para diabetes mellitus tipo 2 em universitários: associação com variáveis sociodemográficas. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2014;22(3):484-90.
 46. Jung UJ, Choi, MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):6184-223.

47. Bray GA, Jablonski KA, Fujimoto WY, Barrett-Connor E, Haffner S, Hanson RL. et al. Relation of central adiposity and body mass index to the development of diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(5):1212-8.
48. Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care.* 2006;29(6):1420-32.
49. Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008;52(6):940-50.
50. Soares JC, Correia FA, Bianchi PDA, Bortolotto J, Horn RC. Avaliação do perfil oxidante e antioxidante em pacientes com hiperglicemia. *Revista Biomotriz.* 2013;7(1):78-90.
51. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-25.
52. Martini LA, Catania AS, Ferreira SR. Role of vitamins and minerals in prevention and management of type 2 diabetes mellitus. *Nutr Rev.* 2010;68(6):341-54.
53. Lai MH. Antioxidant effects and insulin resistance improvement of chromium combined with vitamin C and e supplementation for type 2 diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr.* 2008;43(3):191-8.
54. Anderson RA, Roussel AM, Zouari N, Mahjoub S, Matheau JM, Kerkeni A. Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr.* 2001;20(3):212-8.
55. Cheng HH, Lai MH, Hou WC, Huang CL. Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects. *J Agric Food Chem.* 2004;52(5):1385-9.
56. Racek J, Trefil L, Rajdl D, Mudrova V, Hunter D, Senft V. Influence of chromium-enriched yeast on blood glucose and insulin variables, blood lipids, and markers of oxidative stress in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res.* 2006;109(3):215-30.
57. Althuis MD, Jordan NE, Ludington EA, Wittes JT. Glucose and insulin responses to dietary chromium supplements: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(1):148-55.
58. Lukaski HC, Williams AJ, Siders, James GP. Chromium picolinate supplementation in women: effects on body weight, composition, and iron status. *Nutrition.* 2007;23:187-95.

59. Gomes MR, Rogero MM, Tirapegui J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. *Rev Bras Med Esporte*. 2005;11(5):262-6.
60. Quarles CD.Jr., Marcus RK, Brumaghim JL. Competitive binding of Fe³⁺, Cr³⁺, and Ni²⁺ to transferrin. *J Biol Inorg Chem*. 2011;16(6):913-21.
61. Lukaski HC, Bolonchuk WW, Siders WA, Milne DB. Chromium supplementation and resistance training: effects on body composition, strength, and trace element status of men. *Am J Clin Nutr*. 1996;63(6):954-65.
62. Campbell WW, Beard JL, Joseph LJ, Davey SL, Evans WJ. Chromium picolinate supplementation and resistive training by older men: effects on iron-status and hematologic indexes. *Am J Clin Nutr*. 1997;66(4):944-9.
63. Rajpathak SN, Crandall JP, Wylie-Rosett J, Kabat GC, Rohan TE, Hu FB. The role of iron in type 2 diabetes in humans. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(7):671-81.
64. Kim CH, Kim HK, Bae SJ, Park JY, Lee KU. Association of elevated serum ferritin concentration with insulin resistance and impaired glucose metabolism in Korean men and women. *Metabolism*. 2011;60(3):414-20.
65. Park SK, Ryoo JH, Kim MG, Shin JY. Association of serum ferritin and the development of metabolic syndrome in middle-aged Korean men: a 5-year follow-up study. *Diabetes Care*. 2012;35(12):2521-6.
66. Chen H, Tan C. Prediction of type-2 diabetes based on several element levels in blood and chemometrics. *Biol Trace Elem Res*. 2012;147:67-74.
67. Sun L, Zong G, Pan A, Ye X, Li H, Yu Z, et al. Elevated plasma ferritin is associated with increased incidence of type 2 Diabetes in middle-aged and elderly Chinese adults. *J Nutr*. 2013;143:1459-65.
68. Batchuluun B, Matsumata T, Erdenebileg N, Tsagaantsooj G, Boldbaatar K, Khasag A. Serum ferritin level is higher in poorly controlled patients with Type 2 diabetes and people without diabetes, aged over 55 years. *Diabet Med*. 2013;31(4):419-24.
69. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care*. 2011;34(S1):S11-61.
70. Armitage P, Berry G. The planning of statistical investigations. *In*: _____. *Statistical methods in medical research*. 2.ed. Oxford: Blackwell, 1987. p. 179-85.
71. BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Diretrizes e normas regulamentadoras sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Resolução Nº196/96. 1996. Brasília: CNS, 1996.

