

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Medicina de Lisboa



# **Hábitos alimentares, hiperhomocisteinémia e doença cardiovascular na diabetes do tipo 2**

Ana Margarida Saraiva Valente

*Doutoramento em  
Ciências e Tecnologias da Saúde  
Nutrição*

2013



Universidade de Lisboa  
Faculdade de Medicina de Lisboa



# Hábitos alimentares, hiperhomocisteinémia e doença cardiovascular na diabetes do tipo 2

Ana Margarida Saraiva Valente

Orientador: Doutora Helena Soares Costa

Co-Orientador: Professor Doutor Manuel Diamantino Pires Bicho

*Doutoramento em*

*Ciências e Tecnologias da Saúde*

*Nutrição*

*Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.*



**A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 17 de Dezembro de 2013.**



*A presente tese não foi escrita ao abrigo do novo Acordo Ortográfico*



### ***Dedicatória***

*Dedico esta tese a toda a minha família,  
em especial à memória do meu querido pai,  
Joaquim Martins Valente (1952-2011),  
que sempre me incentivou e acreditou na  
concretização do meu Doutorado*



## FINANCIAMENTO

O presente trabalho de investigação foi financiado por uma bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/16166/2004/5E4M) e por uma bolsa de investigação (BI) concedida no âmbito do projecto de investigação clínica intitulado “Hábitos alimentares, hiperhomocisteinémia e doença cardiovascular em diabéticos tipo 2”, com a referência PIC/IC/82957/2007, ambas financiadas pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT). A realização deste trabalho de investigação beneficiou ainda do apoio financeiro concedido pelo Prémio Fomento N°106/INSA, pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. e pelo projecto PIC/IC/82957/2007 financiado pela FCT.





## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho de tese de doutoramento envolveu um grande conjunto de apoios humanos e materiais, concedidos por várias pessoas, que foram fundamentais para a sua execução. Embora se trate de um trabalho individual, gostaria de expressar o meu reconhecimento e agradecimento a todos aqueles que me ajudaram ao longo deste trabalho.

À Doutora Helena Soares Costa, Investigadora Principal e Responsável pela Unidade de Investigação & Desenvolvimento do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. por ter aceite orientar o meu trabalho de Doutoramento, por ter compartilhado comigo a sua experiência e competência científicas, por tudo o que me ensinou ao longo destes anos, pela dedicação, amizade e compreensão demonstrados, por me ajudar a ultrapassar todas as dificuldades e problemas no âmbito deste trabalho, nomeadamente a complexidade associada ao recrutamento e colheita de dados nos participantes do estudo, bem como, a disponibilidade limitada para a utilização de equipamentos de HPLC. A sua perseverança tornou possível a utilização de um equipamento de UPLC® da *Waters* dedicado exclusivamente à realização deste trabalho de investigação. Em termos pessoais posso dizer que foi um enorme privilégio poder trabalhar diariamente e ao longo destes anos com uma pessoa extremamente inteligente, proactiva, exigente, com quem adorei trabalhar e a quem estou eternamente grata.

Ao Professor Doutor Manuel Diamantino Bicho, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e Director do Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, por ter aceite orientar o meu trabalho de Doutoramento após a saída do Professor Doutor Pedro Marques Vidal da Faculdade de Medicina de Lisboa, por ter disponibilizado alguns recursos materiais para a realização do trabalho experimental e pelo apoio, disponibilidade e dedicação demonstrados. Agradeço ainda, tudo o que me ensinou e em especial na área da nutrigénómica.

À Dra. Antónia Calhau, Coordenadora do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. por me ter aceite como Doutoranda no Departamento, por ter disponibilizado alguns dos recursos materiais para a realização do trabalho experimental e pela preocupação e carinho demonstrados.

Ao Professor Doutor Pedro Marques Vidal, que actualmente desempenha funções de *Chef of Clinique Adjoint* do *Institut Universitaire de Médecine Sociale et Préventive da Université de Lausanne*, mas enquanto Professor da Faculdade de Medicina de Lisboa aceitou ser meu orientador. No desempenho dessa função colaborou intensivamente no projecto de candidatura a Doutoramento na Faculdade de Medicina e no desenvolvimento inicial do trabalho de doutoramento, partilhou comigo o seu conhecimento e experiência científica em estudos de epidemiologia nutricional e em bioestatística.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo apoio financeiro concedido através da atribuição de uma bolsa de Doutoramento com a referência SFRH/BD/16166/2004/5E4M e pela bolsa de investigação (BI) atribuída no âmbito do projecto de investigação clínica intitulado “Hábitos alimentares, hiperhomocisteinémia e doença cardiovascular em diabéticos tipo 2”, com a referência PIC/IC/82957/2007.

