UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO NA REDUÇÃO DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS COM DIABETES
MELLITUS DO TIPO 2**

Vanuska Lima da Silva

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulcineia Saes Parra Abdalla

SÃO PAULO

2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO NA REDUÇÃO DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS COM DIABETES
MELLITUS DO TIPO 2**

VANUSKA LIMA DA SILVA

*Tese apresentada para
obtenção do grau de doutor
pela Faculdade de Ciências
Farmacêuticas/USP*

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Dulcineia Saes Parra Abdalla

SÃO PAULO
2006

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012268

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S586e	<p>Silva, Vanuska Lima da</p> <p>Efeitos da suplementação com zinco na redução do estresse oxidativo em indivíduos com diabetes Mellitus do tipo 2 / Vanuska Lima da Silva. -- São Paulo, 2006. 86p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental</p> <p>Orientador: Cozzolino, Silvia Maria Franciscato Co-orientador : Abdalla, Dulcinéia Saes Parra</p> <p>1. Nutrição : Avaliação nutricional : Ciência dos alimentos 2. Zinco : Ciência dos alimentos 3. Zinco : Diabetes Mellitus 4. Estresse oxidativo I. T. II. Cozzolino, Silvia Maria Franciscato, orientador III. Abdalla, Dulcinéia Saes Parra, co-orientador</p> <p>641.1 CDD</p>
-------	---

Vanuska Lima da Silva

**Efeitos da suplementação com zinco na redução do estresse
oxidativo em indivíduos com diabetes mellitus do tipo2**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof.^a. Dr.^a. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 09 de maio de 2006.

Dedicatória

Aos meus pais **Wilson e Eugênia**, meu tesouro!
Meus grandes incentivadores...
Sempre presentes todos os dias, apesar da distância física,
Obrigada por compreender a minha ausência...
E acreditar nos meus sonhos...
Por todo apoio, carinho e motivação...
E as constantes orações...
Este trabalho também é de vocês.

Aos meus irmãos, Veruska e Isaac, pelo carinho e amizade.

À minha querida **Avó Maria** (*in memoriam*),
Saudades infinitas...
Te dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, sem Ele nada seria possível.

À minha orientadora Silvia Maria Franciscato Cozzolino, meu muito obrigada por estar sempre ao meu lado nesta caminhada, desde o mestrado, sempre com o seu incentivo, carinho e dedicação. Minha eterna orientadora!

À Profa. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, obrigada por abrir as portas do seu convívio profissional, despertando-me cada vez mais o espírito científico.

Ao Prof. Fernando Salvador Moreno, por quem tenho grande admiração, sempre presente em momentos importantes na minha vida profissional com contribuições valiosas.

Profa. Ângela Spinola Castro, pelas importantes contribuições para este trabalho.

Aos meus amigos de laboratório (1) Luz Merida, Carla Soraya, Cristiane Cominetti, Fernanda Michelazzo, Maritsa Bortoli, Simone Freire, Gabriela Chiocolla, Adriana Lima, Janaína Lombello, Luciana Nishimura, Liliane Pires e ao técnico Alexandre Pimentel, obrigada pela força, troca de idéias, auxílio e atenção.

Aos meus amigos de laboratório (2) Simone Ferderbar, Laila Sangaletti e Daniela Matos, obrigada pela amizade, companheirismo e ensinamentos durante as atividades de laboratório.

À estagiária Flávia Figueiredo, pela participação em várias etapas deste trabalho e pela amizade estabelecida.

Aos secretários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Mônica Perussi, Tânia Cacheiro e Edílson...e aos da Pós-graduação, Elanie Midori, Jorge Lima e Maria José (Majô).

Ao amigo Luiz Cláudio Silva, por toda a troca de idéias, apoio, incentivo e amizade.

À funcionária, Maria de Lourdes (Lurdinha), pelo apoio e contribuição.

Ao Tiago Pereira, pela realização da parte estatística deste trabalho.

Ao laboratório de doenças nutricionais do Departamento de Veterinária da USP, em especial, a técnica Clara Mori.

À equipe do ambulatório de Endocrinologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia, principalmente aos Drs. Osmar Monte e João Nunes Sales, pelo espírito de cooperação e receptividade na seleção e acompanhamento dos pacientes.

Aos voluntários que participarem deste trabalho, o meu muito obrigada.

À FAPESP pelo apoio financeiro para a pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Albion Laboratories, pelo fornecimento do suplemento.

A Sra Ana Costa e Elizabeth Costa por todo apoio, incentivo, acolhida, convivência, pelos momentos de alegria e por escutarem meus desabafos...obrigada pela amizade e por me proporcionar o aconchego de uma família.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs – produtos finais de glicação avançada (advanced glycation end-product)

AAS – ácido acetilsalicílico

BHT- butylated hydroxytoluene

BIA – bioimpedância elétrica

BSTFA – Bis (trimetilsilil) trifluoracetamida

CAT - catalase

CG – cromatógrafo à gás

COx – óxido de colesterol

CT - colesterol total

DM1 - diabetes mellitus do tipo 1

DM2 - diabetes mellitus do tipo 2

DRIs – ingestões dietéticas de referência

EAR – necessidade média estimada

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

ELISA- enzyme-linked immunosorbent assay

ERN – espécies reativas de nitrogênio

EROs – espécies reativas de oxigênio

FID – detector de ionização de chama

GPx – glutathione peroxidase

Hb - hemoglobina

HDL-c - colesterol de lipoproteína de alta densidade

HMG- CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

HOMA - homeostasis model assessment

IGT- intolerante à glicose

IL-1 – interleucina 1 (citocina pró-inflamatória)

IMC – índice de massa corpórea

Kcal - kilocaloria

LDL-c – colesterol de lipoproteína de baixa densidade

LDL_n – LDL nativa

LDL(-) – LDL eletronegativa

NADP – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NF-κB – fator nuclear κB

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPD - orto-fenilenodiamina

PBS – phosphate buffer saline (solução fosfato salina)

PKC - proteína quinase C

PMSF – fenilmetil sulfonil fluoreto

RAGEs – receptores para produtos finais de glicação avançada (receptor of advanced glycation end-product)

RDA – ingestão dietética recomendada

SOD – superóxido dismutase

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric acid-reactive substance)

TG - triacilglicerol

TNF – fator de necrose tumoral

TRIOL – colestano-3β, 5α, 6β-triol

UL – limite superior tolerável de ingestão

VLDL-c – colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade

α-epóxido – colesterol α-epóxido

β-epóxido – colesterol β-epóxido

7α-OH - 7α-hidroxicolesterol

7β-OH - 7β- hidroxicolesterol

7-ceto – 7-cetocolesterol

25OH – 25-hidroxicolesterol

RESUMO

O zinco é um elemento-traço essencial que está envolvido em diferentes processos metabólicos. Possui função antioxidante, uma vez que faz parte da estrutura da enzima superóxido dismutase (CuZn-SOD), atua na restrição da produção endógena de radicais livres e, na estabilização da estrutura de membranas. Diabéticos geralmente apresentam deficiência de zinco, além de possuírem um grau aumentado de estresse oxidativo, que é gerado pela própria doença. Portanto o presente estudo teve como objetivo verificar se a suplementação com zinco em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 poderia melhorar as características indicativas de dano oxidativo. O estudo realizado foi duplo cego, sendo administrado zinco aminoquelado (20mg/dia) e placebo, durante 6 meses, sendo os parâmetros do estudo avaliados antes e depois da suplementação, para que fosse possível se observar as mudanças nos parâmetros indicativos do estresse oxidativo. Na avaliação antropométrica, se verificou peso, estatura, medidas da cintura e bioimpedância elétrica. Foi feita a avaliação dos parâmetros glicêmicos e lipídicos, do mineral zinco, bem como dos indicadores de estresse oxidativo, incluindo os óxidos de colesterol e os autoanticorpos anti-LDL eletronegativa. A avaliação alimentar foi realizada por meio do registro de consumo alimentar. Como resultados, podemos ressaltar alta prevalência de sobrepeso/obesidade. Após a suplementação, as concentrações do zinco no plasma e eritrócito tiveram um leve aumento, passando de 68 ± 10 para $72,9 \pm 13 \mu\text{g/dL}$, e de $40,7 \pm 6,2$ para $43 \pm 6,8 \mu\text{gZn/gHb}$, respectivamente, entretanto, este aumento não foi estatisticamente significativo. Também não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações dos autoanticorpos anti-LDL eletronegativa e do total dos óxidos de colesterol, apesar de existir tendência de melhora destes parâmetros.

ABSTRACT

Zinc is an essential trace element that is involved with a variety of metabolic processes. It has an antioxidant function as it is part of the superoxide-dismutase (CuZn-SOD) enzyme. It works in the restriction of the free-radicals endogenous production and in the membrane structure stabilization. Diabetic people often present zinc deficiency, besides of having an augmented degree of oxidative stress, which is generated by the own disease. Therefore, the present study had as objective to verify if the zinc supplementation would better the indicating characteristics of oxidative damage to type 2 diabetes mellitus patients. The study done was double-blind, with the administration of zinc chelate (20mg/day) and placebo, during 6 months. The study parameters were assessed both before and after the supplementation, in order to be possible for one to observe changes in the indicating oxidative stress parameters. In the antropometric evaluation, it was verified the weight, height, the measure of the waistline and the electric bioimpedance. It was evaluated the glicemic and fat parameters, zinc, as well as the oxidative stress indicators, which included the oxysterols and the electronegative anti-LDL autoantibody. The alimentary evaluation was done by means of the feed consumption registration. As a result, it could be highlighted the predomination of overweight/obesity. After supplementation, the zinc concentrations in the plasma and erythrocyte showed a slight increase, from 68 ± 10 to $72,9 \pm 13$ mg/dL, and from $40,7 \pm 6,2$ to $43 \pm 6,8$ mgZn/gHb, respectively. However, this increase was not statically significative. Besides that, it was not found significative differences in the concentration of the electronegative anti-LDL autoantibody and of the oxysterols totals, despite of a trend in improvement of those parameters.

Sumário

	Pág.
1.0 REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Estresse oxidativo	1
1.2 Estresse oxidativo e diabetes	9
1.3 Diabetes e síndrome metabólica	10
1.4 Aterosclerose	11
1.4.1 LDL eletronegativa	15
1.5 Óxidos de colesterol	18
1.6 Zinco	23
1.6.1 Zinco, estresse oxidativo e diabetes	25
1.6.2 Ingestão dietética de referência para o zinco	29
2.0 OBJETIVO	32
3.0 CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
3.1.1 Critérios de inclusão	33
3.1.2 Critérios de exclusão	34
3.1.3 Critérios para interrupção do estudo	34
3.2 Avaliação antropométrica	34
3.2.1 Peso e estatura	34
3.2.2 Índice de gordura localizada – circunferência da cintura	35
3.2.3 Bioimpedância elétrica	35
3.3 Avaliação de consumo alimentar	35
3.4 Identificação social e de saúde/doença	36

3.5 Coleta de sangue	36
3.5.1 Medidas bioquímicas	37
3.5.2 Determinação do zinco	37
3.5.2.1 Zinco plasmático	37
3.5.2.2 Zinco eritrocitário	38
3.5.3 Determinações dos parâmetros glicêmicos e lipídicos	39
3.6 Metodologia analítica de qualificação dos COx	40
3.6.1 Preparação dos padrões – COx	40
3.6.2 Preparação da amostra – COx	40
3.6.3 Determinação por CG com ionização de chama – COx	41
3.7 Superóxido dismutase	41
3.8 Dosagem do autoanticorpo anti-LDL eletronegativa	42
3.9 Suplementação	45
3.10 Análise estatística	45
4.0 RESULTADOS	47
4.1 Parâmetros antropométricos	47
4.2 Consumo alimentar	48
4.3 Características do perfil social e da prática de atividade física	49
4.4 Perfil lipídico e hemoglobina glicada	50
4.5 Parâmetros bioquímicos de avaliação do EN relativo ao zinco	52
4.5.1 Zinco plasmático	53
4.5.2 Zinco eritrocitário	55
4.6 Atividade enzimática da SOD	56

4.7 Determinação dos óxidos de colesterol	57
4.8 Autoanticorpo anti-LDL eletronegativa	58
4.9 Correlação entre as variáveis do estudo	59
5.0 DISCUSSÃO	61
5.1 Avaliação antropométrica	61
5.2 Consumo Alimentar	63
5.3 Atividade Física	66
5.4 Medicamentos	67
5.5 Avaliação do zinco no plasma e no eritrócito	69
5.6 Avaliação da atividade da superóxido dismutase	73
5.7 Avaliação da redução do estresse oxidativo – óxidos de colesterol e autoanticorpos anti-LDL eletronegativa	75
6.0 CONCLUSÕES	81
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
Anexos	

1 – REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo do organismo pode ser compreendido como uma condição na qual a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) estão aumentadas ou quando ocorre insuficiente remoção de moléculas altamente reativas, levando a uma alteração do equilíbrio oxidantes/antioxidantes e, conseqüentemente, ao dano potencial da modificação oxidativa (STOCKER, KEANEY, 2004; JOHANSEN, *et al.*, 2005). A correlação entre estresse oxidativo e inúmeros distúrbios no organismo (como doenças auto-imune, câncer, doenças cardiovasculares) tem sido proposta (COLBURN, 1992; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

As EROs podem interagir e lesar diversas biomoléculas e estruturas celulares. Em condições normais, a concentração dessas espécies dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem substâncias antioxidantes que as removem, ou impedem sua formação (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

As espécies reativas de oxigênio incluem os radicais livres tais como: o superóxido ($O_2^{\bullet -}$), hidroxil ($^{\bullet}OH$), peroxil ($^{\bullet}RO_2$), hidroperoxil ($^{\bullet}HRO_2$), também os não-radicais: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hidrocloreoso ($HOCl$). As espécies reativas de nitrogênio incluem os radicais livres óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e dióxido de nitrogênio ($^{\bullet}NO_2$), e os não radicais: peroxinitrito ($ONOO$), óxido nitroso (HNO_2) e peroxinitrato acil ($RONOO$). Destas moléculas reativas, o superóxido, o óxido nítrico e o peroxinitrito são as espécies mais estudadas e desempenham funções importantes como

agentes geradores de dano oxidativo nas complicações cardiovasculares (JOHANSEN, *et. al.*, 2005).

Espécies reativas de oxigênio (EROS) e produtos de oxidação do NO interagem com os mecanismos de sinalização vascular em vias que parecem fundamentais no controle das funções fisiológicas e patofisiológicas. A atividade dos sistemas produtores de EROS (NADPH e NADH oxidases, xantina oxidase, NO sintetase) no endotélio e/ou no músculo liso vascular são controladas pela ativação de receptores, processos metabólicos e fatores fisiológicos associados com a pressão e o fluxo sanguíneo.

Matés, Pérez-Gómez e Castro (1999), relatam que organismos aeróbios possuem sistema de defesa antioxidante que está ligado às espécies reativas de oxigênio que são produzidas em resposta a estímulos internos e externos. EROs em altas doses ou com baixa taxa de remoção, resultam em estresse oxidativo, o qual pode causar disfunções metabólicas e dano para as macromoléculas biológicas.

Os produtos de EROS geralmente começam com a redução de 1 elétron do oxigênio molecular para o ânion superóxido por várias oxidases.

O ânion superóxido é um radical livre carregado negativamente que, preferencialmente, possui afinidade por reações químicas com os componentes de sistemas biológicos. A SOD (superóxido dismutase) dismuta duas moléculas do ânion superóxido (ciclo de reação), ou seja,

oxida uma molécula de superóxido a O_2 e, com o elétron liberado, reduz uma segunda molécula de superóxido a peróxido de hidrogênio e água (equação 2). Uma das mais importantes funções da SOD está na prevenção da reação do ânion superóxido com o NO, evitando a formação do peroxinitrito (equação 3).

Uma das mais significantes interações do NO com sistemas de sinalização envolvem sua reação com o grupo heme ferroso, outros metais e espécies de radicais livres. A formação de ERNs por meio da oxidação do NO ou através da reação com EROs, parece resultar da produção de espécies que adicionalmente interagem em processos regulatórios.

Quando as concentrações de NO aumentam na faixa dos níveis teciduais de SOD, o NO compete com a SOD para remover o radical superóxido, formando peroxinitrito. O dióxido de nitrogênio (NO_2) é produzido em quantidades significantes pelo peroxinitrito, uma vez que a sua forma protonada, o ácido peroxinitroso, pode decompor-se rapidamente, formando NO_2 e nitrato na ausência de substratos oxidáveis.

Quando os níveis de peroxinitrito e ERNs aumentam, estas espécies têm efeitos de sinalização na função dos tecidos que possuem significância fisiológica. Espécies derivadas da oxidação do NO, interagem prontamente

com a glutathione (GSH) e outros tióis nos tecidos, causando a oxidação dos grupos tióis ou a formação de tióis nitrados (RSNO_2) e nitrosados (RSNO).

A formação do peroxinitrito está associada com a inibição de diversos sistemas antioxidantes, incluindo a catalase, glutathione peroxidase, e as SODs, e a ação destas ERNs, podem aumentar a sinalização de processos associados a injúria. O peroxinitrito e o dióxido de nitrogênio causam a nitração de grupos tirosina ou cisteína presentes nas proteínas, formando nitrotirosinas e nitrocisteína. A nitrotirosina tem sido considerada um marcador indireto dos níveis de peroxinitrito e tem sido observados níveis elevados em diabéticos (CERIELLO *et. al.*, 2001).

A promoção da peroxidação lipídica e da oxidação de colesterol, formando os COx, podem ainda ser provenientes da decomposição do peroxinitrito em diferentes espécies radicalares de nitrogênio e oxigênio, contribuindo para a oxidação dos grupos sulfidrilas das proteínas e disfunção endotelial.