72. World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. WHO Technical Report Series 894. 2004;2:6-15.
73. Organización Mundial de la Salud. El estado físico: uso e interpretación de la antropometria: informe de um Comitê de Expertos de la OMS. OMS, Serie de Informes Técnicos 854. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1995.
74. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010. 3.ed. Itapevi, SP: AC Farmacêutica, 2009.
75. Pitanga FJG. Antropometria na avaliação da obesidade abdominal e risco coronariano. Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum. 2011;13(3):238-41.
76. Zabotto CB, Vianna RPT, Gil MF. Registro fotográfico para inquéritos dietéticos: utensílios e porções. Goiânia: RTN. Gráfica edito e consultoria, 1996.
77. Andrade, TC. Construindo um registro fotográfico de alimentos, preparações de interesse dietético regional/ local. [Monografia]. Natal: Universidade Federal do Rio grande do Norte; 2005.
78. Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. 4nd Ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2000.
79. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/NEPA – UNICAMP. 4nd Ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011.
80. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2008. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. Nutrient Data Laboratory Home Page, 2008 [acesso em: 11 nov 2008]. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.
81. Fisberg RM, Slater B, Marchioni DML, Martini LA. Inquéritos alimentares: métodos e bases científicos. Barueri, SP: Manole, 2005.
82. Padovani RM, Amaya-Farfán J, Colugnati FAB, Domene SMA. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. Rev Nutr. 2006;19(6):741-60.
83. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes – 2013. Diabetes Care. 2013; 36(S1):S11-66.

84. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *The journal of laboratory and clinical Medicine* 1963; 61: 882-90.
85. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Research in veterinary science*. 1983;34:253-6.
86. Paglia DE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70:158-169.
87. Field A. *Descobrimos a estatística usando o Spss*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
 CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
 PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE PICOLINATO DE CROMO SOBRE A
 GLICEMIA DE INDIVDUOS COM DIABETES TIPO 2**

RgHUOL: _____ Rg Protocolo: _____

Nome:

Idade: _____ Data Nasc.: ____/____/____ Sexo: Feminino

Masculino

Endereço:

Bairro: _____ Cidade / UF : _____ CEP :

_____ - _____ Tel: _____

email _____

Estado Civil: Solteiro Casado Viúvo outros

Trabalha atualmente ? Sim Não

Atividade ocupacional _____

Estuda atualmente ? Sim Não Grau de Instrução: _____

HÁBITOS SOCIAIS E DE SAÚDE

Fumante: Sim Não **Etilista:** Sim Não

Atividade Física: Sim Não Tipo? _____ Frequência (dias/semana)?
 _____ Tempo (min/dia)? _____

Está em menopausa? Sim Não **Faz reposição hormonal?** Sim Não

Qual? _____

Tempo de Doença (Idade ao diagnóstico): _____

Tratamento Atual: 1 ADO 2 ADO's 3 ou + ADO's

Quais/dosagens?

Sintomas da Doença:

() poliúria () polidipsia () polifágia () tontura () sudorese () edema

Comorbidades

IAM Prévio DAC sem Hist de IAM AVC Insuf Arterial Periférica

HAS – Medicação:

Hipercolesterolemia – Medicação:

Hipertrigliceridemia – Medicação:

Complicações

Retinopatia Diabética: Não Sim

Nefropatia Diabética: Não Microalbuminúria +

Neuropatia Diabética: Não Sensitiva – periféric Autonômica Outra

Pé Diabético: Não Mal perfurante plantar Amputações

História de DM-2 em parentes de 1º Grau: Sim Não

Função Intestinal : Normal Obstipado Diarréico

HÁBITOS ALIMENTARES

Quantas refeições faz por dia? _____ Tem horário certo de se alimentar? Sim

Não Alimentos que não gosta? _____

Intolerância alimentar: Sim Não A que?

Exames Laboratoriais

Data										
GJ										
GPP										
HbA1c										
CLT										
HDL - c										
LDL - c										
TG										
TGO										
TGP										
GGT										
Creatina										
Ureia										
Ácido Úrico										
Microalbuminúria										
TSH										
T4 livre										
Hematócrito										
Hemoglobina										
Leucócitos										
Plaquetas										
Ferritina										
SOD										
GPX										
GSH										

GJ- glicemia de jejum; GPP - glicose pós prandial; HbA1c – Hemoglobina glicada; CLT – Colesterol total ; HDL-c – HDL colesterol; LDL-c – LDL – colesterol; TG – triglicérido; TGO – Transaminase glutâmica oxalacética; TGP – Transaminase glutâmica pirúvica; GGT- gama glutamil transferase; TSH –hormônio estimulante da tireóide; T4livre–tiroxinalivre;SOD – Superóxido dismutase; GPX – glutaciona peroxidase; GSH-glutaciona reduzida

APÊNDICE 2

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE - UFRN
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: Efeito da suplementação de picolinato de cromo sobre a glicemia de indivíduos com diabetes tipo 2.

Meu nome é Ana Nunes Paiva. Sou nutricionista da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e estou convidando Vossa Senhoria para participar da pesquisa que estou desenvolvendo juntamente com a equipe de endocrinologia e metabologia do Hospital Universitário Onofre Lope. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar o efeito de um mineral chamado picolinato de cromo nas alterações da glicose no sangue em jejum e após a refeição, além de avaliar o estresse oxidativo e o efeito desse mineral no controle de colesterol e de triglicerídeos de pacientes diabéticos tipo 2. O picolinato de cromo é um mineral que age no organismo melhorando a absorção de glicose, colesterol e triglicerídeos, com isso evitando as complicações da diabetes como infarto, derrame cerebral, gangrena, etc.