## *Agradecimentos*

Ao Doutor João Filipe Raposo, Director Clínico da Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal, por autorizar este trabalho de investigação, disponibilizando o espaço e as condições necessárias para o recrutamento e colheita de dados de todos os participantes diabéticos do tipo 2 que recorreram aos cuidados de saúde disponíveis na Associação durante o período do estudo.

Ao Dr. Rui Duarte, médico diabetologista da Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal e Vice-Presidente da Sociedade Portuguesa de Diabetologia, pelo apoio clínico, coordenação do trabalho de campo realizado na Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal e colaboração na divulgação científica dos resultados deste trabalho de investigação.

À Dra. Lígia Nascimento, Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública, pela colheita, separação e armazenamento de amostras de sangue de 150 participantes não diabéticos (grupo III) recrutados na Universidade Internacional para a Terceira Idade, pela codificação de dados gerais, pela introdução de dados bioquímicos, antropométricos e gerais na base de dados previamente criada para o projecto e pela introdução de dados alimentares de todos os participantes do grupo III em suporte informático. Agradeço ainda a amizade, boa disposição, simpatia, espírito crítico e qualidade com que executou todas as tarefas que lhe foram solicitadas.

À Dra. Maria da Conceição Gonçalves, Técnica Principal da carreira de Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, pela colheita, separação e armazenamento de amostras de sangue de 150 participantes diabéticos do tipo 2 (grupos I e II) recrutados na Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal e pela realização das análises para a identificação dos polimorfismos genéticos da haptoglobina nas respectivas amostras.

À Mestre Joana Paixão, pela realização das análises para a identificação do polimorfismo genético C677T da enzima MTHFR C nas amostras de sangue dos diabéticos do tipo 2.

À memória da Professora Doutora Cláudia Marinho, do Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, pela coordenação das análises de identificação dos polimorfismos genéticos da haptoglobina e do polimorfismo genético C677T da enzima MTHFR em diabéticos do tipo 2 recrutados na Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal.

Ao Dr. Rui Matias Técnico de Análises Clínicas e Saúde Pública, do Departamento Promoção da Saúde e Doenças Crónicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. pelo doseamento de vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico utilizando o método de electroquimioluminescência nas amostras de soro de todos os participantes diabéticos e não diabéticos.

À Dra. Raquel Carvalho, Enfermeira da Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal, por todo o apoio clínico e logístico durante a realização do trabalho de campo, bem como, pelo recrutamento de diabéticos.

À Cláudia Morais, Administrativa da Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal, pelo apoio logístico durante a realização do trabalho de campo e pelo recrutamento de diabéticos.

Ao Senhor Reitor José Miranda, da Universidade Internacional para a Terceira Idade por autorizar a realização deste trabalho de investigação na Universidade e por amavelmente

conceder um espaço habitualmente destinado às aulas para a realização das avaliações nutricionais de todos os participantes no estudo.

Ao Cesar e à Arlete da Universidade Internacional para a Terceira Idade, pelo apoio logístico durante a realização do trabalho de campo, pela divulgação do estudo na Universidade e pelo apoio no recrutamento dos participantes não diabéticos.

À Professora Doutora Maria do Rosário Bronze da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pelo apoio concedido na validação dos métodos analíticos de HPLC, pela simpatia e disponibilidade que sempre teve para esclarecer as minhas dúvidas no âmbito da validação de métodos cromatográficos.

À Engenheira Ana Paula Sequeira, Gestora da empresa Via Athena, pelo apoio técnico prestado durante a implementação e optimização dos métodos de HPLC utilizados na análise dos compostos bioquímicos no sangue dos participantes, pela motivação, amizade e pelo tempo que me dedicou todos estes anos. Agradeço ainda a todas as pessoas da Via Athena pelo apoio técnico que me foi concedido, pela simpatia e disponibilidade para me ajudarem a resolver algumas situações complicadas que tive de ultrapassar durante a realização deste projecto de investigação.