A oxidação da LDL pelo peroxinitrito se dá indiretamente por sua interação com a ceruloplasmina, promovendo a liberação do cobre da ceruloplasmina. Estes íons de cobre promovem a oxidação de resíduos de araquidonato e linoleato dos fosfolípidos na superfície da LDL, gerando hidroperóxidos isoméricos. Posteriormente, estes hidroperóxidos são degradados pelo cobre, formando radicais peroxila e alcoxila, envolvidos na propagação da lipoperoxidação de lípidos na lipoproteína.

O peróxido de hidrogênio é uma espécie relativamente estável, com propriedades de difusão biológica similar à água. Ambos são derivados do

superóxido (equação 1) ou podem ser produzidos por oxidases através da redução de dois elétrons do oxigênio molecular.

A catalase metaboliza o peróxido de hidrogênio, mas não o peróxido lipídico, inicialmente por sua redução à água, como resultado da doação de dois elétrons, formando um composto heme altamente oxidável. Este composto heme de catalase é reduzido a sua forma férrica por oxidar a segunda molécula de peróxido de hidrogênio à água.

A catalase tem pouca afinidade pelo peróxido de hidrogênio, apesar de possuir uma alta capacidade para destruí-lo, assim sendo, há necessidade de altas concentrações de peróxido de hidrogênio para que sua ação seja ativa (GUTTERIDGE, HALLIWELL, 1994).

A glutathiona peroxidase (GPx) é uma das maiores enzimas que removem os peróxidos, atua metabolizando o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos biológicos, pela redução destes com os elétrons derivados da oxidação da GSH para a sua forma oxidada, GSSG, e água. O produto desta via, GSSG, tem o potencial de regular sistemas de sinalização (oxidação de tióis e nitrosação).

Peroxidases heme, presentes nos tecidos, são enzimas adicionais com alto poder de reação com peróxidos. O metabolismo dos peróxidos por estas enzimas está frequentemente relacionado a formação de moléculas

de sinalização, tais como as prostaglandinas (PGs), ciclooxygenases (COX), ou pela geração de EROs adicionais pelas mieloperoxidases (MPO).

As mieloperoxidases são heme proteínas produzidas por monócitos e neutrófilos, que podem gerar compostos nitrantes envolvido na modificação da LDL. A MPO pode nitrar resíduos de tirosina de proteínas, utilizando nitrato, e iniciar a peroxidação lipídica (PODREZ *et al.*, 1999).

- As EROs derivadas de peróxidos, frequentemente descritas como espécies com reatividade semelhante ao radical hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$), podem estar envolvidas em processos de sinalização. Peróxidos reagem prontamente com metais de transição, presentes nos sistemas biológicos, tais como o ferro, e isto pode resultar na formação de espécies que estão envolvidas na sinalização ou processos de injúria tecidual. A reação do peróxido de hidrogênio com o íon ferroso resulta na formação do radical hidroxila.

Existem evidências sugerindo que as reações de peróxidos com ferro (Fe^{2+}), ligado a proteínas ou moléculas de baixo peso molecular, podem resultar em espécies estabilizadas ligadas ao ferro com reatividade semelhante ao radical hidroxila.

Fonte: JOHANSEN, *et al.*, 2005.

Figura 1: Geração de espécies reativas de oxigênio. Ação de enzimas antioxidantes.

O sistema de defesa antioxidante pode remover as EROs antes que estas possam causar dano às diferentes biomoléculas, sendo assim, os antioxidantes primários atuam removendo os precursores de radicais livres ou inativando seus catalisadores. No entanto, a proteção é contínua, e ela se dá em diferentes sítios e contra diferentes tipos de EROs, consistindo num sistema de múltiplos elementos de proteção. A defesa antioxidante pode ser constituída por sistemas enzimáticos e não enzimáticos (SCOTT, KING, 2004; KOURY, DONANGELO, 2003; SCHWENKE, 1998).

As enzimas antioxidantes constituem a primeira linha de defesa do organismo, sendo composta pela CAT, GPx e SOD. Estas enzimas

possuem minerais que fazem parte do seu sítio ativo ou de cofatores (JOHANSEN, *et. al.*, 2005; ROVER Jr, *et. al.*, 2001).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, destacam-se as vitaminas C e E. A vitamina C é o antioxidante hidrossolúvel mais poderoso nos fluídos extracelulares, é capaz de neutralizar EROs, tendo o ascorbato ação contra o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e oxigênio singlete, além de possuir a capacidade de regenerar o tocoferol. A vitamina E atua nas membranas e lipoproteínas, interrompendo a peroxidação lipídica, neutralizando radicais lipídicos peroxil, e com isso, evitando a produção de hidroperóxidos lipídicos e radical tocoferoxil. Outros elementos, como carotenóides, licopeno e oxicarotenóides (luteína) exercem função antioxidante em meios lipídicos (JOHANSEN, *et. al.*, 2005).

Um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, inclusive de peróxidos de hidrogênio dentro do eritrócito, pode aumentar a resposta da atividade enzimática da SOD. No citoplasma eritrocitário, o excesso de peróxido de hidrogênio pode se difundir pela membrana eritrocitária ou interagir com a hemoglobina, ocorrendo com isso, a liberação de ferro. O peróxido de hidrogênio que interage com os átomos de ferro podem dar origem ao radical hidroxila (reação de Fenton) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

Nos últimos anos, a incidência de doenças crônicas não-transmissíveis relacionadas com a formação de espécies reativas de oxigênio, vem merecendo especial atenção; entretanto, os estudos apresentam-se controversos a respeito da ação e do efeito dos minerais

sobre as fisiopatologias existentes e relacionadas com mecanismos oxidativos (MORRISSEY, O'BRIEN, 1998; SPITELLER, 2001).

1.2 Estresse oxidativo e diabetes

A prevalência de diabetes mellitus do tipo 2 corresponde a cerca de 90% do total de casos de diabetes. É caracterizado pela resistência a insulina, com uma inadequada resposta compensatória de secreção de insulina, obesidade marcante (70-80% dos casos) e transmissão genética (história familiar freqüente) (PETERS, SCHRIGER, 1998; FUJIMOTO, 2000).

O diabetes do tipo 2 é freqüentemente assintomático, permanecendo assim muitos casos sem diagnóstico. Mesmo em países com sistemas de saúde bem desenvolvidos, como é o caso dos EUA, existe tipicamente um caso não diagnosticado para cada caso diagnosticado na população (BENNETT, 1996).

Suas complicações primárias afetam o sistema vascular, conduzindo ao aparecimento freqüente de doenças coronarianas, renais, retinopatias e cegueira, doença vascular periférica, neuropatia e amputação de membros. Estas complicações aumentam a maioria das morbidades e mortalidades associadas com o diabetes (BENNETT, 1996).

Muitos indivíduos com diabetes do tipo 2 têm hiperglicemia como resultado da deficiência tanto da secreção da insulina como de sua ação, ou seja, disfunção das células β e resistência à insulina (FUJIMOTO, 2000).

No diabetes, a hiperglicemia persistente pode causar alta produção de radicais livres, gerados em processos de autooxidação direta da glicose e

da glicação progressiva de proteínas com conseqüente aumento na formação de AGEs, ativação de NADP oxidases, óxido nítrico sintase e atividade da xantina oxidase, os quais produzem espécies oxidantes e, estresse oxidativo subseqüente (MARTÍN-GALLÁN, *et al.* 2003). Scott e King (2004), relatam que em culturas de células vasculares expostas a altas concentrações de glicose, e em tecidos vasculares de animais e de pacientes com diabetes, foram observados níveis aumentados de marcadores de estresse oxidativo tais como glico-oxidantes, compostos glicosados, LDL oxidada e nitrotirosina.

1.3 Diabetes e síndrome metabólica

No diabetes mellitus há uma inversão da atividade anabólica da insulina, ocorrendo diminuída utilização de glicose pelos tecidos periféricos, e aumentada produção hepática de glicose. Ocorre diminuição da lipogênese e aumento da lipólise. A cetogênese surge em casos avançados de deficiência de insulina.

O processo de desenvolvimento do diabetes é lento e progressivo. O fator resistência à insulina está presente em todas as fases da evolução do diabetes. A resistência à insulina está também associada à hipertensão, dislipidemia e aterosclerose (CHACRA, 2005).

O diabetes e a resistência à insulina podem aumentar consideravelmente o risco de desenvolver doença cardiovascular. O aumento do estresse oxidativo em pacientes que têm diabetes e inadequado controle glicêmico ou resistência à insulina, se deve, provavelmente, ao resultado de um metabolismo anormal como a

hiperglicemia, dislipidemia, e níveis elevados de ácidos graxos livres (SCOTT, KING, 2004).

O diabetes do tipo 2 está associado a síndrome metabólica (síndrome X), que é considerada como a associação de diversos fatores de risco cardiovascular, como hipertensão arterial, obesidade, resistência à insulina, altos níveis de triacilglicerol e baixos de HDL-colesterol. A relação entre hiperglicemia e doença cardiovascular pode ser atribuída a alta prevalência desses fatores de risco na síndrome metabólica ou como um precursor comum de todos estes fatores (SCHAAN, HARZHEIM, GUS, 2004).

A gordura presente no organismo está diretamente associada com o risco de complicações metabólicas, sendo importante a localização desta gordura na gravidade das alterações (LOFGREN, *et. al.*, 2004). A gordura abdominal possui papel importante na resistência à insulina, no desenvolvimento do diabetes do tipo 2 e na hipertensão.

Indivíduos obesos geralmente apresentam hipertensão. A hipertensão é um dos maiores fatores de risco para o aparecimento das doenças cardiovasculares, bem como, acidente vascular cerebral e insuficiência renal crônica. No diabetes do tipo 2, a hipertensão está frequentemente presente como parte da síndrome metabólica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2002).

1.4 Aterosclerose

As principais doenças crônicas não-transmissíveis que acometem a população em geral são as doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes

mellitus e osteoporose. As doenças cardiovasculares são amplamente reconhecidas como importante causa de morbidade e mortalidade em diversos países, principalmente nos desenvolvidos e nos em desenvolvimento. Projeções feitas para o ano de 2020, predizem que as mortes decorrentes das doenças cardiovasculares irão exceder as mortes por doenças parasitárias e infecciosas, pela primeira vez, em todas as regiões do mundo, com exceção da África, conduzindo a uma epidemia global das doenças cardiovasculares (MENDEZ, COWIE, 2001).

A doença aterosclerótica é a principal causa de mortalidade no Brasil. Essa doença é multifatorial e a sua prevenção passa pela identificação e controle, não só das dislipidemias, mas do conjunto de fatores de risco (MENDEZ, COWIE, 2001). A formação da placa aterosclerótica e o desenvolvimento da doença cardiovascular é fortemente influenciada por fatores genéticos, nutricionais e de estilo de vida.

A aterosclerose é a mais freqüente complicação do diabetes. Em indivíduos com diabetes do tipo 2 a incidência da doença coronariana é de 2 a 4 vezes maior do que nos indivíduos sem diabetes. Os níveis de HDL apresentam-se baixos e os triacilgliceróis elevados (STEINER, 2001). O diabetes do tipo 2 está associado com um número de fatores de risco cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial sistêmica, obesidade, resistência à insulina, anormalidade de lipoproteínas plasmáticas e, em geral, altos níveis de triacilglicerol e baixos de HDL-colesterol (SCHAAN, HARZHEIM, GUS, 2004).

Tem sido estabelecido que o diabetes está associado com o aumento das complicações macrovasculares, incluindo doença coronariana,

cerebrovascular e vascular periférica. O mecanismo pelo qual o diabetes acelera a aterosclerose não está totalmente esclarecido, mas tem sido proposto que níveis aumentados de lipoproteínas modificadas quimicamente, podem ser um fator significativo que contribui para o desenvolvimento acelerado das complicações macrovasculares no diabetes (VIRELLA, *et. al.*, 2003).

A aterogênese é um processo complexo envolvendo fatores mecânicos, químicos e biológicos. Danos nas células endoteliais e ativação, fixação e migração de monócitos, através do endotélio, são eventos iniciais da aterosclerose.

A aterosclerose resulta do acúmulo de colesterol e da proliferação de elementos celulares na parede da artéria (STOCKER, KEANEY, 2004). Existem algumas teorias que descrevem as possibilidades para o início dos processos ateroscleróticos, uma delas está relacionada com as formações de estrias gordurosas que progridem e se tornam placas ateroscleróticas, havendo com isto acúmulo de colesterol na camada íntima da artéria e, conseqüentemente difusão de lipoproteínas através do endotélio (SLOOP, 1999).

Ross (1986) apud Damasceno (2001), observaram que modificações primárias no endotélio poderiam ser causadas por lesões teciduais mecânicas, ou por substâncias químicas ou toxinas, infecções virais ou mecanismos imunológicos. Estes fatores quando de ocorrência repetida, não só iniciariam, mas também poderiam influenciar a manutenção e a progressão das lesões ateroscleróticas.

A função da membrana é vital para os processos normais da célula, sendo esta modulada por diversos fatores. A composição e integridade das membranas são fatores importantes, devido principalmente ao fato destas influenciarem na conformação e atividade de muitas enzimas e receptores, envolvidos no sistema de sinalização celular. O dano na membrana causado por processos mediados por peroxidação lipídica, pode contribuir também para alterações no DNA, com implicações na carcinogênese. O dano oxidativo de partículas de lipoproteínas de baixas densidade (LDL) tem sido relacionado com a aterosclerose (WISEMAN, 1996).

O endotélio que limita a parede da artéria está exposto a altas concentrações de lipoproteínas que são ricas em triacilglicerol e colesterol. Quando estas lipoproteínas estão elevadas, pode ocorrer hidrólise de triacilglicerol pela lipase lipoprotéica na proximidade da superfície endotelial (HENNIG, 1996).

Concentrações locais excessivas de ânions de ácidos graxos podem causar injúria endotelial, permitindo a penetração aumentada da lipoproteína remanescente, rica em éster de colesterol (derivada dos quilomícrons ou da lipoproteína de densidade muito baixa - VLDL) para dentro da parede arterial. De acordo com esta hipótese, os eventos subseqüentes conduzem à inicialização da formação da lesão aterosclerótica, pelo acúmulo desta lipoproteína remanescente rica em colesterol na camada íntima da artéria (HENNIG, 1996).

Muitos estudos clínicos sugerem a hipótese de que o risco para a aterosclerose está associado com a proporção de diferentes subfrações de

LDL no sangue (JUN-JUN, *et. al.*, 2000; SEVANIAN, ASATRYAN e ZIOUZENKOVA, 1999).

1.4.1 LDL eletronegativa

As LDLs do plasma humano incluem distintas sub-classes com diferentes tamanhos de partículas. Foram identificadas várias sub-classes, sendo as LDLs carregadas eletronegativamente e de tamanhos menores, predominantemente associadas com o aumento da doença coronariana (WILLIAMS, *et. al.*, 2002).

Existe evidência de que a LDL eletronegativamente modificada, desempenha um papel importante nos diversos processos de formação e progressão de lesões ateromatosas. As explicações sobre a oxidação da LDL, no plasma humano, ainda são limitadas (JUN-JUN, *et. al.*, 2000; SEVANIAN *et. al.*, 1997).

Tem sido reportado haver aumento dos níveis de LDL modificadas (glicada, oxidada, pequena, densa), em diabéticos. A característica comum compartilhada pelas diferentes espécies de LDLs é o aumento da carga eletronegativa na superfície da partícula da lipoproteína, esta característica pode ser usada como um índice do grau de modificação dessas partículas e também pode ser útil para se avaliar condições patológicas, uma vez que a mudança na carga pode representar um importante fator de risco para macroangiopatia diabética (YANO, *et al.*, 2004).

Formas de LDL eletronegativamente modificadas (LDL⁻) isoladas do plasma, utilizando diferentes técnicas cromatográficas, foram caracterizadas por diferenças significantes no conteúdo de proteínas e lipídios quando

comparadas com a subfração LDL nativa (nLDL) (SEVANI, ASATRYAN e ZIOUZENKOVA, 1999).

A composição da LDL⁻ parece influenciar sua propriedade aterogênica, bem como, sua susceptibilidade para alta oxidação e disfunções no metabolismo. Apresenta uma menor afinidade de ligação para receptores LDL (receptores B/E) nos fibroblastos e células endoteliais da pele humana, podendo ligar-se a receptores "scavenger". A LDL⁻ em células endoteliais de cultura apresenta citotoxicidade, diferente da LDL nativa que não apresenta toxicidade (SEVANI, *et al.*, 1997).

Níveis aumentados de LDL eletronegativa foram encontrados em indivíduos com doença coronariana arterial, particularmente em diabéticos e pacientes submetidos à hemodiálise. Assim, níveis de LDL eletronegativa elevados podem ocorrer devido a oxidação da LDL no sangue. Possíveis meios para a formação da LDL eletronegativa no sangue incluem glicação e interações proteína-radical com a apoB 100 (SEVANI, ASATRYAN e ZIOUZENKOVA, 1999).

Evidências sugerem quantidades aumentadas de hidroperóxidos lipídicos na LDL eletronegativa versus LDL nativa, estão de acordo com outros produtos indicativos de estresse oxidativo que também estão mais aumentados nesta fração eletronegativa, como dienos conjugados e produtos de oxidação do colesterol. A LDL eletronegativa também possui menores proporções de ácidos poliinsaturados do que a LDL nativa (SEVANI, *et al.*, 1997).

O índice primário que distingue a LDL eletronegativa da fração total de LDL está na eletronegatividade aumentada, a qual é confirmada por

técnicas de eletroforese. A carga da proteína alterada é acompanhada por uma mudança significativa no conteúdo de ácido siálico, o qual pode estar elevado ou diminuído, e pode estar ligado a eventos de oxidação ou inflamatórios que contribuem para a modificação da LDL e injúria vascular.