Caso você, ou seu responsável legal, aceite participar desta pesquisa, vamos coletar uma amostra de sangue (20 mL) a vácuo em suana veia, após jejum de 10 horas, para realização dos exames de sangue, que incluem: hemograma, glicose em jejum, hemoglobina glicada, colesterol e frações, triglicerídeos, hormônios da tireoide (T4, TSH), função dos rins (ureia, creatinina, ácido úrico), função do fígado (TGO, TGP, GGT), determinação de cromo no sangue e enzimas antioxidantes, além de exames de urina, para avaliar a microalbuminúria. Após a coleta de sangue em jejum, será oferecido a você um café da manhã e, após duas horas, será coletado novamente sangue, para se observar o controle da glicose no sangue após a ingestão do alimento. Todos esses procedimentos serão realizados antes de se iniciar o suplemento de picolinato de cromo e após a última dose. Também será necessário que você, ou o responsável legal, responda a algumas perguntas sobre dados pessoais, hábitos de vida, hábitos alimentares, doenças existentes em sua pessoa e em seus familiares, medicamentos que está tomando e de outras informações relacionadas com a pesquisa. Uma parte do material biológico (sangue) será armazenado no Laboratório Multidisciplinar da Faculdade de Farmácia da UFRN, sob minha responsabilidade, em *freezer* a -80° , para a determinação de atividades das enzimas antioxidantes. Para isso peço sua autorização.

O estudo abrangerá dois grupos de pacientes, denominados: GRUPO I (placebo) e GRUPO II (experimental). Os grupos serão compostos de forma randomizada, ou seja, aleatoriamente, através de sorteio. A dose será dividida em duas tomadas: 300mcg após o desjejum (café da manhã) e 300mcg após o jantar.

Cada paciente que preencher os critérios de inclusão retirará de modo aleatório um envelope contendo o tipo de tratamento que irá fazer, dentre os envelopes correspondentes aos dois tratamentos dos indivíduos. O GRUPO I será o grupo controle cujos componentes, receberão o placebo, durante quatro meses, através de cápsulas manufaturadas em farmácia de manipulação credenciada pela agência de

Vigilância Sanitária. O GRUPO II será o grupo experimental, cujos pacientes receberão a suplementação oral de picolinato de cromo na dosagem de 600µg também por meio de cápsulas manufaturadas em farmácia de manipulação credenciada pela agência de Vigilância Sanitária: 300mcg após desjejum (café da manhã) e 300µg após o jantar.

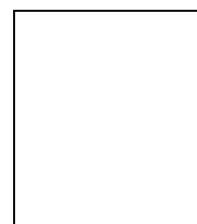
A participação neste estudo é totalmente voluntária, podendo você recusar-se a fazer parte dele ou a interromper sua participação se julgar conveniente, sem prejuízo para você, nem para o andamento do trabalho de pesquisa. Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa, pode entrar em contato com a **Profª. Drª. Maria das Graças Almeida** ou com a **Drª. Ana Nunes Paiva**, através dos telefones 33429807 ou 87178311 ou 99888158. Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFRN (CEP), situado no endereço Av. Nilo Peçanha, 620 – Petrópolis, Natal-RN. Informações adicionais podem ser obtidas pelo telefone **3342 5003**. O trabalho será realizado de acordo com os princípios da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Consentimento para participação

Estou de acordo com a participação no estudo descrito acima. Fui devidamente esclarecido(a) quanto aos objetivos da pesquisa e aos procedimentos aos quais serei submetido(a). Foram garantidos esclarecimentos que eu venha a solicitar durante o curso da pesquisa e o direito de desistir a qualquer momento, sem que a desistência implique qualquer prejuízo. A participação na pesquisa não implicará custos ou prejuízos adicionais, sejam eles de caráter econômico, social, psicológico ou moral. Foi garantido o anonimato, o sigilo dos dados referentes a identificação e o compromisso de que serei contactado(a) para avaliação de estudo futuro usando as amostras biológicas obtidas neste instante.

Natal, ____ de _____ de 20__.

Responsável Legal do Participante



(Polegar Direito - Responsável)

Participante

Testemunha

Pesquisador

ANEXOS

ANEXO1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ONOFRE
LOPES – CEP/HUOL

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes – CEP/HUOL, devidamente reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/MS, analisou o projeto:

Título: Efeito da suplementação de picolinato de cromo sobre a glicemia de diabetes tipo 2

Protocolo CEP/HUOL: 507/10

CAAE: 6510.0.000.294-10

Pesquisador Responsável: Maria das Graças Almeida

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, incluindo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes da Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, AD REFERENDUM em 18 de Fevereiro de 2011 no CEP/HUOL. Toda e qualquer alteração no projeto/protocolo de pesquisa, assim como eventos adversos que venham a ocorrer, deverão ser comunicados oficialmente e imediatamente ao CEP/HUOL. O relatório final do projeto ou a cópia de sua publicação deverá ser encaminhado ao CEP/HUOL após o término do estudo, conforme cronograma.

Natal, 18 de Fevereiro de 2011.

Maria Sanali Moura de Oliveira Paiva
Coordenadora do CEP/HUOL