Ao Engenheiro Rafael Chust, Gestor da empresa Tecnocroma, pelo apoio técnico prestado durante a implementação e optimização dos métodos de HPLC utilizados na análise dos compostos bioquímicos no sangue dos participantes, especialmente no que se refere às características de enchimento de diversas colunas cromatográficas. Agradeço ainda o patrocínio concedido para participar no 6º Encontro Nacional de Cromatografia que se realizou em Dezembro de 2009 no Funchal.

À Professora Doutora Carla Lopes da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, por ter autorizado a utilização do questionário de frequência do consumo alimentar que previamente validou para a população Portuguesa e pela conversão em nutrientes a partir dos dados de 300 questionários aplicados à população avaliada.

Ao Doutor Baltazar Nunes do Departamento de Epidemiologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge I.P., pelos ensinamentos, orientações e apoio na análise estatística.

Ao Professor Doutor José Amorim Cruz do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, pelo apoio na candidatura do projecto de Doutoramento à Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e pelo incentivo na fase inicial do trabalho de investigação.

À Mestre Inês Tavares, pela introdução de dados antropométricos dos diabéticos do tipo 2 na base de dados previamente criada para o projecto e pela introdução de dados alimentares dos diabéticos do tipo 2 em suporte informático.

À Mestre Tânia Albuquerque, Bolseira de Investigação do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. pela colaboração técnico-científica, incentivo e amizade.

À Doutora Ana Teresa Silva, Investigadora Auxiliar do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. pela colaboração técnico-científica, incentivo e amizade.

## *Agradecimentos*

A todos os participantes do estudo de investigação recrutados na Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal e da Universidade Internacional para a Terceira Idade, pela colaboração, interesse, simpatia e carinho com que sempre me trataram.

Ao meu marido Ricardo Diogo, pelo amor, incentivo e tolerância durante os anos que me dediquei de forma intensiva a este trabalho. Um muito obrigado.

À minha mãe, avó e à memória do meu pai e do meu avô, pelo apoio e motivação ao longo destes anos. A todos devo o que sou e o que alcancei. Estarei eternamente grata.

Aos meus sogros e à minha cunhada que sempre estiveram presentes e disponíveis para me ajudar e que dessa forma contribuíram para a concretização do meu objectivo. Um muito obrigado.

A todas as pessoas não mencionadas e que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese de Doutoramento.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A diabetes *mellitus* é uma doença crónica com elevados custos sociais, humanos e económicos. É actualmente considerada um dos maiores problemas de saúde pública e só em Portugal existem mais de um milhão de diabéticos. A diabetes *mellitus* tipo 2 e a alteração do metabolismo da homocisteína estão ambas associados com a doença cardiovascular. Diversos estudos epidemiológicos indicam que a hiperhomocisteinémia moderada aumenta o *stress* oxidante, promovendo a formação da placa de ateroma. Este mecanismo pode ser reduzido por uma alimentação rica em micronutrientes antioxidantes. Diversos estudos têm demonstrado que o aumento da ingestão de alimentos ricos em vitaminas A, C, E, e carotenóides reduz a progressão da aterosclerose e previne o aparecimento da doença cardiovascular. A quantificação e avaliação dos níveis plasmáticos de homocisteína em diabéticos tipo 2 não é uma prática comum em Portugal. Os estudos nacionais nesta área, não caracterizam globalmente o risco de aparecimento e/ou progressão de complicações vasculares, por aumento dos níveis plasmáticos de homocisteína e cisteína e alteração dos níveis séricos dos marcadores de *stress* oxidante e de vitaminas antioxidantes na diabetes tipo 2.

**OBJECTIVOS:** (1) Avaliar o estado nutricional de uma amostra da população Portuguesa e relacionar a obesidade com os níveis plasmáticos ou séricos dos compostos bioquímicos em estudo; (2) Caracterizar os hábitos alimentares da população em estudo e correlacioná-los com os seus níveis plasmáticos da homocisteína e cisteína; (3) Relacionar a presença de angiopatia diabética do tipo 2 com a hiperhomocisteinémia, hipercisteinémia, o *stress* oxidante e com a diminuição dos níveis plasmáticos ou séricos de compostos antioxidantes (vitaminas A, C e E e carotenóides) e de cofactores do metabolismo da homocisteína (vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e folatos); (4) Avaliar o contributo da variação genética da haptoglobina e da enzima metilenotetrahidrofolato redutase para os níveis plasmáticos da homocisteína e cisteína na angiopatia diabética.