A LDL eletronegativa exibe muitas propriedades da LDL densa, dentre estas estão susceptibilidade à oxidação e dano na ligação com o receptor da LDL nativa (PARASASSI, *et. al.*, 2001).

Figura 2: Formação da LDL eletronegativa, a partir da LDLn.

Fonte: SEVANI, 1999.

A formação da LDL eletronegativa, a partir da LDL nativa, seja proveniente da oxidação *in vitro* ou *in vivo*, pode promover a formação tanto de produtos de oxidação lipídica como de oxidação protéica, sendo seus efeitos biológicos subseqüentes demonstrados (figura 2). Para oxidação de lipídios e efeitos de produtos da peroxidação lipídica, eventos típicos incluem estimulação da carga lipídica (evidente em termos de acúmulo de ésteres de colesterol), estimulação de reações inflamatórias celulares e

desregulação de receptores alternados tais como os “scavenger”. Em ambos os casos a modificação de lipídios e proteínas na LDL eletronegativa está usualmente associada com o aumento na oxidação da lipoproteína e aumento da citotoxicidade.

As modificações oxidativas na LDL eletronegativa encontradas no plasma humano contém similaridades com aquelas analisadas *in vitro*, incluindo aumento da carga negativa, conteúdo de dienos conjugados aumentados, TBARS, e diminuição do conteúdo de vitamina E (HODIS, *et. al.*, 1994). Modificações oxidativas *in vitro* levam a mudanças composicionais e estruturais na LDL que podem aumentar sua aterogenicidade, e, a eletronegatividade aumentada é um denominador comum dentre as alterações oxidativas (PARASASSI, *et. al.*, 2001).

Mais investigações são necessárias para se estabelecer a ligação dos antioxidantes na redução da LDL eletronegativa e sua relação para reduzir os fatores de risco da aterosclerose. A detecção dos autoanticorpos tem sido usada visando avaliar as alterações desta subfração durante este processo. Evidências sugerem que concentrações elevadas de autoanticorpos anti-LDL estão correlacionadas com a progressão de lesões ateroscleróticas em humanos.

1.5 Óxidos de colesterol (COx)

Os óxidos de colesterol são um grupo de esteróis com estrutura similar à molécula de colesterol, contendo grupos hidroxila, cetona ou epóxido em um dos anéis ou na cadeia lateral (DIANE, LIN, 1996). São produtos de 27 carbonos, derivados da oxidação do colesterol, os quais têm demonstrado possuir diferentes atividades biológicas *in vitro*, e diversos

destes, têm sido implicados na iniciação e/ou desenvolvimento da aterosclerose (BROWN, JESSUP, 1998).

Os diferentes óxidos podem ser formados por meio de reações enzimáticas ou por via não enzimática. Nos hepatócitos, o colesterol pode ser convertido a COx pela ação do citocromo P-450. Dentro da família do citocromo P-450, a 27-hidroxilase é uma enzima importante, responsável pela hidroxilação da cadeia lateral do colesterol (BJORKHEM,1992). A figura 3: mostra a formação de alguns óxidos por via radicalar.

Figura 3 .- Esquema da formação dos COx por via radicalar (CARERI *et al*, 1998).

Vários óxidos de colesterol têm sido detectados em quantidades apreciáveis em tecidos e fluidos humanos, incluindo o plasma, lipoproteínas aterogênicas e placas aterocleróticas.

Alguns estudos têm relacionado o 7 β OH com o aumento do risco de aterosclerose (BROWN, JESSUP, 1998). O 25OH é o mais estudado de todos os óxidos, ele é um produto da autooxidação do colesterol mas de pouquíssima ocorrência na alimentação humana, sendo também dentre os óxidos, o que menos aparece no plasma humano e nas lesões ateroscleróticas (BROWN, JESSUP, 1998).

Os COx têm sido detectados em diferentes frações de LDL associadas com aumento do risco de desenvolvimento da aterosclerose. Os níveis de COx da LDL eletronegativa isolados de humanos normocolesterolêmicos representa percentagens bem menores, quando comparados com indivíduos hipercolesterolêmicos.

HODIS, *et. al.* (1991), sugeriram que alguns óxidos (7-ceto, α EPOXI e β EPOXI e 25OH) encontrados em níveis elevados no plasma e aorta de coelhos alimentados com dieta rica em colesterol não foram provavelmente derivados da dieta, uma vez que estes não foram detectados na ração rica em colesterol utilizada. Isto pode indicar que o processo oxidativo similar àqueles gerados pelos COx em alguns alimentos processados, pode ocorrer *in vivo*. Estima-se que 1% do colesterol ingerido pela dieta seja oxidado.

Fontes dietéticas de COx são alimentos ricos em colesterol, como ovos, laticínios e carnes. Os COx comumente detectados em alimentos são

os principais produtos da oxidação do colesterol, sendo eles o 7-ceto, 7 β OH, 7 α OH, α EPOXI e β EPOXI (BROWN, JESSUP, 1998).

Os óxidos de colesterol plasmáticos são provenientes, em grande parte, da peroxidação *in vivo* das lipoproteínas, como tem sido demonstrado por vários estudos. A hiperglicemia crônica é uma outra via capaz de gerar diferentes óxidos de colesterol. Ocorre a autooxidação da glicose e de proteínas estruturais e circulantes, promovendo a formação de produtos de glicação avançada (AGEs).

Segundo Bhadra, *et. al.*, (1991), as concentrações de COx encontrados na LDL eletronegativa (LDL⁻) são muito mais elevados, quando comparados aos da LDL nativa, o que poderia contribuir para a maior citotoxicidade e aterogenicidade da LDL eletronegativa.

Ferderbar (2004) afirma que os óxidos de colesterol são biomarcadores da intensidade de modificação oxidativa dos lipídeos, podendo ser útil para o acompanhamento de pacientes diabéticos.

A hiperglicemia pode ativar diferentes rotas envolvidas com o aumento do estresse oxidativo, ocorrendo maior produção de espécies reativas de oxigênio, com isso, ocasionando uma diminuição na defesa antioxidante. Os radicais gerados no estresse oxidativo promoveriam uma maior oxidação do colesterol.

A figura 4 mostra as possíveis interligações entre a hiperglicemia, estresse oxidativo e formação dos óxidos de colesterol.

Figura 4.- Possível ligação entre hiperglicemia, estresse oxidativo e formação de óxidos de colesterol.
(Hunt *et. al*, 1998, citado por Ferderbar, 2004).

Os AGEs formados interagem com receptores celulares específicos- RAGEs (receptores para produtos finais de glicação), presentes nas células endoteliais, macrófagos e células mesangiais, provocando a liberação de EROs, diminuição das concentrações de glutathione reduzida e ativação do NF- κ B.

O aumento da via do poliol leva a uma diminuição da relação NADPH/NADP, resultando na diminuição da regeneração de glutathione oxidada para reduzida e menor síntese de óxido nítrico, devido ao fato de o NADPH ser cofator da óxido nítrico sintase (CAMERON, COTTER, 1997).

A hiperglicemia pode ativar a PKC indiretamente através da ligação AGEs/RAGE (PORTILHA *et. al.*, 2000) e por aumento da via do poliol.

1.6 Zinco

O zinco é um dos mais importantes elementos-traço do organismo. É encontrado em todos os fluidos e tecidos corpóreos e concentrações relativamente altas, com 85% do total de zinco situado nos músculos e ossos, 11% na pele e fígado e o restante nos outros tecidos. A quantidade média de zinco corpóreo em um adulto é de cerca de 1.4-2.3gZn (STEFANIDOU, *et. al.*, 2005). Do total do zinco do sangue de indivíduos adultos normais, cerca de 75 a 88% encontram-se nos eritrócitos, de 12 a 20% no plasma e de 3% nos leucócitos (SANDSTROM, 1997).

O zinco desempenha importante papel na nutrição humana, atuando como agente catalítico de mais de 300 metaloenzimas, participando do metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos (KOURY, DONANGELO, 2003; McCALL, HUANG, FIERKE, 2000; RINK, KIRCHNER, 2000). A sua deficiência tem sido considerada um problema nutricional mundial (SALGUEIRO, *et. al.*, 2000).

O consumo de zinco é influenciado pela fonte protéica da dieta, uma vez que os alimentos-fonte são de origem animal, como carnes, ovos e mariscos. Leguminosas, nozes e cereais integrais são boas fontes de zinco, no entanto, possuem constituintes químicos que diminuem sua absorção, interferindo assim, na biodisponibilidade final deste mineral.

A essencialidade biológica do zinco implica na existência de mecanismo homeostático que regula sua absorção, distribuição, captação e

excreção celular. O zinco regula a atividade enzimática como também a estabilidade de proteínas, sendo um íon ativador ou inibidor (MOCHEGANI, MUZZIOLI, GIACCONI *et. al.*, 2000).

Alguns autores têm classificado o zinco como antioxidante (KOURY, DONANGELO, 2003), porque este pode estar envolvido na estabilização de estrutura de membranas (O'DELL, 2000); na restrição da produção endógena de radicais livres (DiSILVESTRO, 2000; SAKANASHI *et. al.*, 1993), por fazer parte da estrutura da enzima antioxidante extracelular superóxido dismutase (DAVIS *et. al.*, 1998; MARKLUND, 1982) e por manter as concentrações teciduais de metalotioneínas (COUSINS, 1985).

O mecanismo de ação do zinco, no sistema de defesa antioxidante, ainda não está totalmente claro, mas a sua deficiência pode provocar indiretamente dano oxidativo. Salgueiro, *et. al.*, (2000) e Hennig (1996) sugerem que o zinco inibe a reação de propagação dos radicais livres por aumentar a síntese de metalotioneínas, que são proteínas que agem como seqüestradores de radicais livres protegendo as membranas celulares.

O zinco pode ainda ter um papel fisiológico como antioxidante protegendo grupos sulfidrilas contra oxidação e inibindo a produção de espécies reativas de oxigênio pelos metais de transição (BRAY, BETTGER, 1990).

O zinco desempenha importante função como componente essencial das biomembranas, sendo necessário para a manutenção da função e estrutura das mesmas. Existem evidências de que o zinco pode ter propriedades anti-aterogênicas pela prevenção de desarranjos fisiológicos metabólicos do endotélio vascular (WISEMAN, 1996; HENNIG, 1996).

As células endoteliais estão constantemente expostas ao sangue, que contém vários tipos de componentes. Estes componentes circulantes, incluindo os nutrientes que promovem injúria e os protetores, podem interagir com enzimas, receptores e moléculas de adesão e transporte, localizados na superfície luminal das células endoteliais, promovendo a comunicação entre as células de sustentação do sangue (*blood-borne cells*) e os tecidos interluminais. É claro que a manutenção de um adequado suprimento de nutrientes protetores e de forma constante para os tecidos vulneráveis à injúria, pode contribuir para o mecanismo protetor que previne e/ou reduz a aterosclerose. Em geral, quando o desbalanço de alguns lipídeos sanguíneos e citocinas inflamatórias estão implicados no desenvolvimento da aterosclerose, algumas vitaminas e minerais, devido as suas funções como antioxidantes e estabilizadores de membranas, podem apresentar propriedades anti-aterogênicas (HENNIG, 1996; BEATTIE, KWUN, 2004).

1.6.1 Zinco, estresse oxidativo e diabetes

O pâncreas é o local onde a insulina é sintetizada, estocada e secretada, e o zinco está envolvido nestes processos. Os íons de zinco se ligam à estrutura cristalina da insulina, a qual é estocada nos grânulos secretórios.

Existe uma complexa cascata de sinalização nas ilhotas pancreáticas para a secreção de insulina estimulada pela glicose, que envolve canais de potássio ATP-sensitivo. Estudos recentes identificaram o zinco como um

regulador extracelular e intracelular destes canais de potássio (PROST, *et.al.*, 2004).

O diabetes está associado com a deficiência de zinco e esta deficiência é um fator de risco para o dano oxidativo cardíaco. A suplementação de zinco em animais diabéticos, ocasionou uma melhora significativa nas complicações diabéticas, tais como: a gravidade da neuropatia periférica e as perdas ósseas destes animais (SONG, *et. al.*, 2005).

Martín-Gallán *et. al.*, (2003) relataram que ocorreu decréscimo na ocorrência de complicações diabéticas em modelos de animais diabéticos, após a suplementação com diferentes antioxidantes, dando suporte para o papel da lipoperoxidação lipídica no desenvolvimento das complicações diabéticas.

As complicações diabéticas podem ser atribuídas aos efeitos tóxicos da hiperglicemia nos tecidos alvo, ou ao metabolismo anormal de tecidos alvo devido ao defeito na secreção ou resistência à insulina. O zinco melhora a resposta dos tecidos à insulina, diminuindo a resistência (MIRANDA, 2004; MARREIRO, 2002).

Em ratos diabéticos db/db, o zinco diminuiu os níveis de glicose no sangue total (SIMON, TAYLOR, 2001). A suplementação com zinco em diabéticos pode estimular os tecidos a utilizarem a glicose e manter o metabolismo lipídico normal, evitando o estresse oxidativo gerado pelo metabolismo anormal da glicose e dos lipídios (SONG, *et. al.*, 2005).

Nos diabéticos ocorrem diversas anormalidades relacionadas com a distribuição do zinco no organismo, tais como, aumento da perda urinária e

diminuição do zinco plasmático (SENA, PEDROSA, 2005; MARREIRO, 2002; PEDROSA, COZZOLINO, 1998). Segundo Blostein-Fujii, *et. al.* (1997), o diabetes tipo 2 pode causar vulnerabilidade para deficiência de zinco moderada. Estas observações estão baseadas em observações a saber: baixa concentração de zinco sérico, alta excreção de zinco, anormalidade na acuidade do paladar e dano na função imune.

Levine *et al.* (1983) relataram que existe uma relação estrutural e funcional do zinco com a insulina, apesar do zinco não ser necessário para a ação deste hormônio, no entanto, o zinco pode alterar sua estrutura, podendo reduzir sua ação em tecidos periféricos.

O envolvimento do zinco na patogênese da aterosclerose ainda não está bem claro. Evidências sugerem que o zinco pode agir como um fator de proteção endógena contra a aterosclerose, pela inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (HENNIG, 1996). Segundo Beattie e Kwun (2004), se existissem marcadores precisos do estado de zinco, sua deficiência estaria firmemente associada com a progressão da aterosclerose.

Por ser ainda um componente essencial das biomembranas, o zinco também participa extensivamente no metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídeos e no controle da transcrição de genes e outros processos biológicos fundamentais. Por exemplo, membranas de lisossomos isolados foram protegidas de injúrias oxidativas na presença do zinco, e a deficiência de zinco resultou em dano oxidativo de proteínas, lipídeos e DNA em experimentos com ratos. O zinco pode competir com o cobre e o ferro em sítios de ligações das membranas, reduzindo, assim, o

potencial para a formação do radical hidroxila, via ciclo redox (HENNIG, 1996).

A aterogênese está associada com a apoptose de células endoteliais, a qual pode ser iniciada diretamente pelo estresse oxidativo de modificações na LDL e pelos ácidos graxos poliinsaturados. Este processo pode ter início em decorrência das citocinas inflamatórias de monócitos ou macrófagos ativados. O efeito protetor do zinco como antioxidante está relacionado com seu papel de estabilizador das membranas celulares (BEATTIE, KWUN, 2004).

DiSilvestro e Blostein-Fujii (1997), verificaram que em ratos com deficiência moderada de zinco houve uma alta vulnerabilidade da LDL e VLDL à oxidação, que são fatores importantes no processo aterosclerótico.

O desenvolvimento de um processo aterosclerótico pode ser considerado como sendo um processo inflamatório, onde há mobilização de diversas células do sistema imune. Várias doenças associadas com danos na função imune são caracterizadas por baixos níveis plasmáticos de zinco (RINK, KIRCHNER, 2000).

É conhecido que durante a inflamação ou infecção, existe uma redistribuição interna de zinco, sendo este perdido de alguns tecidos, como do plasma, ou acumulado em outros, como no fígado. O endotélio pode ser um dos tecidos no qual o zinco pode ser perdido durante a resposta de fase aguda. O zinco também pode reduzir a habilidade de monócitos humanos de serem ativados pelos lipopolissacarídeos (HENNIG, 1996).

O zinco pode influenciar diretamente as células do sistema imune, aumentando a atividade de enzimas necessárias para a replicação e

transcrição de DNA. Todas estas enzimas são zinco-dependentes e estão envolvidas na mitose. Outras enzimas zinco-dependentes estão presentes nas membranas dos linfócitos. O zinco afeta a estabilidade da membrana por competir com tióis, prevenindo danos peroxidativos, além disso, protege contra o estresse oxidativo induzido pelas citocinas pró-inflamatórias (MOCHEGANI, MUZZIOLI, GIACCONI, 2000).

Níveis plasmáticos de citocinas estão elevados durante a inflamação, infecção, ou injúria celular. A inflamação é uma parte integral do desenvolvimento da aterosclerose. Citocinas inflamatórias, em particular a TNF- α , podem ter um papel crítico na aterogênese. O TNF- α pode agir como um potente fator de ativação endotelial, e a ação da TNF- α , como de outras citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 a IL-8), podem promover a coagulação e inflamação. O TNF- α pode diretamente causar injúria de células endoteliais e iniciar eventos que resultam no aumento da permeabilidade endotelial. Um dos mecanismos da disfunção da barreira endotelial pode ser via indução mediada pela TNF de apoptoses de células endoteliais. Este fator pode reduzir os níveis de glutathione reduzida, comprometendo o sistema de defesa celular antioxidante (HENNIG, 1996).