**MÉTODOS:** Foi realizado um estudo do tipo caso-controlo de base populacional em 300 adultos Portugueses de ambos os géneros, com idades entre 40 e os 75 anos. A população em estudo foi dividida em três grupos: grupo I - 75 diabéticos tipo 2 com angiopatia; grupo II - 75 diabéticos tipo 2 sem angiopatia; grupo III - 150 controlos não diabéticos. Os níveis plasmáticos de homocisteína, cisteína, malondialdeído, vitaminas B<sub>6</sub>, C, A e E, e carotenóides foram determinados por métodos de cromatografia líquida de elevada resolução. O doseamento de vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico no soro foi efectuado pelo método de electroquimioluminescência. Foram identificados os polimorfismos da haptoglobina e o C677T da metilenotetrahidrofolato redutase nos dois grupos de diabéticos. Os dados antropométricos foram obtidos por técnicas de referência e a prevalência de obesidade foi avaliada por três metodologias. A composição corporal dos participantes foi avaliada pelo método de bioimpedância tetrapolar. A percentagem de gordura corporal foi também calculada pela aplicação de 9 equações antropométricas. A concordância entre as equações antropométricas e o método da bioimpedância foi avaliada pela análise de *Bland-Altman* e pelo critério de *Lohman*. Foi aplicado um questionário padrão para a obtenção de dados gerais, clínicos e de actividade física. Os hábitos alimentares dos participantes dos últimos 12 meses foram avaliados por um questionário de frequência alimentar validado para a população adulta Portuguesa. A análise

estatística dos dados foi realizada utilizando os *softwares* SPSS®, versão 20.0 e MedCalc®, versão 12.3.0.

**RESULTADOS:** De acordo com o critério de avaliação do índice de massa corporal, a prevalência de obesidade foi superior nos dois grupos de diabéticos (grupo I: 57,3% vs. grupo II: 45,4%) quando comparada com o grupo dos não diabéticos (16,8%). Quando a metodologia aplicada foi a avaliação do perímetro abdominal, a prevalência de obesidade foi muito elevada para todos os grupos (>50%) e significativamente superior nos grupos I e II (70,7%) em relação ao grupo III (51,0%). A prevalência de obesidade avaliada pela percentagem de gordura corporal (método de bioimpedância) foi também muito elevada em toda a população (>75%), mas sem diferenças estatísticas entre grupos. A equação de Deurenberg (1998) foi a mais concordante com o método de bioimpedância. Os resultados da composição corporal demonstraram que as percentagens médias de gordura corporal, massa magra e água corporal total foram muito semelhantes entre grupos. A prevalência de desidratação na população estudada foi muito elevada (>55%).

A ingestão média diária de energia e de gordura total foi superior no grupo I em relação ao grupo III. A ingestão média diária de hidratos de carbono foi semelhante em todos os grupos e a de proteína foi superior nos diabéticos em relação aos controlos. A ingestão média diária de água foi para todos os grupos inferior aos valores recomendados pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar. A prevalência de inadequação da ingestão de fibra total foi superior a 50% em todos os grupos. A inadequação de ingestão de ácido eicosapentaenóico, ácido docosahexaenóico e de ácidos gordos ómega-6 e ómega-3 foi muito elevada para toda a população estudada (>70%). A prevalência de ingestão de sódio alimentar total acima do valor recomendado pela Organização Mundial de Saúde foi muito elevada em todos os grupos (>80%). A prevalência de inadequação da ingestão de 8 micronutrientes foi superior a 55% em todos os grupos, sendo que, o grupo dos não diabéticos foi o que apresentou maior prevalência de inadequação para 10 dos 24 micronutrientes avaliados. O padrão de ingestão de vitaminas e minerais nos dois grupos de diabéticos tipo 2 muito semelhante.

A presença da diabetes *mellitus* tipo 2 aumenta o risco de ter hiperhomocisteinémia, níveis elevados de malondialdeído e hipovitaminose C. A angiopatia aumenta a probabilidade de ocorrência de hiperhomocisteinémia e de stress oxidante mas não de hipovitaminose C. A prevalência de baixos níveis plasmáticos de ácido ascórbico e piridoxal-5-fosfato na população avaliada foi relevante (>30%). Foram observadas associações directas da homocisteína, cisteína e malondialdeído com o índice de massa corporal, perímetro abdominal e a gordura corporal. Por sua vez, foi observada uma relação inversa do ácido ascórbico, luteína e  $\beta$ -criptoxantina com os mesmos parâmetros antropométricos. Na relação entre a ingestão alimentar e as concentrações séricas de aminotióis, observou-se uma associação directa da homocisteína e cisteína com a ingestão de metionina e lisina.

A distribuição dos polimorfismos da haptoglobina e do C677T da metilenotetrahidrofolato redutase foi semelhante nos dois grupos de diabéticos estudados. A presença do genótipo Hp 2-1 foi associada com a predisposição para a ocorrência de hiperhomocisteinémia e hipercisteinémia nos diabéticos tipo 2 com angiopatia. Os diabéticos do grupo I portadores dos genótipos Hp 2-1 ou Hp 2-2 tiveram um risco cerca de quatro vezes superior hiperhomocisteinémia do que os diabéticos sem angiopatia. A presença dos genótipos C677T e

677TT nos diabéticos do grupo I aumentou em cerca de cinco vezes a probabilidade de ocorrência de hiperhomocisteinémia em relação aos diabéticos do grupo II. O efeito combinado do polimorfismo da haptoglobina com o polimorfismo C677T da metilenotetrahidrofolato redutase aumentou o risco de hipercisteinémia nos diabéticos com angiopatia.

**CONCLUSÃO:** A prevalência de obesidade foi superior a 70% para toda a população quando avaliada pelos critérios da percentagem de gordura corporal ou do perímetro abdominal. A equação de Deurenberg (1998) demonstrou ser a mais adequada para avaliar a percentagem de gordura corporal, em adultos Caucasianos com ou sem diabetes do tipo 2. Os dois grupos de diabéticos apresentaram um padrão de ingestão de nutrientes semelhante e uma prevalência de inadequação da ingestão inferior à do grupo controlo para 10 dos 24 micronutrientes avaliados. A diabetes *mellitus* tipo 2 é um factor de predisposição para a hiperhomocisteinémia, hipercisteinémia, *stress* oxidante e hipovitaminose C. A obesidade na diabetes tipo 2 está directamente associada com a homocisteína, cisteína e malondialdeído e inversamente com o ácido ascórbico, luteína e  $\beta$ -criptoxantina. A presença dos genótipos Hp 2-1 ou Hp 2-2 em diabéticos tipo 2 com angiopatia predispõe para a hiperhomocisteinémia e hipercisteinémia. A angiopatia nos diabéticos do tipo 2 portadores dos genótipos CT ou TT do polimorfismo C677T da metilenotetrahidrofolato redutase favorece a hiperhomocisteinémia. A interacção entre os genótipos Hp 2-1 e C677T da metilenotetrahidrofolato redutase potencia a presença de hipercisteinémia.

**Palavras-chave:** Homocisteína, doença cardiovascular, diabetes *mellitus* tipo 2, alimentação e obesidade.



## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Diabetes *mellitus* is a chronic disease with high social, human and financial costs. Nowadays it is considered one of the greatest public health problems and only in Portugal there are over a million of diabetics. Type 2 diabetes and changes of homocysteine metabolism are both associated with the cardiovascular disease. Several epidemiological studies indicate that moderate hyperhomocysteinemia increases oxidative stress by promoting the formation of atheroma plaque. This mechanism can be reduced by a rich diet in antioxidant micronutrients. Several studies have shown that increasing the intake of good food sources of vitamins A, C, E and carotenoids, reduces atherosclerosis progression and prevents the development of cardiovascular disease. The quantification and assessment of plasma homocysteine levels in type 2 diabetics is not a common practice in Portugal. National studies on this topic, do not characterize the overall risk of development and/or progression of vascular complications by increasing plasma levels of homocysteine and cysteine, and also by serum or plasma changes of oxidative stress markers and antioxidant vitamins in type 2 diabetes.