Outra relação do zinco com o sistema imune está vinculada com funções tímicas. O zinco é elemento essencial para o hormônio tímico zinco-dependente, timulina, que é necessário para a maturação e diferenciação das células T (STEFANIDOU, *et. al.*, 2005).

1.6.2 Ingestão Dietética de Referência para o zinco

As recomendações de nutrientes foram elaboradas para servir de guias para elaboração de dietas, e recentemente, foram estabelecidos

novos valores que visam também à redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis. Isto difere das recomendações anteriores que foram elaboradas visando apenas a ausência de sintomas da deficiência.

A EAR (Necessidade Média Estimada) é um valor de ingestão diária que se estima atender a recomendação de 50% dos indivíduos saudáveis num estágio particular da vida e sexo. É útil para avaliar a adequação da ingestão de grupos e para planejar a ingestão adequada pelos grupos.

A RDA (Ingestão dietética recomendada) é uma média de ingestão diária de nutrientes suficientes para atender a recomendação de praticamente todos (97 a 98%) indivíduos saudáveis num estágio particular da vida e sexo. É um valor a ser utilizado como meta de ingestão alimentar de indivíduos saudáveis.

O UL (Limite superior tolerável de ingestão) é o valor médio mais alto de ingestão diária de um nutriente que se acredita não coloque os indivíduos em risco de efeitos adversos à saúde. Quando a ingestão encontra-se acima do UL o risco de efeito adverso aumenta. São úteis na utilização de alimentos fortificados e no uso dos suplementos alimentares.

A tabela 1, mostra as DRIs (Ingestões Dietéticas de Referência) para o zinco

Tabela 1. Ingestões dietéticas de referência para o zinco

Idade/ sexo	EAR	RDA	UL
> 19 anos / M	9,4	11	34
> 19 anos / F	6,8	8	34

Fonte: IOM, 2001 Legenda: M: masculino F: feminino

Sendo o zinco um mineral relacionado com processos oxidativos, é necessária a avaliação de sua ingestão via alimentar, associada com a avaliação de parâmetros bioquímicos de indicação de seu estado nutricional, visando minimizar as ações decorrentes de sua deficiência, principalmente em indivíduos com doenças crônicas não transmissíveis. Estas doenças levam a um aumento dos níveis de estresse oxidativo, como é o caso do diabetes mellitus. Deste modo, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que abordem a temática zinco e doenças crônicas, verificando o envolvimento deste elemento com parâmetros oxidativos.

2.0 – OBJETIVO

- Verificar se a suplementação de indivíduos diabéticos (tipo 2) com zinco pode melhorar as características indicativas de dano oxidativo.

3.0 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

Os indivíduos portadores de diabetes tipo 2 (n=50) foram triados na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia/SP e do Centro Comunitário de Itaquera (zona leste de São Paulo). Foi realizado um estudo duplo-cego, no qual um grupo recebeu a suplementação de zinco aminoquelado, 20mg/dia, por um período de 6 meses e o outro grupo apenas placebo.

Os indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2) estavam sendo tratados com anti-hipertensivo (inibidor da enzima conversora de angiotensina), hipolipemiante (estatina) e hipoglicemiantes (metformina).

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética das instituições envolvidas, ou seja, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP e Faculdade de Ciências Médicas - Santa Casa/São Paulo (anexo 1 e 2). Todos os pacientes assinaram Termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 3).

3.1.1 Critérios de inclusão

Fizeram parte do estudo os pacientes que apresentaram as seguintes características:

- Diabetes tipo 2 (segundo os critérios estabelecidos pela American Diabetes Association);
- Ambos os sexos;
- Sem distinção de raça;
- Idade acima de 40 anos;
- Pacientes com hemoglobina glicada entre 7 e 12%.

3.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentaram uma das características relacionadas a seguir:

- Doença psiquiátrica grave limitando a capacidade de compreensão e aceitação para participar com a doação do material;
- Diabetes Mellitus secundário a pancreatopatia crônica;
- Doença Hepática conhecida ou transaminases superior a três vezes o valor normal;
- Que fizessem uso de suplementos vitamínicos e/ou minerais que pudessem interferir com alguns dos parâmetros investigados no estudo.

3.1.3. Critérios para Interrupção do Estudo

- Pacientes que não desejassem mais participar do estudo;
- Pacientes que fossem hospitalizados e, neste caso, foi verificada a causa da internação.

3.2 Avaliação antropométrica

3.2.1 – Peso e estatura:

Medidas realizadas pela pesquisadora. Estas medidas foram utilizadas para a obtenção do índice de massa corpórea [$IMC = \text{Peso(kg)} / \text{altura}^2(\text{m})$]. Os pontos de corte recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para este índice considerando a população adulta e idosa são subdivididos da seguinte forma: magreza grave ($IMC < 16,0$); magreza moderada ($16,0 \leq IMC < 17,0$); magreza leve ($17,0 \leq IMC < 18,5$); normal ou adequado ($18,5 \leq IMC < 25,0$); sobrepeso grau I ($25,0 \leq IMC < 30,0$); sobrepeso grau II ($30 \leq IMC < 40,0$) e sobrepeso grau III ($IMC \geq 40$).

3.2.2 Índice de gordura localizada – circunferência da cintura: Para obtenção desses valores utilizou-se fita métrica inelástica. A medida de circunferência da cintura (região mais estreita do abdome) é determinada na altura do umbigo.

As medidas do perímetro da cintura podem classificar os indivíduos de acordo com a distribuição de gordura corporal, relacionando-a com o risco de doenças crônicas não transmissíveis, principalmente as cardiovasculares. Os valores da circunferência da cintura considerados como risco de doença cardiovascular são >102 cm para os homens e >88 cm para as mulheres (WHO, 1997; LOFGREN, *et. al.*, 2004).

3.2.3 Bioimpedância elétrica (BIA): A Bioimpedância Elétrica vem sendo amplamente utilizada por ser simples, rápida, segura e não-invasiva. O aparelho usado foi um BIODYNAMICS modelo 310, Body Composition Analyser – USA. Os valores considerados normais para o percentual de gordura são de 15-25%, para os homens e 20-30%, para as mulheres.

3.3 Avaliação de consumo alimentar

Os participantes efetuaram o registro diário de alimentos no início da pesquisa, durante 2 dias na semana e 1 dia no final de semana (sábado ou domingo). A avaliação da ingestão de nutrientes foi efetuada por meio do programa computacional “Virtual Nutri” modificado, pela inclusão de dados de conteúdo de zinco. A adequação da dieta foi avaliada conforme as DRIs (2000/2002), considerando energia, macronutrientes (proteína, lipídeos e carboidratos) e zinco (Anexo 4). Foi considerada dieta adequada aquela que apresentou valor calórico total entre 80-120 % do recomendado.

3.4 Identificação social e saúde/doença

Os participantes foram submetidos a uma entrevista, utilizando-se questionário padrão, constando perguntas abertas e fechadas sobre dados pessoais (nome, data de nascimento, sexo), condição social (indicadores de estilo de vida – prática de atividade física, tabagismo, etilismo, acesso a serviços de saúde), estado de saúde (presença de doenças crônicas não transmissíveis, outras enfermidades atuais, tipos de medicamentos consumidos) (anexo 5).

3.5 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada por profissional qualificado, após jejum de 12hs, onde foram coletados 20 mL de sangue, utilizando-se material descartável.

A coleta do sangue dos indivíduos foi feita em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetracético)(1 mg/mL de sangue) para obtenção do plasma e sem EDTA, para obtenção do soro. O restante do sangue foi colocado em tubos desmineralizados contendo citrato de sódio a 30%, que é o anticoagulante mais indicado para análises com zinco. O plasma, o soro e o eritrócito foram separados conforme normas de procedimentos estabelecidas pelo Laboratório de Nutrição e Minerais (FCF-USP). O material foi acondicionado em freezer a -80°C até o momento da análise.

Nos *ependorffs* que continham plasma, destinados a determinação da LDL eletronegativa e dos óxidos de colesterol, foi acrescentado um *pool* de antioxidantes para diminuir a oxidação do sangue. O *pool* era composto por: BHT (1µL/mL) e uma combinação de inibidores de protease: benzamidina (2µL/mL), aprotinina (2µL/mL) e PMSF (2µL/mL).

3.5.1 Medidas Bioquímicas

Foram realizadas as seguintes medidas bioquímicas:

- ✓ Concentração de zinco no plasma
- ✓ Concentração de zinco no eritrócito
- ✓ Hemoglobina eritrocitária
- ✓ Glicose plasmática
- ✓ Concentrações das frações lipídicas (colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL-C e Triacilglicerol)
- ✓ Óxidos de colesterol
- ✓ Atividade enzimática da Superóxido Dismutase
- ✓ Dosagem de autoanticorpo anti-LDL eletronegativa

3.5.2 Determinação do zinco

Preparo do material - desmineralização

Todo material utilizado no experimento foi desmineralizado em banho de ácido nítrico a 30%, por no mínimo 12 horas, e enxaguado 10 vezes em água deionizada, para se evitar possíveis contaminações.

3.5.2.1 Zinco plasmático

A determinação do zinco no plasma foi realizada conforme a técnica de RODRIGUEZ *et al.*, (1989) por espectrofotometria de absorção atômica com chama. O aparelho utilizado para as determinações foi um espectrofotômetro de fluorescência HITACHI Z-5000, equipado com lâmpada de catodo oco, sob as condições de trabalho: comprimento de

onda de 213.9, fenda 0.4nm, chama oxidante com mistura de acetileno (25): ar (40), sendo realizadas três leituras com tempo de integração de 3 segundos.

A curva padrão foi preparada com Tritisol[®] (NIST), sendo considerados como pontos de leitura 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0 µg/mL. A diluição da curva foi feita com ácido nítrico a 1%.

Seguiu-se junto com as amostras o padrão de referência bovino liver (Standard Reference Material - SRM 1577b), para determinação de matrizes biológicas, que obteve uma recuperação entre 96 e 102%.

As amostras foram preparadas, segundo normas de procedimentos estabelecidas pelo Laboratório de Nutrição e Minerais (FCF-USP), lidas em triplicata, e os resultados calculados a partir das absorbâncias obtidas foram expressos em µgZn/dL, representando a média das concentrações das amostras.

3.5.2.2. Zinco eritrocitário

A determinação do zinco eritrocitário foi feita segundo a técnica de WHITEHOUSE *et. al.*, (1982) adaptado por CORDEIRO (1994) por espectrofotometria de absorção atômica com chama (HITACHI Z-5000).

Para se expressar os resultados de zinco, foram determinadas as concentrações de hemoglobina (VAN ASSENDELFT, 1972), e seguidos os procedimentos estabelecidos pelo Laboratório de Nutrição e Minerais (FCF-USP).

As condições do aparelho e o padrão Tritisol utilizados seguiram as mesmas condições que foram descritas para a determinação do zinco no plasma.

3.5.3 Determinações dos parâmetros glicêmicos e lipídicos

As concentrações de colesterol plasmático total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicerídeos foram realizadas por métodos enzimáticos comerciais (Labtest).

O colesterol contido na HDL foi determinado após a precipitação das frações LDL e VLDL. As frações LDL e VLDL foram calculadas utilizando-se a equação de Friedwald e cols (1972), onde:

$$\#LDLc = CTc - (VLDLc + HDLc)$$

$$\#VLDLc = \text{triacilglicerol}/5.$$

A determinação da glicose foi feita por método enzimático, e a determinação de hemoglobina glicada por troca iônica, utilizando kits comerciais (Labtest).

Valores de referência dos exames laboratoriais

- ✓ Triacilglicerol (mg/dL) – ótimo <150 mg/dL; limítrofe 150-200 mg/dL; alto 200- 499 mg/dL; muito alto > 500 mg/dL
- ✓ Colesterol total (mg/dL): ótimo <200 mg/dL; limítrofe 200-239 mg/dL; alto > 240 mg/dL
- ✓ LDL até 100 mg/dL*
- ✓ HDL > 40 mg/dL
- ✓ VLDL até 40 mg/dL

*Valor recomendado pela Associação Brasileira de Medicina, Conselho Federal de Medicina e American Heart Association

3.6 Metodologia analítica de quantificação dos COx.

3.6.1.- Preparação dos padrões

Os padrões de óxidos de colesterol (Steraloids, Inc.) usados para as determinações foram:

- 7 β -Hidroxicolesterol;
- 7 α -Hidroxicolesterol;
- 7-Cetocolesterol;
- 25-Hidroxicolesterol;
- Colestan-3 β , 5 α , 6 β -triol;
- Colesterol-5,6 β -epóxido;
- Colesterol-5,6 α -epóxido;
- 5 α -colestano (usado como padrão interno).

Os padrões foram dissolvidos em tolueno, com exceção do colestanotriol e 25-hidroxicolesterol, que foram dissolvidos em metanol.

3.6.2 Preparação da amostra.

Para a extração dos lipídeos partiu-se de uma amostra de 500 μ L de plasma e adicionou-se 100 μ L (200ng/ μ L) de padrão interno (5 α -colestano), clorofórmio e metanol (1:2). O extrato lipídico foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e redissolvido com 1.0 mL de tolueno: acetato de etila (1:1). A fração lipídica neutra (triglicerídeos, colesterol e óxidos de colesterol) e a fração lipídica polar (fosfolípidos) foram isoladas por extração em fase sólida (Waters, Colunas de diol), com tolueno: acetato de etila, seguida de metanol. A fração lipídica neutra foi saponificada (hidrólise dos lipídeos) e metilada com diazometano éter (conversão dos ácidos carboxílicos em metil éster) (SEVANIAN, STEIN, 1979).

3.6.3.-Determinação por CG com ionização de chama (GC-FID)

Os óxidos de colesterol extraídos foram derivatizados a trimetilsilil (TMS) por adição de 100 µL de Bis (trimetilsilil) trifluoracetamida (BSTFA) e 100 µL de dimetilformamida, selado com prévio fluxo de nitrogênio por 30 segundos, mantidos a 80 °C por 20 minutos e injetado por injeção automática (1µL) no cromatógrafo a gás (CG 6890-Plus- Hewlett Packard), equipado com detector de ionização de chama (FID), utilizando-se a coluna HP-1 (100% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm, Hewlett Packard).

O gás nitrogênio foi usado como gás carreador, com fluxo de 5 mL/min e pressão de 20 psi; a temperatura de injeção foi de 290 °C e a temperatura inicial da coluna foi de 260°C, com um *split ratio* 1:5. A temperatura do detector foi de 300°C e o programa de temperatura usado ocorreu mantendo-se a temperatura inicial por 2 minutos, seguido de aumento de 5 °C/minuto até 290 °C, sendo o tempo total de corrida de 10 minutos (SEVANI, *et. al.*, 1994, adaptado em relação à coluna cromatográfica).

Os óxidos de colesterol foram determinados antes de ser completado o período de 2 meses após a coleta de sangue.

3.7 Superóxido dismutase (CuZn-SOD)

A determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase¹ foi realizada através de Kits comerciais (SD 125 - RANDOX Laboratories,

¹ A leitura da SOD foi realizada no laboratório de doenças nutricionais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, sob orientação da técnica Clara Mori (FMVZ/USP).

Crumlin/UK) adaptados para uso em analisador bioquímico automático (Liasys® MAS, Rome Italy). O método é baseado na inibição da reação entre o composto 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazólio cloreto e o radical superóxido que originam um composto de coloração avermelhada. A xantina e a xantina oxidase são utilizados como geradores de radicais superóxido. A atividade da enzima é mensurada pelo grau de inibição da reação em comprimento de onda de 505 nm.

O eritrócito foi diluído em água Milli Q, numa proporção de 1:4, sendo feita a partir desta proporção, mais uma diluição com água de 1:10. Foi realizada uma diluição de 25 vezes com o tampão fosfato (0,01 M, pH 7,0). Foi determinada a concentração de hemoglobina do hemolisado.

A atividade da SOD é medida pelo decréscimo da inibição dessa reação. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/g de Hb.

A atividade da enzima SOD foi determinada antes de ser completado o período de 2 meses após a coleta de sangue.

3.8 Dosagem do autoanticorpo anti-LDL eletronegativa

Obtenção da LDL nativa e LDL (-) :

- Purificação de LDL do plasma

O sangue foi obtido de voluntários normocolesterolêmicos, coletado em tubos contendo EDTA e imediatamente centrifugado à 1500 rpm por 10 minutos à 4°C. Ao plasma obtido foi acrescido um *pool* de antioxidantes (descrito no item 3.2.1). Após este procedimento, o plasma passou por ultracentrifugação seqüencial para obtenção da LDL com uma ultracentrifuga da Sorvall modelo Ultra Pro 80 com um rotor T-1270. A LDL

isolada foi dializada contra tampão tris-HCL, pH 7,4, contendo EDTA à 4°C durante 4 horas. O tampão foi trocado a cada hora (REDGRAVE, *et. al.*, 1975).

- Obtenção da LDL (-) por cromatografia líquida (FPLC)

O isolamento da LDL (-) foi realizado por FPLC com uma coluna UNO Q1. O procedimento foi iniciado com a lavagem da coluna com 300 mL do tampão B (10 mmol/L tris-HCL, 1 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7,4) e depois equilibrada com 300 mL de tampão A (10 mmol/L tris- HCL, 1 mmol/L EDTA, pH 7,4). A LDL foi dializada contra o tampão A sendo então injetada na coluna. O procedimento cromatográfico contou com um fluxo de 4 mL/ min em diferentes gradientes: 0 a 100 mL: 0% tampão B; 100 a 200 mL gradiente contínuo: 0 a 10 % tampão B; 200 a 400 mL: 22% tampão B; 400 a 600 mL: 50% tampão B; 600 a 800 mL: 100% tampão B (De CASTELLARNAU *et. al.*, 2000).

A determinação dos autoanticorpos foi realizada por meio de ensaio ELISA. As placas (EIA/RIA, Costar, Cambridge, MA, USA com 96 poços) foram sensibilizadas da seguinte forma:

- 45 wells com LDL eletronegativa
- 45 wells com LDL nativa
- 6 wells foram deixados, não sensibilizados, para serem usados como controle.

A concentração utilizada para a sensibilização das placas, seja para a LDL(-) ou para a LDL nativa, foi de 1µg/mL.

Lavagens: Até a etapa do conjugado, foram feitas 3 lavagens nas placas com PBS tween a 0,05%.

Bloqueio: O bloqueio utilizado foi uma solução de leite Molico a 2% em PBS (50mM Tris, 150 mM NaCl - pH=7,4), com período de incubação de 2 horas em temperatura ambiente.

Soro: Os soros foram diluídos em solução de leite Molico a 1% em PBS, na diluição de 1/50, em triplicata. O tempo de incubação foi de 2 horas em temperatura ambiente.

Conjugado: Utilizou-se diluição de 1/5000 do conjugado (monoclonal *anti-human* sigma) em solução de leite Molico a 1% em PBS. O tempo de incubação foi de 45 minutos em temperatura ambiente.

Revelação: Utilizou-se solução de OPD (orto-fenilenodiamina) – 1 pastilha em 5 mL de tampão para OPD. Após período de 5 minutos, realizou-se o bloqueio com $H_2SO_4.4N$.

Leitura: A leitura da placa foi realizada utilizando-se a leitora de placas de ELISA (SpectraCount, Packard Meriden, USA) a 490 nm.

3.9 Suplementação

Os participantes selecionados foram submetidos a dois períodos de avaliação. No primeiro, ou seja, no início da pesquisa (baseline) foram avaliados todos os parâmetros bioquímicos propostos para este estudo, ao mesmo tempo em que foram obtidos dados complementares sobre cada participante. O segundo período foi realizado após 6 meses de suplementação duplo-cego com zinco aminoquelado (20 mg/dia) ou placebo. A definição do período de 6 meses baseou-se no tempo previsto para observação de mudanças no metabolismo das lipoproteínas, considerando ainda a meia vida dos eritrócitos de 120 dias.

O suplemento utilizado foi zinco ligado a 2 moléculas de glicina na forma de quelato. Sua absorção é de 50%, sendo considerada, 2,5 vezes maior que a do sulfato de zinco e 4 vezes maior que a do óxido de zinco (Albion Laboratories).

Os aminoácidos quelatos apresentam menor toxicidade quando comparados com outras formas de minerais. Os minerais quelatos com glicina são muito bem tolerados, não apresentam efeitos colaterais como náuseas e gastrites que podem ocorrer com a suplementação com sais de zinco.

Considerando que a Ingestão Dietética Recomendada (RDA) é de 11 e 8 mgZn/dia, para o sexo masculino e feminino, respectivamente, e que o Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL), é de 34 mgZn/dia, para ambos os sexos, decidiu-se utilizar a dose de 20 mgZn/dia, uma vez que estaria sendo suprido o recomendado para a RDA, sem ultrapassar o valor da UL. Ainda deve ser considerada a percentagem proveniente da dieta diária dos pacientes.

3.10 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) ou, quando apropriado, como mediana (quartis inferior e superior). Testes paramétricos foram aplicados para variáveis com distribuição normal ou próxima da normal. No entanto, testes não-paramétricos foram utilizados para variáveis com distribuição assimétrica. Nas comparações entre os valores de pré- e pós-tratamento, o teste *t* para amostras relacionadas ou o teste não-paramétrico de Wilcoxon foram utilizados.

As diferenças entre os grupos (tratamento versus placebo) foram comparadas por teste t para amostras independentes ou pelo teste U de Mann-Whitney. Todas as análises foram executadas com o programa estatístico SPSS 8.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Valores de $P \leq 0.05$ foram considerados significativos (bi-caudal).

4.0 RESULTADOS

4.1 Parâmetros antropométricos

Os participantes da pesquisa apresentaram média de idade (anos) de $58 \pm 9,9$; o peso (kg) de $74,2 \pm 19,4$; e a estatura (m) de $1,6 \pm 0,1$.

Os resultados do IMC, circunferência da cintura dos pacientes com diabetes suplementados com zinco e do grupo placebo encontram-se nas figuras 5 e 6.

Figura 5. Classificação dos pacientes diabéticos quanto ao Índice de Massa Corpórea

Do total dos pacientes estudados, 43% apresentaram sobrepeso de grau I, 44%, sobrepeso de grau II, e apenas 13%, normalidade, quando avaliados pelo IMC (figura 5).

Figura 6. Classificação do percentual de gordura nas mulheres e homens diabéticos, quanto a circunferência da cintura.

Pontos de corte considerados: para mulheres até 88cm, e para os homens até 102 cm.

De acordo com a classificação do percentual de gordura analisado pela circunferência da cintura, houve uma maior prevalência de sobrepeso entre as mulheres (98%) em relação aos homens (71%).

Utilizando-se o parâmetro de avaliação da bioimpedância elétrica, o percentual de gordura foi de $36,7\% \pm 8,6$, sendo considerado alto, corroborando com os outros métodos de análise acima citados.

4.2 Consumo Alimentar

Por meio dos dados obtidos pelo Registro de Consumo Alimentar (3 dias), foi realizada uma comparação entre o consumido e o recomendado de energia da dieta e o percentual de macronutrientes dos pacientes diabéticos participantes da pesquisa (tabela 2).

Variáveis	Energia (kcal)		Proteína (%)	Carboidrato (%)	Lipídeos (%)
	R	C			
Mediana	2139	1527	21,2	51,0	27,4
DP	431,6	325,8	3,8	5,6	4,5

Tabela 2. Valores de energia, proteína, carboidratos e lipídeos. R: recomendado, C: consumido. *de acordo com DRI's (2002).

Faixa de valores: proteínas (10-35%), carboidratos (45-65%) e lipídeos (20-35%).

A tabela 3 apresenta o percentual do zinco dietético obtido por meio de registros alimentares dos participantes da pesquisa de acordo com os valores sugeridos para este mineral.

DRIs	Zinco dietético (%)
< EAR	45,2
Entre EAR e a RDA	23,1
> RDA	31,7

Tabela 3. Valores de zinco dietético. Faixa de classificação de acordo com DRI's (2002) para EAR e RDA.

4.3 Características do perfil social e da prática de atividade física

A tabela 4 apresenta o percentual de praticantes de atividade física dentre os participantes da pesquisa.

Tabela 4: Percentagens gerais dos diabéticos participantes que praticavam atividade física

Atividade física	Geral	Grupo Zinco	Grupo Placebo
% praticantes	51,6	52,4	51,9
% não praticantes	48,4	47,6	48,1

Foram considerados como praticantes de atividade física as pessoas que tinham frequência de alguma prática esportiva pelo menos duas vezes por semana. A caminhada foi a atividade física mais prevalente no grupo.

Os medicamentos mais utilizados pelos pacientes diabéticos participantes do estudo encontram-se relacionados abaixo: Captopril, metformina, higraton, AAS, sinvastatina, acetildopamina, daonil. Foram relatados uso de monocordil, propranolol, voltaren e enalapril. Dentre as doenças associadas que acometiam os pacientes diabéticos do presente

estudo, a hipertensão foi a mais prevalente, 49% do total de casos, sendo proporcional a ocorrência entre os dois grupos. Casos de osteoporose e doenças cardiovasculares estiveram presentes em cerca de 4% dos pacientes. Dislipidemia teve um percentual elevado, sendo constatado por meio das tabelas 7, 8 e 9, no entanto, alguns pacientes não relataram este dado no momento da entrevista.

4.4 Perfil lipídico e hemoglobina glicada

As tabelas 5, 6 e 7 mostram os valores encontrados do perfil lipídico dos pacientes suplementados com zinco e do grupo placebo nas fases antes e após intervenção.

Tabela 5. Percentagens dos valores de colesterol total (mg/dL) encontrados nos diabéticos antes e após intervenção. Não houve diferença significativa entre os períodos antes e após da intervenção.

Tabela 6. Percentagens dos valores das frações de colesterol (mg/dL) encontrados nos diabéticos antes e após intervenção. Não houve diferença significativa entre os períodos antes e após da intervenção.

Tabela 7. Percentagens dos valores dos triacilgliceróis (mg/dL) encontrados nos diabéticos antes e após intervenção. Não houve diferença significativa entre os períodos antes e após da intervenção.

O percentual de hemoglobina glicada encontrava-se entre os valores de 7 a 12%, atendendo ao critério de inclusão dos participantes na pesquisa.

4.5 Parâmetros bioquímicos de avaliação do estado nutricional relativo ao zinco.

Nas figuras 7 e 8, encontram-se os resultados obtidos das concentrações de zinco no plasma e eritrócito dos pacientes diabéticos suplementados com zinco e do grupo placebo nos períodos de pré e pós-intervenção.

Figura 7. Concentrações de zinco no plasma (valores de mediana). Comparação entre os períodos de pré e pós-intervenção do grupo suplementado com zinco e do placebo.

Valores normais: Plasma: 70 – 110 ($\mu\text{g/dL}$) (GIBSON, 1990; IYENGAR, 1988)

Figura 8. Concentrações de zinco no eritrócito (valores de mediana). Comparação entre os períodos de pré e pós-intervenção do grupo suplementado com zinco e do placebo.

Valores normais: eritrócito: 40 – 44 ($\mu\text{gZn/gHb}$) (GUTHRIE, PICCIANO, 1994).

4.5.1 Zinco plasmático

Em relação ao zinco plasmático, foi verificado que os pacientes diabéticos suplementados com zinco tiveram apenas um leve aumento deste índice, em relação aos valores de concentração antes da intervenção, no entanto, este não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A tabela 8 mostra a percentagem de classificação diabéticos suplementados com zinco e placebo nas fases pré e pós-intervenção quanto aos valores de referência para o zinco plasmático.

Tabela 8: Percentagem dos valores de zinco plasmáticos

Zinco plasmático	Grupo zinco		Grupo placebo	
	Pré	Pós	Pré	Pós
Abaixo de 70 μ gZn/dL	54,2%	40,7%	52,2%	63,6%
Entre 70-110 μ gZn/dL	45,8%	59,3%	47,8%	36,4%
Acima de 110 μ gZn/dL	- %	-%	- %	-%

Valores de referência: entre 70-110 μ gZn/dL

Figura 9: Figura das concentrações de Zn plasmático do grupo suplementado e do grupo placebo. Escala em μ gZn/dL

4.5.2 Zinco eritrocitário

Os valores encontrados para as concentrações de zinco no eritrócito foram semelhantes àqueles encontrados para o plasma. Foi verificado que o grupo suplementado com o zinco apresentou valores de concentrações maiores do que o grupo placebo, no entanto, estes não foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Dentre os resultados, o grupo que foi suplementado com zinco apresentou os seguintes valores de concentração de zinco no eritrócito antes e após intervenção (tabela 9):

Tabela 9: Percentagem dos valores de zinco eritrocitário

Zinco eritrocitário	Grupo zinco		Grupo placebo	
	Pré	Pós	Pré	Pós
< 40µgZn/gHb	44%	29,2%	45,45%	55%
40-44 µgZn/gHb	22%	25%	18,18%	15%
> 44 µgZn/gHb	44%	45,8%	36,37%	30%

Valores de referência: 40 - 44µgZn/gHb

Figura 10: Figura das concentrações do zinco no eritrócito dos diabéticos suplementado com zinco e com placebo

4.6 Atividade enzimática da superóxido dismutase

A tabela 10 mostra as percentagens das concentrações da superóxido dismutase nos diabéticos suplementados com zinco e do grupo placebo antes e depois da intervenção.

Atividade SOD	Zinco*		Placebo*	
	Antes	depois	Antes	depois
< 1102	29,2	66,7	36,4	90,9
1102 – 1601	62,5	33,3	54,5	9,1
> 1601	8,3	-	9,1	-

Tabela 10. Percentagem dos diabéticos classificados de acordo com a classificação proposta para a atividade da SOD nos grupos suplementados com zinco e placebo, antes e depois da intervenção.* Diferença estatística significativa entre o antes e depois ($p < 0.05$). Valores de referência: 1102-1601 U/gHb

Após a suplementação houve diminuição significativa da concentração da atividade enzimática da superóxido dismutase nos grupos analisados, suplementado com zinco e o placebo. Não houve efeito da suplementação com zinco neste parâmetro, uma vez que ocorreu diminuição significativa para os dois grupos estudados.

4.7 Determinação dos óxidos de colesterol

Os resultados da determinação dos COx estão normalizados pela concentração de colesterol plasmático total (ng COx/ mg C.T.). As figuras 11 e 12 apresentam os resultados das concentrações plasmáticas dos óxidos de colesterol totais no grupo suplementado com zinco e placebo, antes e depois da intervenção, respectivamente.

Figura 11. Concentração plasmática dos óxidos de colesterol no grupo suplementado com zinco nos períodos antes e depois da suplementação. Resultados expressos como mediana (mínimo-máximo). Sem diferença estatística. $p < 0,05$.

Figura 12. Concentração plasmática dos óxidos de colesterol no grupo placebo antes e depois da suplementação. Resultados expressos como mediana (mínimo-máximo). Sem diferença estatística. $p < 0,05$.

4.8 Autoanticorpo anti-LDL eletronegativa

Os resultados da razão encontrada entre os valores de concentrações médias da LDL nativa e da LDL eletronegativa nos grupos que receberam suplemento com zinco e o placebo estão demonstrados na figura 13. Os tratamentos aplicados não promoveram alterações estatisticamente significativas.

Figura 13. Média das comparações entre a razão das concentrações entre a LDL nativa e a LDL eletronegativa nos tempo 1(início) e 2 (após 6 meses). Tratamento com zinco e placebo. Não houve diferença significativa entre as razões nos períodos antes e depois da intervenção.

Tabela 11. valores de LDL nativa, eletronegativa e da razão entre ambas.

	Grupo zinco		Placebo	
	Antes	depois	Antes	depois
LDL nativa	0,64	0,64	0,67	0,61
LDL -	0,45	0,39	0,47	0,35
Razão LDL nativa/LDL-	1,4	1,2	1,3	1,8

4.9 Correlações entre as variáveis do estudo

Os dados também foram analisados de acordo com análise de estratificação, sendo realizadas correlações entre todas as variáveis do estudo. Segue abaixo os resultados encontrados para aquelas características que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

Variáveis	Grupo	
	Zinco Antes X depois	Placebo Antes X depois
IMC>30 X Zinco plasmático	0.037	NS
IMC<25 X óxido α -epóxido	0.002	NS
Hipoglicemiante negativo X LDL nativa	NS	0.028
Hipoglicemiante positivo X óxido 7 α -OH	NS	0.015
Hipoglicemiante positivo X óxido 7 β -OH	0.006	NS
Hipoglicemiante positivo X óxido α -epóxido	0.005	NS
Hipolipemiante positivo X colesterol total	0.043	NS
Hipolipemiante negativo X óxido 7 β -OH	0.003	NS
Hipolipemiante negativo X α -epóxido	0.003	NS
Inibidor de ECA positivo X óxido- 7 β -OH	0.011	NS
Inibidor de ECA positivo X óxido α -epóxido	0.028	NS
Inibidor de ECA negativo X óxido β -epóxido	0.021	NS
Inibidor de ECA negativo X óxido α -epóxido	0.018	NS
Atividade física positiva X óxido- 7 β -OH	0.036	NS
Atividade física positiva X óxido α -epóxido	0.018	NS
Atividade física negativa X óxido α -epóxido	0.028	NS
Hipertensos X óxido- 7 β -OH	0.011	NS
Hipertensos X óxido α -epóxido	0.012	NS
Cardiopatia negativa X óxido α -epóxido	0.002	NS

Tabela 12. Correlações encontradas entre as variáveis do estudo. NS: não significativo. Significância $p < 0,05$. *diferença relacionada com aumento.

5.0 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação antropométrica

A distribuição da gordura corporal tem forte determinação genética, mas fatores como a idade, sexo e características comportamentais, como tabagismo e atividade física, bem como a existência de doenças, como diabetes mellitus e hipertensão, podem também interferir.

É de grande importância a distribuição da gordura corporal na etiologia dos desarranjos metabólicos decorrentes da obesidade. A obesidade abdominal visceral é um grave fator de risco cardiovascular e de distúrbio na homeostase da glicose-insulina. Este fator também está associado com hipertensão, dislipidemias, aceleração da progressão da aterosclerose e fatores psicossociais (MARTINS, MARINHO, 2003).

A circunferência da cintura tem sido apontada como o melhor indicador, em relação à razão cintura-quadril, para se avaliar gordura abdominal, devido a sua melhor reprodutibilidade. No entanto, estes dois indicadores trazem diferentes informações a respeito dos distúrbios metabólicos associados à gordura corporal centralizada. Em indivíduos na fase adulta, Viggiano (2001) encontrou associação entre alterações glicêmicas e obesidade abdominal.

A circunferência da cintura é o melhor indicador da massa adiposa visceral, estando fortemente associada com a doença cardiovascular aterosclerótica. Já a relação da circunferência da cintura e do quadril, apresenta a medida da região glútea ou seja, área rica de tecidos musculares, os quais são responsáveis pela sensibilidade à insulina

sistêmica, sendo assim, mais associado com a resistência à insulina (BJÖRNTORP, 1997).

Martins e Marinho (2003), encontraram associação significativa entre circunferência da cintura e hipercolesterolemia, enquanto a relação circunferência da cintura e do quadril, foi associada com baixos níveis de HDL-C. Estes métodos de avaliação da gordura corporal têm sido muito utilizados em diferentes estudos.

Os participantes desta pesquisa apresentaram valores de circunferência da cintura superiores aos considerados como padrão de normalidade, sendo a prevalência de percentual de gordura acima dos 70% para o sexo masculino, e de 98% para o sexo feminino, caracterizando esta população com sobrepeso/obesidade.