**AIMS:** (1) To assess the nutritional status of a sample of the Portuguese population and to relate obesity with serum or plasma levels of biochemical compounds under study, (2) To characterize the dietary habits of the study population and to correlate them with its plasma levels of homocysteine and cysteine; (3) To relate the presence of type 2 diabetic angiopathy with hyperhomocysteinemia, hypercysteinemia, oxidative stress and decreased levels of plasma or serum antioxidants (vitamins A, C and E and carotenoids) and cofactors of homocysteine metabolism (vitamins B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> and folate) and, (4) to evaluate the contribution of genetic variation of Hp and the C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase with plasma levels of homocysteine and cysteine in diabetic angiopathy.

**METHODS:** A population-based case-control study in 300 Portuguese adults of both genders, aged 40 to 75 years was performed. The study population was divided into three groups: group I - 75 type 2 diabetics with angiopathy, group II - 75 type 2 diabetics without angiopathy, group III - 150 controls. Plasma levels of homocysteine, cysteine, malondialdehyde, vitamins B<sub>6</sub>, C, A and E and carotenoids were measured by high-performance liquid chromatographic methods. The assay to measure vitamin B<sub>12</sub> and folate in serum was carried out by an electrochemiluminescence method. The polymorphisms of haptoglobin and the C677T of methylenetetrahydrofolate reductase were identified in both of the studied diabetic groups. Anthropometric data were obtained by standard techniques and the prevalence of obesity was assessed by three different methodologies. The body composition of the participants was assessed by applying the tetrapolar bioimpedance method. The percentage of body fat was also calculated by applying 9 anthropometric equations. The agreement between anthropometric equations and bioimpedance method was evaluated by performing the Bland-Altman analysis and applying the Lohman criterion. A standard questionnaire was also performed to obtain general data, clinical and physical activity. The eating habits of the participants in the past 12 months were assessed by applying a food frequency questionnaire validated for the Portuguese adult population. The statistical analysis was performed using SPSS<sup>®</sup> version 20.0 and MedCalc<sup>®</sup> version 12.3.0.

**RESULTS:** According to the evaluation criteria of body mass index, the prevalence of obesity was higher in both diabetic groups (group I: 57.3% vs. Group II: 45.4%) compared with the group of nondiabetic (16.8%). When the abdominal waist methodology was applied, the prevalence of obesity was very high in all groups (>50%) and significantly higher in groups I and II (70.7%) compared to group III (51.0 %). Obesity prevalence assessed by the percentage of body fat (bioimpedance method) was also very high in the whole population (>75%), but not statistically different between groups. The Deurenberg equation (1998) was the most consistent with the bioimpedance method. The method of body mass index underestimated the prevalence of obesity in the studied population. The body composition results showed that the average of body fat percentage, lean body mass and total body water were similar between groups. The prevalence of dehydration in the study population was very high (>55%).

The average daily intake of energy and total fat was higher in group I than in group III. The average daily intake of carbohydrates was similar in all groups and that of protein was higher in diabetic patients compared to controls. The average daily intake of water for all groups was lower than the values recommended by the European Food Safety Authority. The prevalence of inadequate intake of total dietary fiber was greater than 50% in all groups. Inadequate intake of eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, omega-6 and omega-3 fatty acids was very high for the whole study population (>70%). The prevalence of total dietary sodium intake above the amount recommended by the World Health Organization was very high in all groups (>80%). The prevalence of inadequate intake of eight micronutrients was above 55% in all groups and the non-diabetic group showed the highest prevalence of inadequacy for ten of the 24 micronutrients assessed. The pattern of intake of vitamins and minerals in the two groups of type 2 diabetes was very similar.

The presence of type 2 diabetes increases the risk of hyperhomocysteinemia, high levels of malondialdehyde and that of hypovitaminosis C. Angiopathy increases the occurrence probability of hyperhomocysteinemia and oxidative stress but not hypovitaminosis C. The prevalence of low plasma levels of ascorbic acid and pyridoxal-5-phosphate in the studied population was relevant (>30%). Direct associations of homocysteine, cysteine and malondialdehyde with body mass index, waist circumference and body fat were observed. In turn, there was an inverse relationship of ascorbic acid, lutein and  $\beta$ -cryptoxanthin with the same anthropometric parameters. In the relation between food intake and serum concentrations of aminothiols, a direct association of homocysteine and cysteine with the intake of methionine and lysine was observed.