O risco de obesidade centralizada aumenta com a idade e é maior em mulheres do que em homens (MARTINS, MARINHO, 2003), como foi observado também neste estudo.

Diferentes indicadores têm sido utilizados em estudos populacionais para o diagnóstico da obesidade. Segundo a OMS, o índice de massa corpórea (IMC) é um indicador útil e adequado para a definição de obesidade em nível populacional. A determinação do IMC considera medidas de peso e estatura, sendo um método simples, de fácil acesso e baixo custo. No entanto, apresenta limitações, principalmente, por não identificar gordura localizada.

Os pacientes diabéticos que participaram do nosso estudo apresentaram IMC superior aos considerados normais para esta população, sendo estes dados refletidos também quando se avaliou a circunferência da

cintura. O percentual de gordura corporal avaliado pela bioimpedância elétrica também se apresentou elevado, corroborando com a caracterização deste grupo de indivíduos, como de sobrepeso e/ou de obesidade.

5.2 Consumo Alimentar

A avaliação do consumo alimentar realizada por meio da técnica de registro de alimentos tem sido uma ferramenta utilizada em diferentes estudos que envolvem a alimentação, possibilitando a identificação, a curto prazo, da variação dos alimentos consumidos pelos participantes, e em combinação com programas computadorizados e tabelas de composição de alimentos, é possível se estimar a percentagem consumida dos nutrientes.

Os resultados referentes ao valor energético total da dieta dos participantes, analisando os dois grupos estudados, demonstram que este foi inferior ao recomendado para esta população, atingindo apenas 71,1% (consumido em relação ao recomendado para esta população).

Em estudo realizado com mulheres no climatério, Montilla, Marucci e Aldrighi (2003), encontraram que apenas 46,9% dos participantes estavam com dieta adequada em relação a energia. Cervatto, *et. al.*, (1997) em estudo sobre dieta habitual da população adulta, verificaram que 60% da população consumia dieta com energia total abaixo da estimativa das necessidades.

Silva (2002), estudando mulheres idosas não institucionalizadas, verificou que a adequação de energia de todas as participantes da pesquisa, estavam abaixo do recomendado, sendo a média de ingestão calórica consumida de 1331 kcal.

Podemos referir que ocorrem possíveis limitações relacionadas com o consumo alimentar, uma vez que este método foi, quase que na sua totalidade, dependente dos participantes da pesquisa. A acurácia na estimativa da ingestão alimentar é um grande problema encontrado por pesquisadores na área de nutrição e alimentação.

Existe uma certa dificuldade dos participantes em relatar o consumo diário de alguns alimentos que possuem contribuição no valor energético total, como é o caso do óleo. Como fator contrário, a substituição de carboidratos simples por adoçantes pode ser considerado um importante componente na redução do valor energético da dieta, como foi visto por Rosado e Monteiro (2001).

De acordo com Lissner (2002), indivíduos com sobrepeso/obesidade têm uma certa tendência em subestimar as quantidade de alimentos ingeridos, com isso, apresentando valor energético e de alguns nutrientes diminuídos. O mesmo foi encontrado por Goris *et. al.*, (2000), subestimação da ingestão de energia em seus pacientes (obesos).

Neste estudo pode ter ocorrido uma subestimação do consumo de energia. Pode-se também cogitar, como fator adicional, uma crescente diminuição da quantidade consumida dos alimentos em decorrência da própria idade dos participantes, uma vez que a grande maioria destes é idosa, ou até mesmo por motivos relacionados com as doenças existentes.

A quantidade de proteína da dieta está correlacionada positivamente com a absorção de zinco, no entanto, o tipo de proteína influencia a disponibilidade deste elemento. Foi observada a presença diária, para a maioria dos participantes deste estudo, de produtos de origem animal,

principalmente de frango e leite, e menores frequências, da carne vermelha, que é uma boa fonte de zinco. A caseína apresenta efeito negativo na disponibilidade de zinco (LONNERDAL, 2000).

As massas tiveram boa contribuição no percentual total de alimentos consumidos pelos participantes. Foi verificado alto consumo de cereais (arroz), leguminosas (feijão) e café. O consumo de frutas e verduras foi referenciado com frequência, só que com pequeno porcionamento. Alimentos ricos em fibras podem ter efeito negativo na biodisponibilidade de zinco, uma vez que estes possuem quantidades significativas de fitatos; estes por sua vez, se complexam com o zinco e diminuem a sua absorção.

Ao se analisar o consumo de energia e o IMC dos participantes, pode-se avaliar que estes parâmetros não seguem a mesma tendência. O IMC representa um dado atual, e o ganho de peso dos participantes ocorreu ao longo de anos. Outro fator importante, é que a média de idade caracteriza muitos dos indivíduos como idosos, ou seja, ocorre diminuição da taxa metabólica basal.

A ingestão média de proteína alcançou os valores de normalidade (10-35%), no entanto, 47% apresentaram valores abaixo do limite inferior recomendado. O percentual de lipídio encontrado para os grupos foi de 27,4%, onde apenas 10,5% tinham valores acima de 35% (limite superior). Em relação aos carboidratos, todos os participantes analisados estavam dentro dos valores de recomendação.

A avaliação do zinco dietético por meio de tabelas de composição de alimentos não leva em consideração suas interações com outros elementos da alimentação que podem alterar sua biodisponibilidade (CESAR, WADA,

BORGES, 2005). Estes autores encontraram em seu trabalho concentrações de zinco plasmático inadequadas, apesar da ingestão dietética deste mineral estar adequada.

Utilizando-se as DRIs, 45,2% dos participantes estavam abaixo da EAR, confirmando assim, os baixos valores de zinco plasmático encontrados nestes pacientes. Uma vez que a RDA é utilizada como meta de consumo, apenas 31,7% dos participantes atingiram este valor.

Em estudo realizado com mulheres adultas, Santos, Sardinha e Colli (2005), encontraram ingestão média de zinco de 9,7mg/dia, onde 19% estavam abaixo da EAR, e 71% encontrava-se acima da RDA.

5.3 Atividade Física

A atividade física regular previne o desenvolvimento de doença coronariana arterial. Existem evidências de que atua também reduzindo a incidência de doenças crônicas não-transmissíveis, incluindo diabetes mellitus do tipo 2, hipertensão, obesidade, osteoporose, câncer de mama e cólon (THOMPSON, *et. al.*, 2003).

A atividade física é um fator importante no tratamento do Diabetes Mellitus, contribuindo para melhorar a qualidade de vida do portador da doença. O risco do diabetes do tipo 2 aumenta à medida que aumenta o IMC (índice de massa corporal), e, ao contrário, quando aumenta a intensidade e/ou a duração da atividade física, expressa em consumo calórico semanal, esse risco diminui, especialmente em pacientes com risco elevado de diabetes.

O exercício físico propicia melhores padrões comportamentais como o cuidado com a alimentação e o auto-controle por parte de diabéticos, o

que conseqüentemente contribui para melhorar sua qualidade de vida (CIOLAC e GUIMARÃES, 2004).

Geralmente, o tipo de atividade indicada é de natureza aeróbica, que envolve grandes grupos musculares e pode ser mantida por um tempo prolongado. A prática da atividade física em indivíduos com diabetes do tipo 2, juntamente com a perda de peso, é uma das indicações das mais apropriadas para corrigir a resistência à insulina e controlar a glicemia nesse tipo de diabetes, ainda mais se está associado à obesidade.

Os benefícios a médio e longo prazo, da prática regular de atividade física, contribuem para diminuir os fatores de risco para o desenvolvimento da doença cardiovascular, por meio do melhoramento no quadro do perfil lipídico e contribuição para a normalização da pressão arterial.

Neste estudo, a atividade física estava presente em mais de 50% do total dos diabéticos, nos dois grupos estudados, no entanto, este exercício pode ser considerado de leve intensidade. Dentre os mais citados, estão a caminhada e a hidroginástica.

5.4 Medicamentos

A metformina possui efeitos que atuam minimizando complicações cardiovasculares causados pelo diabetes em si, agindo assim, como um antioxidante, principalmente prevenindo a formação de espécies reativas de oxigênio e lipoperoxidação.

Seus efeitos estariam relacionados com a diminuição do estresse oxidativo, principalmente reduzindo a formação de AGEs e aumentando a

concentração de enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (PAVLOVIC *et. al.*, 2000).

Tem sido sugerido que os inibidores da ECA e as estatinas desempenham atividade antioxidante. A ECA situada na membrana plasmática das células endoteliais controla o tônus muscular e a permeabilidade pela conversão da angiotensina I em angiotensina II, e pela degradação da bradicinina. Os inibidores de ECA reduzem as concentrações de angiotensina II e a produção do ânion superóxido, além de aumentar as concentrações de bradicinina, prostaciclina e óxido nítrico (vasodilatadores), desempenhando um importante papel no estresse oxidativo vascular (BAUDIN, 2002).

Em geral, as ECA podem melhorar a disfunção endotelial em pacientes com doença coronariana, dislipidemia e hipertensão. O mecanismo de proteção específico não está claro, mas acredita-se ocorrer devido ao aumento das defesas antioxidantes endógenas (De CAVANAGH, *et. al.*, 2000).

As estatinas são fármacos que atuam na inibição da HMG-CoA redutase, uma enzima chave para a biossíntese do colesterol hepático. O uso da sinvastatina pode reduzir a produção de ânion superóxido, pela inibição da NADPH oxidase, uma importante enzima geradora de ânion superóxido (DELBOSK *et. al.*, 2002), bem como pode aumentar a atividade da paroxonase, enzima antioxidante relacionada com a HDL (THOMAS, SENTI, GARCIA-FARIA, 2000).

As estatinas também melhoram a função endotelial por aumentar a expressão do vasodilatador endotelial óxido nítrico sintetase e diminuir o

vasoconstrictor endotelina-1. Atuam diminuindo a resposta trombogênica na ruptura de placas pela inibição da ativação plaquetária (BICCARD, SEAR, FOËX, 2005).

O uso de hipoglicemiantes (metformina), inibidores de ECA (captopril, enalapril) e estatinas (sinvastatina) é muito freqüente nos indivíduos com diabetes mellitus do tipo 2, como visto neste estudo. Portanto, poderíamos sugerir que estes medicamentos utilizados pelos pacientes diabéticos estudados estariam diminuindo e/ou alterando a formação dos parâmetros avaliados neste estudo, ou seja o perfil lipídico, e principalmente os indicativos do estresse oxidativo, como a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase, óxidos de colesterol e concentrações de autoanticorpos anti-LDL eletronegativa, pelos seus efeitos na diminuição do estresse oxidativo gerado pelo diabetes.

No entanto, o objetivo de se verificar a ação do zinco nos parâmetros propostos desta pesquisa foi viabilizado, uma vez que este estudo foi realizado em dois momentos, tempo zero e após 6 meses, podendo-se assim, observar mudanças provindas do novo fator, o mineral zinco. De acordo com observações nos prontuários e relatos dos pacientes, não houve alteração na dosagem e tipos dos medicamentos ingeridos durante o período da pesquisa.

5.5 Avaliação do zinco no plasma e no eritrócito

A determinação de zinco no plasma é considerada o índice mais utilizado na avaliação do estado nutricional dos indivíduos relativo a este mineral (GIBSON, 1990). No entanto, em indivíduos deficientes, este dado

sozinho não é adequado para se caracterizar sua deficiência (O'DELL, 2000), uma vez que, este pode ser alterado por outros fatores fisiológicos que afetam sua concentração no plasma. Gibson (1990) e Cesar, Wada e Borges (2005), colocam que as concentrações de zinco no plasma podem variar por sofrer alterações causadas por diferentes fatores como alimentação, estresse, infecção, ação de hormônios.

A homeostase do zinco é primariamente mantida via sistema gastrointestinal por processos de absorção de zinco exógeno e excreção de zinco endógeno. O organismo controla esta homeostase para manter suas concentrações adequadas. Em estado de deficiência, ocorre maior absorção intestinal e redução da excreção endógena. De modo contrário, quando há elevada ingestão de zinco, ocorre diminuição da absorção e aumento da excreção (KREBS, 2000).

Alterações no estado nutricional do zinco têm sido descritas na literatura em pacientes diabéticos. Evidencia-se perdas aumentadas deste mineral pela urina ou pela diminuição na capacidade intestinal de sua absorção (KING, *et. al.*, 2000).

Roussel *et. al.* (2003), estudando os efeitos protetores da suplementação com zinco em diabéticos do tipo 2 verificou que o estado nutricional relativo ao zinco, considerando o plasma, estava diminuído em mais de 30% dos pacientes diabéticos.

Estudo realizado com mulheres pós-menopausadas e diabéticas do tipo 2, recebendo 30mg/dia de zinco, durante 3 semanas, relatou que o protocolo usado não foi suficiente para restaurar o estado normal do zinco e

causar algum efeito positivo contra a oxidação (BLOSTEIN-FUJII, *et. al.*, 1997).

A dose de zinco aminoquelato utilizada neste estudo foi de 20 mg/dia, quantidade maior do que a recomendação que é de 11 e 8 mg, para homens e mulheres, respectivamente, e abaixo do limite superior de ingestão, que é de 40 mg para ambos os sexos, durante período de 6 meses. Este protocolo foi baseado supondo-se suprir a RDA para o zinco, sem chegar a valores que poderiam trazer efeitos indesejáveis, relacionados ao metabolismo do zinco.

Estudo de suplementação com zinco (30mg sulfato de zinco), durante 3 meses, foi verificado que o zinco melhorou o controle glicêmico, uma vez que diminuiu a concentração da hemoglobina glicada em pacientes diabéticos do tipo 2 (AL-MAROOF, SHARBATTISS, 2006). No entanto, altas doses de zinco (50 mg/dia) têm sido relacionadas com aumento da hemoglobina glicada, sugerindo efeito adverso do zinco.

Ainda são escassos trabalhos envolvidos com a suplementação de zinco em diabéticos do tipo 2, sendo com isso, fator relevante na padronização de doses utilizadas. Considerando a importância deste mineral, e que pacientes com diabetes mellitus geralmente apresentam risco de deficiência de zinco, o uso de suplementos poderia melhorar aspectos relativos à saúde deste grupo populacional.

Existe um percentual elevado de diabéticos participantes deste estudo com sobrepeso e obesidade. Foi verificado por Marreiro (2002), que indivíduos obesos apresentam baixas concentrações de zinco plasmático, e mesmo após suplementação com este mineral, estes indivíduos não

apresentaram diferença significativa do tempo basal. Provavelmente a obesidade estaria alterando a distribuição normal do zinco.

Cesar, Wada e Borges (2005), estudando indivíduos com média de idade de 66 anos, sem doenças crônicas sintomáticas, IMC médio acima de 30, encontraram concentrações de zinco plasmático abaixo das referências propostas, apesar da não-correlação com a ingestão alimentar, que apresentava-se adequada para a maioria dos participantes.

No presente estudo as concentrações iniciais do zinco no plasma estavam reduzidas, em relação aos valores de referência. No período após a intervenção, houve um leve aumento das concentrações do zinco plasmático no grupo suplementado com zinco, no entanto, este aumento não teve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Entretanto, podemos constatar (tabela 8) que o percentual de indivíduos abaixo de $70 \mu\text{gZn/dL}$ baixou de 54,2 para 40,7%, aumentando a percentagem daqueles que se encontravam na faixa de normalidade.

Em estudo realizado com pacientes que tinham resistência à insulina, foi verificado que a suplementação com zinco reduziu este parâmetro, considerando o método HOMA (*homeostasis model assessment*), que é utilizado para caracterizar a resistência à insulina (MARREIRO, 2002).

O zinco eritrócitario reflete o estado nutricional deste mineral em períodos considerados mais longos do que no plasma, devido ao tempo de vida das hemácias (homeostase).

De acordo com trabalhos da literatura, que avaliam a concentração de zinco eritrocitário em pacientes diabéticos, os dados existentes mostram

que este grupo de indivíduos geralmente apresenta concentrações de zinco inferiores aos valores de referência, como os encontrados neste estudo.

A concentração de zinco eritrocitário (valores de mediana) encontrada no grupo suplementado com zinco foi de $41,4 \pm 6,2$ e $42,7 \mu\text{gZn/gHb}$, enquanto que para o placebo, $42,62 \pm 7,8$ e $42,2 \mu\text{gZn/gHb}$, nos períodos antes e após intervenção, respectivamente. Vale ressaltar que o percentual de indivíduos abaixo de $40 \mu\text{gZn/gHb}$ baixou de 44 para 29,2% (tabela 9).

Estes valores são próximos dos encontrados por Marreiro (2002) em estudo de suplementação com zinco de indivíduos obesos (30mg/dia), onde foram encontrados valores medianos pós-intervenção de 41 e $38,8 \mu\text{gZn/gHb}$, para o grupo suplementado e o placebo, respectivamente.

Santos, Sardinha e Colli (2005), também encontraram valores de zinco eritrocitário semelhante em estudo realizado com mulheres adultas, onde a concentração foi de $38,2 \mu\text{gZn/gHb}$.

Sena *et. al.* (2002) verificaram o efeito da suplementação com zinco em diabéticos do tipo 1, e constataram que o controle metabólico no diabetes mellitus predispõe a distúrbios no metabolismo do zinco independente da fonte, alimentar ou medicamentosa.

5.6 Avaliação da atividade da superóxido dismutase

Ciechanowski, *et. al.* (2005), realizaram estudo para verificar porque a SOD está diminuída em diabéticos, e constatam que isto ocorre quando há excessiva glicação, e não necessariamente síntese diminuída ou

prejudicada. A glicação diminui a atividade específica da SOD, bem como sua quantidade na parede vascular.

As concentrações de SOD diminuídas tem sido associadas com pacientes com pobre controle do diabetes (SMAOUI, *et. al.*, 2006). Outros autores, verificaram que em pacientes hiperlipidêmicos, com ou sem diabetes, a atividade das enzima antioxidantes SOD, CAT e GPx diminuíram, independente da presença ou não do diabetes, sugerindo necessidade do controle nos parâmetros lipídicos (KAVIARASAN, ARJUNAN, PUGALENDI, 2005).

Estudando pacientes diabéticos sem complicações, com retinopatia proliferativa e não proliferativa, Gupta e Charis (2005), verificaram que a lipoperoxidação se elevou com o aumento da severidade da doença, e que a SOD diminuiu com a progressão da doença.

Comparando pacientes diabéticos, controle e com complicações vasculares, a concentração de SOD foi significativamente mais baixa nos pacientes com complicações. Foi encontrada correlação significativa e positiva entre os níveis de glicose e SOD (COLAK, *et. al.*, 2005).

Indivíduos com hipercolesterolemia, tratados com estatinas, apresentaram diminuição significativa do colesterol total e melhora nos parâmetros enzimáticos da SOD, CAT e GPx (diminuição) (UNGUREANO, *et. al.*, 2003).

Os resultados no nosso estudo demonstram que houve algum fator interferente nesta avaliação, uma vez que foi apresentada diferença significativa entre o período antes e após a intervenção, seja para o grupo

suplementado com zinco, como para o placebo, podendo indicar que não houve efeito direto do zinco suplementado neste parâmetro.

5.7 Avaliação da redução do estresse oxidativo – óxidos de colesterol e autoanticorpos anti-LDL eletronegativa

A patogênese das doenças macrovasculares no diabetes tem recebido considerável atenção como consequência do aumento da incidência destas complicações nos pacientes diabéticos, incluindo doença coronariana, cerebrovascular e vascular periférica. A aterosclerose tem sido redefinida como um processo inflamatório crônico (ROSS, 1999).

O envolvimento de complexo antígeno-anticorpo formado por lipoproteínas modificadas e anticorpos correspondentes na patogênese da aterosclerose é suportado pelo fato de que estes complexos têm propriedades tanto pró-inflamatórias como aterogênicas (VIRELLA, *et. al.*, 1995; KLIMOV, *et. al.*, 1988).

Evidências sugerem que modificações oxidativas da LDL aumentam a aterogenicidade da partícula (SCHWAB, *et. al.*, 2000). Diabéticos do tipo 2 possuem uma condição de estresse oxidativo diferenciada em relação aos indivíduos sem a doença, com aumento da geração de substâncias oxidadas.

A significância clínica para a determinação de anticorpos anti-LDL modificada, está no fato de que altos níveis são indicativos de doença aterosclerótica vascular ou do risco futuro de desenvolver infarto do miocárdio.

Estudos *in vivo* demonstram que autoanticorpos para LDL modificada podem ter efeito aterogênico pelo aumento do acúmulo de lipídeos nos macrófagos dos vasos ateroscleróticos. Estes anticorpos podem ser considerados como marcadores de determinantes patogênicos da aterosclerose como aumento da oxidação lipídica, estágio pró-inflamatório e dano na vasodilatação (RADULESCU, STANCU, ANTOHE, 2004).

A modificação oxidativa da LDL é evidenciada por alterações nos componentes protéicos e lipídicos da partícula. A oxidação progressiva está associada com o aumento da eletronegatividade.

Damasceno *et. al.*, (2006), encontraram em seu estudo que a concentração de LDL eletronegativa é maior em indivíduos com hipercolesterolemia do que em normolipidêmicos.

No presente estudo, foi verificada que a suplementação com zinco, nas condições de tempo e dosagem adotados, não alterou significativamente a concentração dos autoanticorpos anti-LDL eletronegativa, apesar que o grupo suplementado com zinco apresentou menor redução na concentração da razão entre a LDL nativa e LDL eletronegativa, talvez em consequência do efeito do zinco na formação da LDL eletronegativa.

Em relação à concentração da LDL nativa, o grupo suplementado com zinco, manteve-se constante, o que não foi observado no grupo placebo, que apresentou leve diminuição, provavelmente por um possível aumento de oxidação. Porém podemos deduzir que a diminuição da LDL eletronegativa, em ambos os grupos, pode ser decorrente de outras modificações oxidativas ou não, que não são reconhecidas pelo

autoanticorpo utilizado, já que a LDL eletronegativa é mais susceptível a modificações.

Estudo de intervenção com zinco (30mg/dia) em pacientes diabéticos do tipo 2, verificou que a suplementação com zinco apresentou efeitos antioxidantes de potencial benéfico, uma vez que diminuiu significativamente a formação de TBARS, após 6 meses de intervenção, sem causar nenhuma alteração na hemoglobina glicada ou homeostase da glicose (ROUSSEL, 2003).

Reiteberg, *et. al.* (2005), verificaram em pesquisa com animais, que a deficiência de zinco pode aumentar eventos pró-inflamatórios (aumento de NF-kB e molécula de adesão-1) no receptor de LDL em ratos knockout alimentados com dieta moderadamente rica em gordura, enquanto que a suplementação de zinco, diminuiu estes efeitos, sugerindo que baixas concentrações de zinco estariam associadas com aumento do risco de doenças cardiovasculares.

Durante a conversão de LDL nativa em LDL eletronegativa, foi observado acúmulo na partícula dos óxidos de colesterol 7-ceto, β -epóxido e o 7 α OH (CHANG, ABDALLA, SEVANI, 1997).

As concentrações de óxidos de colesterol têm sido utilizadas como marcadores de estresse oxidativo no diabetes mellitus. Diversos estudos tem examinado a relação entre os níveis de COx no plasma e o estabelecimento de fatores de risco para as doenças cardiovasculares.

Em estudo realizado com pacientes com DM1, DM2 e IGT, Ferderbar (2002), verificou que o aumento do total de COx foi maior (significativo) nos grupos DM1 e DM2 do que no IGT, sugerindo que o aumento da glicemia

poderia estar favorecendo a formação de COx, mesmo utilizando fármacos que poderiam controlar a formação de espécies radicalares (DM2).

Os dados encontrados nos pacientes diabéticos deste estudo, considerando a concentração plasmática total dos COx, antes e após intervenção, mostram que não houve diferença significativa entre os dois períodos analisados, seja no grupo suplementado com zinco, como no placebo, apesar da tendência de melhoria na formação dos óxidos totais.

Analisando os dados por estratificação, podemos observar que o grupo suplementado com zinco apresentou diferença estatística significativa no que diz respeito aos diferentes óxidos de colesterol, comparando o tempo inicial com o final, quando correlacionados com outras variáveis (tabela 12).

Relacionando o período inicial e após 6 meses de suplementação com zinco, os pacientes com IMC<25 apresentaram diminuição estatisticamente significativa ($p>0,05$) no óxido de colesterol α -epóxido. O mesmo aconteceu com pacientes hipertensos, sem cardiopatia, sem uso de hipolipemiante e hipoglicemiante positivo. A redução desse óxido também ocorreu independente da prática de atividade física e da utilização do inibidor de ECA.

O óxido de colesterol 7β -OH também diminuiu no grupo suplementado com zinco, nos pacientes com uso de hipoglicemiante, praticantes de atividade física e hipertensos que fazem uso de inibidor de ECA. Obteve-se diminuição deste óxido no grupo que praticava atividade física.

No grupo placebo houve diminuição significativa entre os períodos antes e depois da intervenção para o óxido $7\alpha\text{OH}$, nos indivíduos que faziam uso de hipoglicemiante.

Verificando as variáveis analisadas, e comparando-as com o grupo suplementado com zinco, fica evidente que este grupo apresentou um maior número de redução na formação dos óxidos em questão quando comparado com o grupo placebo.

O zinco apresentou efeito sobre a diminuição de alguns óxidos de colesterol, α -epóxido, $7\beta\text{-OH}$ e $7\alpha\text{OH}$ nos diabéticos estudados, independente da utilização de alguns medicamentos que possuem efeitos na diminuição da formação de óxidos de colesterol, ou seja, do estresse oxidativo. Com isso, podemos sugerir que a ação do zinco favoreceu uma menor formação de COx , mesmo utilizando-se medicamentos que controlam a produção de espécies radicalares em pacientes com diabetes.

Comparando diabéticos do tipo 2 e intolerante à glicose, Ferdebar (2002), verificou que nos pacientes diabéticos havia maior produção dos óxidos de colesterol α -epóxido, $7\beta\text{-OH}$ e β -epóxido. Neste trabalho com a administração do suplemento de zinco, podemos verificar que dois destes óxidos foram reduzidos, o α -epóxido e o $7\beta\text{-OH}$.

Rinner, *et. al.* (2005), desenvolveram pesquisa para avaliar a formação de óxidos de colesterol em pacientes com doença coronariana arterial, e verificaram que havia maior formação (quantitativamente) dos óxidos 7-ceto, $7\beta\text{-OH}$ e o β -epóxido, independente dos níveis de LDL-c.

A diminuição da formação de óxidos de colesterol é de fundamental importância no tratamento de doenças onde o estresse oxidativo e a

peroxidação lipídica estão elevados, sendo importante na redução da progressão e/ou no desenvolvimento das complicações do diabetes, o que reflete substancialmente na diminuição do risco de doenças cardiovasculares.

Os resultados deste trabalho são pioneiros e de relevância, uma vez que não existem dados na literatura que abordem a questão do zinco na redução da formação de óxidos de colesterol.

Portanto, nosso trabalho sugere que o zinco influencia positivamente a melhora do estresse oxidativo gerado em doenças crônicas não transmissíveis, como é o caso do diabetes. Com estes resultados, criam-se possibilidades de utilização do zinco como um fator coadjuvante no tratamento do diabetes. Contudo, mais estudos devem ser realizados para se definir a dose eficaz e o tempo de uso, ajustados à população-alvo.

6.0 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- ✓ A suplementação com zinco incrementou a concentração deste elemento no plasma e eritrócito dos diabéticos, apesar da não significância estatística.
- ✓ A suplementação com zinco diminuiu a quantidade de alguns óxidos de colesterol.
- ✓ Dentre os parâmetros avaliados neste estudo, o suplemento de zinco, nesta dosagem e tempo, apresenta tendência a melhorar as variáveis indicativas do estresse oxidativo estudadas.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-MARROF, A., AL-SHARBATT, S.S. Serum zinc levels in diabetic patients and effect of zinc supplementation on glycemic control of type 2 diabetics. **Saud Med J.** v.27, n.3, p.344-50, 2006.
- AVOGARO, P. BOM, G.B. CAZZOLATO, G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. **Arteriosclerosis.** v.8, nº1, p.79-85, 1988.
- BEATTIE, J.H., KWUN, I. Is zinc deficiency a risk factor for atherosclerosis? **Brit J Nutr.** v.91, p.177-81, 2004.
- BICCARD, B.M., SEAR, J.W., FOËX, P. Statin therapy: a potentially useful peri-operative intervention in patients with cardiovascular disease. **Anaesthesia.** v.60, p.1106-1114, 2005.
- BJORKHEM, I. Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids. **J Lipid Res.** v.33, p.455-471, 1992.
- BJÖRNTORP, P. Body fat distribution, insuline resistance, and metabolic diseases. **Nutrition.** v. 13, p. 795-803, 1997.
- BLOSTEIN-FUJII, A. DiSILVESTRO, R. A., FRID, D., KATZ, C., MALARKEY, W. Short-term zinc supplementation in women with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effects on plasma 5'-nucleotidase activities, insulin-like growth factor I concentrations, and lipoprotein oxidation rates in vitro. **Am J Clin Nutr.** v.42, p.639-42, 1997.
- BRAY, G.A. BETTER, W.J. The physiological role of zinc as an antioxidant. **Free Rad Biol Med.** v.8, p.281-291, 1990.
- CERVATO, A.M., MAZZILLI, R.N., MARTINS, I.S., MARUCCI, M.F.N. Dieta habitual e fatores de risco para doenças cardiovasculares. **Rev Saude Pub.** v.31, p.227-35, 1997.
- CESAR, T.B., WADA, S.R., BORGES, R.G. Zinco plasmático e estado nutricional em idosos. **Rev Nutr.** v.18, p.357-365, 2005.
- CHANG, Y.H., ABDALLA, D.S., SEVANIAN, A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. **Free Rad Biol Med.** v.23, n.2, p.202-14, 1997.
- CIECHANOWSKI, P., LUDMAM, E., BUSH, T., RUSSO, J. Impaired synthesis is not the reason for decreased activity of extracellular superoxide dismutase in patients with diabetes. **Arch Med Res.** v.36, p.148-153, 2004.
- CIOLAC, E.G, GUIMARÃES, G.V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Rev Bras Med Esporte.** v. 10, p. 319-324, 2004.

DELBOSC, S., MORENA, M., DJOUAD, F., LEDOUCEN, C., DESCOMPS, B., CRISTOL, J. P. Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, are able to reduce superoxide anion production by NADPH oxidase in THP-1-derived monocytes. **J Cardiovasc Pharmacol.** v.40 p.611-617, 2002.

DIANE, W.M., LIN, C.Y. Cellular biochemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation *in vivo*. **J Nutr Biochem.**v.7 p. 495-506, 1996.

DiSILVESTRO, R.A., BLOSTEIN-FUJII, A. Moderate zinc deficiency in rats enhances lipoprotein oxidation *in vitro*. **Free Rad Biol Med.** v.22, n.4, p.739-42, 1997.

FRANCESCHINI, G. Epidemiologic evidence for high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor for coronary artery disease. **Am J Cardiol.** v.88, p.9N-13N, 2001.

GIBSON, R.S. Assessment of trace-element status. In: GIBSON, R.S. **Principles of nutritional assessment**. New York: Oxford University Press, 1990. cap.24, p.511-576.

GORIS, A.H.C., PLANTENGA, M.S.W., WESTERTERP, K.R. Undereating and underrecording of habitual food intake in obese men. **Am J Clin Nutr.** v.71, p.130-34, 2000.

GUTHRIE, H.A., PICCIANO, M.F. Micronutrient Minerals. In: GUTHRIE, H.A., PICCIANO, M.F. **Human nutrition**. New York. Mosby, 1994.p.351-357.

HENNIG, B. TOBOREK, M. McCLAIN, C.J. Antiatherogenic properties of zinc: implications in endothelial cell metabolism. **Nutrition.** v.12, p.711-7, 1996.

HODIS, H.N., CRAWFORD, D.W., SEVANIAN, A. Cholesterol feeding increases plasma and aortic tissue cholesterol oxide levels in parallel: further evidence for the role of cholesterol oxidation in atherosclerosis. **Atherosclerosis.** v.89, p.117, 1991.

HODIS, H. N. *et al.* Biochemical and cytotoxic characteristics of an *in vivo* circulating oxidized low density lipoprotein (LDL). **J Lipid Res.** v.35, p.669-677, 1994.

IYENGAR, V., WOLTTIEZ, J. Trace elements in human clinical specimens: evaluation of literature data to identify reference values. **Clin. Chem.** v.34, n.5, p.474-481, 1988.

JUN-JUN, W., XIAO-ZHUAN, L., YI-YI, Z., LU-YAN, L. Correlation between susceptibility of LDL subfractions to *in vitro* oxidation and *in vivo* oxidized LDL. **Clin Biochem.** v.33, p.71-73, 2000.

KING, J.C., SHAMES, D.M., WOODHOUSE, L.R. Zinc homeostasis in humans. **J Nutr.** v.130, p.1360s-1366s, 2000.

KLIMOV, A.N., DENISENKO, A.D., VINOGRADOVI, A.G., NAGORNEV, V.A., PIVOVAROVA, Y.I., SITNIKOVA, O.D., PLESKOV, V.M. Accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with human lipoprotein-antibody autoimmune complex. **Atherosclerosis.** v.74, p.41-46, 1988.

LEVINE, A. S., McCLAIN, C.J., HANDWERGER, B.S., BROWN, D.M., MORLEY, J.E. Tissue zinc status of genetically diabetic and streptozotocin-induced diabetic mice. **Am J Clin Nutr.** Bethesda, v.37, n.3, p.382-386, 1983.

LISSNER, L. Measuring food intake in studies of obesity. **Public Health Nutr.** v. 5, p.889-92, 2002.

LOFGREN, I., HERRON, K., ZERN, T., WEST, K., PATALAY, M., SHACHTER, N.S., KOO, S.I., FERNANDEZ, M.L. Waist circumference is a better predictor than body mass index of coronary heart disease risk in overweight premenopausal women. v.134, n.5, p.1071-6, 2004.

LONNERDAL, B. Dietary factors influencing zinc absorption. **J Nutr.** v.130, p.1378-1383, 2000.

MARTINS, I.S., MARINHO, S.P. O potencial diagnóstico dos indicadores da obesidade centralizada. **Rev. Saúde Pub.** v.37, n.6, p.760-7, 2003.

MATÉS, J.M, PÉREZ-GÓMEZ, C., CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem.** v.32, n.8, p.595-603, 1999.

MARREIRO, D.N. Efeito da suplementação com zinco na resistência à insulina em mulheres obesas.[tese de doutorado]. São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2002.

McCALL, K.A. HUANG, C. FIERKE, C.A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **J. Nutr.** 130(supl), p.1437s-1446s, 2000.

McCLUNG, J.P, BOBILYA, J. The influence of zinc status on the kinetics of zinc uptake into cultured endothelial cells. **J Nutr Biochem.** v.10, p.484-489, 1999.

MENDEZ, G.F., COWIE, M.R. The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature. **Inter J Cardiol.** v.80, p.213-219, 2001.

MEZZETTI, A. PIERDOMENICO, S.D., CONSTANTINI, F., ROMANO, F., De CESARE, D., CUCCURULLO, F., IMBASTARO, T., RIARIO-SFORZA, G., DiGIACOMO, F., ZULIANI, G., FELLIN, R. Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. **Free Rad Med.** v.25, n.6, p. 676-681, 1998.

MIRANDA, E.R., DEY, C.S. Effect of chromium and zinc on insulin signaling in skeletal muscle cells. **Biol Trace Elem. Res.** v.101, p.19-36, 2004.

MOCCHEGIANI, E., MUZZIOLI, M., GIACCONI, R. Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. **TIPS.** v. 21, p.205-208, 2000.

MONTILLA, R.N.G., MARUCCI, M.F.N., ALDRIGHI, J.M. Avaliação do estado nutricional e do consumo alimentar de mulheres no climatério. **Rev Assoc Med Bras.** v.49, p.91-95, 2003.

MORRISSEY, P.A., O'BRIEN, N.M. Dietary antioxidants in health and disease. **Int Dairy Journal.** v.8, p.463-472, 1998.

O'DELL, B. L. Role of zinc in plasma membrane function. **J Nutr.** v.130(supl), p.1432s-1436s, 2000.

PARKS, E. J., DAVIS, P. A., FRANKEL, E. Reduced oxidative susceptibility of LDL from patients participating in an intensive atherosclerosis treatment program. **Am J Clin Nutr.** v. 68, p. 778-85, 1998.

PARASASSI, T., BITTOLO-BON, G., BRUNELLI, R., CAZZOLATO, G. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL-. **Free Rad Biol Med.** v.31, p.82-89, 2001.

PAVLOVIC, D., KOCIC, R., KOCIC, G., JEVTOVIC, T., RADENKOVIC, S., MIKIC, D., STOJANOVIC, M., DJORDJEVIC, P.B. Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity Metab.** v.2, p.251-256, 2000.

PEDROSA, L.F.C; COZZOLINO, S.M.F. Alterações metabólicas e funcionais do zinco em diabetes mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.42, p.422-30, 1998.

PIE, J.E. ,SPAHS, K. SEILLAN, C. Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: Identification and quantification of cholesterol oxides. **J. Agric. Food Chem.** v.38, p.973, 1990.

RADULESCU, L., STANCU, C., ANTOHE, F. Antibodies against human oxidized low-density lipoprotein (LDL) as markers for human plasma modified lipoproteins. **Med Sci Monit.** v.10, p.207-214, 2004.

REITEBER, G., MACDONALD, R., BROWNING, J.D., MORROW,J., MATVEE, S.V., DAUGHERTY, A., SMART, E., TOBOREK, M., HENNIG,B. Zinc deficiency increase plasma lipids and atherosclerotic markers in LDL-receptor-deficient mice. **J Nutr.** v.135, n.9, p.2114-8, 2005.

RINK, L. KIRCHNER, H. Zinc-altered immune function and cytokine production. **J Nutr.** v.130(supl), p.1407s-1411s, 2000.

RINNER, A., AL-MAKDESSIS, S., SWEIDAN, H., WISCHUSEN, J., RABENSTEIN, B., SHAKAT, K., MAYER, P., SPYRIDOPOULOS, I. Relevance and mechanism of oxysterols stereospecificity in coronary artery disease. **Free Rad Biol Med.** v.30, n.4, p.535-44, 2005.

RODRIGUEZ, M.P., NARIZANO, A., DEMCZYLO, V., CID, A. A simple method for the determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. **At. Spectrosc.** v.10, n.2, p.68-70, 1989.

ROSADO, E.L., MONTEIRO, J.B.R. Obesidade e a substituição de macronutrientes na dieta. **Rev Nutr.** v.14, p.145-152, 2001.

ROUSSEL, A.M. KERKENI, A., ZOUARI, N., MAHJOUB, S., ANDERSON, R.A. Antioxidant effects of zinc supplementation in Tunisians with type 2 diabetes mellitus. **J Am Coll Nutr.** v.22, p.316-21, 2003.

SALGUEIRO, M.J., BOCCIO, J.R. Zinc as essential micronutrient: a review. **Nutrition Research.** v.20, n.5, p.737-755, 2000.

SANTOS, H.G., SARDINHA, F.A.A., COLLI, C. Zinco eritrocitário (validação de um método de análise) e zinco dietético na avaliação do estado nutricional de mulheres adultas. **Rev Bras Cienc Farmac.** v.41, p.205-213, 2005.

SCHWAB, U.S., VOGEL, S., LI, Z., LAMMI-KEEFE, C.J., GOLDIN, B.R., ORDOVAS, J.M., SCHAEFER, E.J., LICHTENSTEIN, A.H. Dietary cholesterol increases the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification. **Atherosclerosis.** v. 149, p.83-90, 2000.

SCOTT, J.A., KING, G.L. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. **Ann N.Y Acad Sci.** v.1031, p.204-13, 2004.

SENA, K.C.M., PEDROSA, L.F.C. Efeitos da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes. **Rev Nutr.** v.18, n.2, p.251-259, 2005.

SEVANIAN, A. BITTOLO-BON, G., CAZZOLATO, G., HODIS, H., HWANG, J., ZAMBURLINI, A., MAIORINO, M., URSINI, F. LDL⁻ is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. **J Lipid Res.** v.38, p.419-428, 1997.

SEVANIAN, A. ASATRYAN, L. ZIOUZENKOVA, O. Low density lipoprotein (LDL) modification: Basic concepts and relationship to atherosclerosis. **Blood Purif.** v. 17, p.66-78, 1999.

SILVA, V.L. Avaliação do estado nutricional relativo ao selênio em mulheres idosas não institucionalizadas. 77p. [tese de mestrado] São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2002.

SLOOP, G.D. A critical analysis of the role of cholesterol in atherogenesis. **Atherosc.** v.142, p.265-268, 1999.

SONG, Y., WANG, J., LI, X., CAI, L. Zinc and the diabetic heart. **Biometals.** v.18, n.4, p.325-332, 2005.

STOCKER, R., KEANEY, J.F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev.** v.84, p.1381-1478, 2004.

THOMAS, M., SENTI, M., GARCIA-FARIA, F. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.20, p.2113-2119, 2000.

THOMPSON, P.D. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. **Circulation.** v.107, p.3109-3116, 2003.

TRIBBLE, D.L., FRANK, E. Dietary antioxidants, cancer, and atherosclerotic heart disease. **W. J. M.** v.17, n.6, p.605-612, 1994.

VAN ASSENDELFT, O.W. The measurement of hemoglobin. In: IZAK, G., LEWIS, SM. eds. **Modern concepts in hematology.** New York: Academic Press, 1972. p.14-25.

VIGGIANO, C.E. Estudo sobre a prevalência da síndrome plurimetabólica em população da área metropolitana de São Paulo. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2001.

VIRELLA, G. Activation of human monocyte-derived macrophages by immune complexes containing low-density lipoprotein. **Clin Immunol Immunopathol.** v.75, p.2533-2538, 1995.

VIRELLA, G., THORPE, S.R., ALDERSON, N.L., STEPHAN, E.M., ATCHLEY, D., WAGNER, F., LOPES-VIRELLA, M.F.L. Autoimmune response to advanced glycosylation end-products of human LDL. **J Lipid Res.** v.44, p. 487-93, 2003.

YANO, M., INOUE, M., MAEHATA, E., SHIBA, T., YAMAKADO, M., HIRABAYASHI, Y., TANIYAMA, M., SUZUKI, S. Increased electronegative charge of serum low-density lipoprotein in patients with diabetes mellitus. **Clin Chim Acta.** v.340, p.93-98, 2004.

WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Technical Report Series 797. Geneva, 1981.

Anexos 1 e 2

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

APROVADO PELA CONEP/MS EM 30/04/97-REF: CNS/CARTA 32 DOC.

Rua Dr. Cesário Mota Júnior, 112 Santa Cecília CEP 01277900 São Paulo –SP

PABX (11) 32240122 Ramal: 5502 – Fax- Ramal: 5710 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 1 de julho de 2004.

Projeto nº 055/04

Informe este número para identificar
seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr.(a).

Dr.(a).Osmar Monte

Departamento de Ciências Fisiológicas

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, reunido no dia **31/03/2004** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa **“Efeitos da suplementação com zinco na redução do estresse oxidativo em indivíduos com diabetes mellitus não insulino-dependente”**, emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

- ☒ **Aprovado inclusive o TCLE ;**
- ☐ **Com pendência** modificações ou informação relevante a serem atendidas em 60 dias (enviar as alterações em duas cópias)
- ☐ **Retirado**, por não ser reapresentado no prazo determinado;
- ☐ **Não aprovado: e**
- ☐ **Aprovado** inclusive o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

Prof. Dr. Daniel R. Muñoz
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
ISCMSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 113/2004

São Paulo, 09 de novembro de 2004.

Ilmo(a). Sr(a).
Vanuska Lima da Silva

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 08 de novembro p.p., **APROVOU** o projeto "Efeitos da suplementação com zinco na redução do estresse oxidativo em indivíduos com diabetes mellitus não insulino-dependente" (Protocolo nº 175) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Drª. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP,

Orientador: Prof. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
FBA

Anexo 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, aceito participar da pesquisa intitulada "Efeitos da suplementação com zinco na redução do estresse oxidativo em indivíduos com diabetes mellitus não insulino-dependente.

A pesquisa constará de 50 pessoas com diabetes mellitus não insulino-dependente (tipo 2). Será feita uma seleção prévia, sendo adotados como fatores de inclusão ter a hemoglobina glicada entre 7-12%, ser diabético do tipo 2, ter idade máxima de 80 anos e capacidade de seguir o protocolo. Como fatores de exclusão estão os diabéticos do tipo 1 ou aqueles que estejam tomando suplementos que possam interferir nos resultados. O estudo dará ênfase a analisar a carga lipídica, triglicérides e colesterol, sendo determinado ainda a fração LDL⁻, que tem sido ultimamente correlacionada com o aparecimento de doenças cardiovasculares. Os participantes receberão todas as orientações necessárias para a realização da pesquisa.

Procedimentos que serão utilizados e propósitos: Depois de você ter dado o consentimento informado por escrito para participar desse estudo e depois de você ter sido avaliado, para satisfazer todos os critérios de admissão estabelecidos no protocolo desse estudo, você poderá começar a receber as cápsulas de Zinco aminoquelado como parte do tratamento de sua doença. Você terá de ir ao médico quatro vezes, no total (quatro consultas), incluindo a consulta de triagem. Caso haja necessidade, serão acrescidas consultas adicionais.

Após sua admissão, você passará por uma avaliação inicial, antropométrica que constará da verificação das medidas da cintura, peso, estatura e impedância bioelétrica (técnica simples, rápida e segura, realizada conectando-se eletrodos nas mãos e pés, para se obter a composição corpórea quanto à porcentagem de água, gordura e massa magra), e será realizada uma coleta de sangue (30 mL) para que sejam feitos todos os parâmetros do estudo no início da pesquisa: glicemia de jejum, triglicérides, colesterol total e frações (inclusive a LDL⁻), óxidos de colesterol, enzima superóxido dismutase e zinco. Serão distribuídas cápsulas de zinco aminoquelado para o todo o período da pesquisa, ou seja, 6 meses. Durante este período o pesquisador entrará em contato com você para saber como está o andamento da pesquisa. Após este período, você terá que voltar ao hospital para que seja a avaliação final, depois da suplementação, sendo examinados os mesmo parâmetros avaliados inicialmente. Durante o período da pesquisa, será solicitado que em três momentos você preencha um questionário de consumo alimentar, ou seja, registre nos formulários previamente distribuídos todos alimentos ingeridos durante 3 dias, totalizando 9 dias de registro de alimentos. Na consulta de triagem, você receberá explicações sobre todos os procedimentos e será solicitado que você assine o formulário de consentimento informado, se você quiser participar do estudo. Será realizada uma entrevista com perguntas sobre sua história clínica, sinais e sintomas antes do tratamento e medicamentos concomitantes que você estiver tomando.

O tratamento em estudo que você receberá, é o Zinco aminoquelado. A quantidade diária utilizada, 20 mg Zn, está dentro dos limites estabelecidos pelo NRC (National Research Council–USA). É importante que você tome as cápsulas diariamente. Se você se esquecer de tomar uma ou se você decidir parar de tomar as cápsulas de Zinco do estudo, é importante que você relate isso para os responsáveis do seu estudo.

Desconfortos e riscos esperados: A dosagem de Zinco que será oferecida nesta pesquisa não oferece nenhum risco para os participantes. Em estudos anteriores não foi relatado qualquer desconforto ou efeito colateral sob condições semelhantes às propostas neste estudo. Como serão coletadas algumas amostras de sangue como parte dos procedimentos do estudo, você pode sentir alguma dor no local da punção e/ou tontura.

Benefícios que poderão ser obtidos: Melhorar o estado nutricional relativo ao Zinco nos participantes, ou seja, nos pacientes com diabetes mellitus não insulino-dependente, uma vez que geralmente estes apresentam níveis deste mineral abaixo daqueles propostos como normais. Os benefícios que você pode obter com a suplementação com o Zinco aminoquelado são uma melhora nas características indicativas do estresse oxidativo no organismo, devido ao seu papel antioxidante. O zinco possui características que indicam possível propriedade anti-aterogênica.

Garantias dos participantes da pesquisa

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Cada participante tem a liberdade de abandonar a pesquisa em qualquer momento que ache conveniente, sem que haja qualquer dano para o mesmo.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
Será confidencial a identidade de cada participante. Os resultados serão fornecidos exclusivamente para o respectivo participante, sendo apenas destinados a discussões e publicações científicas
4. Da indenização por parte do Patrocinador por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.
A pesquisa não oferece nenhum risco significativo ao participante.

Informações sobre os responsáveis da pesquisa

Dr. Osmar Monte – Ambulatório de Endocrinologia/ Santa Casa de Misericórdia end. Rua Dr. Cesário Mota Jr., nº 112 Santa Cecília SP Tel: 3226-7276.

Dr. João Eduardo N. Salles - Ambulatório de Endocrinologia/ Santa Casa de Misericórdia end. Rua Dr. Cesário Mota Jr., nº 112 Santa Cecília SP Tel: 3226-7276.

Dra. Vanuska Lima Silva – Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP end. Av. Lineu Prestes, 580 Bl. 14 Cid. Universitária SP Tel: 3091-3625 / 8208-1105.

Dra. Silvia M. Franciscato Cozzolino - Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP end. Av. Lineu Prestes, 580 Bl. 14 Cid. Universitária SP Tel: 3091-3625.

Dra. Dulcineia S. P. Abdalla - Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP end. Av. Lineu Prestes, 580 Bl. 14 Cid. Universitária SP Tel: 3091-3625.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Anexo 4

REGISTRO ALIMENTAR

NOME: _____

DATA: ____ / ____ / ____ DIA DA SEMANA ____

REFEIÇÃO	ALIMENTOS	MEDIDAS CASEIRAS	MEDIDA EM GRAMAS

Especificar o tipo do alimento, por exemplo, se desnatado / integral, se é um alimento frito / cozido. Para preparações, colocar todos os ingredientes contidos na receita.

Anexo 5

PERFIL DO PARTICIPANTE

Ficha de caracterização

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

D. N ____/____/____ Idade: _____ Natural de: _____

Estado civil: _____

Peso (kg): _____ Estatura(cm): _____ IMC: _____

BIA: _____

Cintura: _____

Pratica alguma atividade Física? Qual? _____

Freqüência/semana: _____

Faz uso de Bebida Alcoólica? _____ Fuma? _____

Doenças atuais _____

Medicamentos (Tipo, Quantidade e freqüência):

Data da Entrevista: ____/____/____

Anexo 6
Relação dos participantes da pesquisa

Participantes	Idade (anos)	Peso (kg)	Estatura (m)	Sexo	Tratamento
01	70	62,9	1,52	F	2
02	58	77,2	1,51	F	2
03	50	39,2	1,5	F	2
04	54	94,8	1,56	F	2
05	51	80,5	1,58	F	1
06	51	158	1,8	M	1
07	57	88,2	1,68	F	1
08	67	63,2	1,53	F	1
09	40	77,5	1,76	M	1
10	60	83,2	1,74	M	2
11	57	64	1,57	F	1
12	59	85,3	1,63	F	1
13	63	97,4	1,61	F	1
14	71	81,7	1,56	F	2
15	66	67	1,56	F	2
16	51	54,8	1,51	F	1
17	57	74,9	1,58	F	1
18	56	70,4	1,57	F	2
19	59	75	1,52	F	2
20	76	44,3	1,45	F	2
21	54	79,6	1,58	F	1
22	63	74,6	1,68	M	1
23	71	113,8	1,66	M	2
24	66	61,7	1,41	F	2
25	65	63,2	1,36	F	1
26	64	62,6	1,54	F	1
27	50	104,2	1,59	F	1
28	72	65,3	1,63	M	1

29	54	71	1,63	M	1
30	64	77	1,65	F	2
31	54	76,1	1,61	F	2
32	52	68,6	1,55	F	1
33	51	80,6	1,59	F	1
34	78	55,7	1,55	M	2
35	43	84,2	1,58	F	2
36	38	90,2	1,58	F	2
37	47	111,9	1,76	M	1
38	60	114,3	1,61	M	2
39	47	74,9	1,68	M	2
40	58	62,8	1,52	F	1
41	76	65,8	1,74	M	2
42	72	76	1,74	M	2
43	69	62,8	1,67	M	2
44	70	66,6	1,51	F	1
45	48	80	1,61	F	1
46	64	68,4	1,45	F	1
47	43	68	1,64	F	2
48	58	80,4	1,58	F	2
49	74	64,3	1,47	F	2
50	56	63,3	1,5	F	1
51	48	103,1	1,83	F	1

Tratamento 1: zinco e o 2: placebo