The distribution of haptoglobin and the C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms was similar in both groups of the studied diabetics. The presence of the Hp 2-1 genotype was associated with a predisposition to the occurrence of hyperhomocysteinemia and hypercysteinemia in type 2 diabetics with angiopathy. The diabetic patients of group I who carry the genotypes Hp 2-1 or Hp 2-2 had a probability risk four times higher to have an elevated plasma homocysteine level than diabetics without angiopathy. The presence of 677TT and C677T genotypes in diabetic patients of group I increases in five times the occurrence probability to have hyperhomocysteinemia in relation to diabetic patients of group II. The combined effect of the polymorphism of haptoglobin and the C677T

of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism increased the occurrence probability of hypercysteinemia in diabetics with angiopathy.

**CONCLUSION:** The prevalence of obesity was greater than 70% in the whole population when evaluated by the criteria of body fat percentage or abdominal waist. The Deurenberg equation (1998) proved to be the most suitable for measuring the body fat percentage in Caucasian adults with or without type 2 diabetes. Both diabetic groups showed a similar pattern of nutrient intake and a prevalence of inadequate intake lower than the obtained in the control group for 10 of the 24 assessed micronutrients. Diabetes *mellitus* type 2 is a predisposing factor for hyperhomocysteinemia, hypercysteinemia, oxidative stress and hypovitaminosis C. Obesity in type 2 diabetes is directly associated with homocysteine, cysteine and malondialdehyde and inversely with ascorbic acid, lutein and  $\beta$ -cryptoxanthin. The presence of genotypes Hp 2-1 and Hp 2-2 in type 2 diabetics with angiopathy predisposes to hyperhomocysteinemia and hypercysteinemia. Angiopathy in type 2 diabetic patients with the CT or TT genotypes of the C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase promotes hyperhomocysteinemia. The interaction between the genotypes of Hp 2-1 and C677T methylenetetrahydrofolate reductase enhances the presence of hypercysteinemia.

**Keywords:** Homocysteine, cardiovascular disease, type 2 diabetes *mellitus*, diet and obesity.



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Nome</b>
AA	Ácido L-ascórbico
ACT	Água corporal total
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGEs	<i>Advanced glycation end-products</i>
AdoMet	S-adenosilmetionina
AGP	Ácidos gordos polinsaturados
AI	<i>Adequate intake</i>
AMRD	<i>Acceptable macronutrient distribution range</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
BIA	Bioimpedância eléctrica
BHT	Hidroxitolueno butilado
C-HDL	Colesterol das lipoproteínas de elevada densidade plasmática
C-LDL	Colesterol das lipoproteínas de baixa densidade plasmática
C $\beta$ S	Cistationina $\beta$ -sintetase
CT	Colesterol total
Cys	Cisteína
DAD	Detector de díodos
DAP	Doença arterial periférica
DCV	Doença cardiovascular
DHA	Ácido gordo docosohexaenóico
DMT2	Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRI	<i>Dietary reference intake</i>
EAM	Enfarte agudo do miocárdio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPA	Ácido gordo ecosopentanóico
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	Gordura corporal
Hb	Hemoglobina
HbA1C	Hemoglobina glicosilada
Hcy	Homocisteína
Hp	Haptoglobina

## Lista de Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Nome</b>
HPLC	Cromatografia líquida de elevada eficiência
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IMC	Índice de massa corporal
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade plasmática
LQ	Limite de quantificação
MAD	Malondialdeído
MAT	Metionina-adenosiltransferase
MM	Massa magra
MS	Metionina sintetase
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
PA	Perímetro abdominal
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PLF	Piridoxal-5-fosfato
QFA	Questionário de frequência alimentar
RDA	<i>Recommended dietary allowance</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SBD-F	7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TCEP	Tris-(2-carboxietil)-fosfina
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível

<b>ÍNDICE</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	1
1.1.1. Etiologia e fisiopatologia da diabetes	1
1.1.2. Epidemiologia da diabetes	3
1.1.3. Patogénese da angiopatia na diabetes	4
1.1.4. O <i>stress</i> oxidante e a angiopatia	8
1.1.5. Haptoglobina e complicações vasculares na diabetes	10
1.1.6. A doença cardiovascular e a diabetes	12
1.1.7. Avaliação do estado nutricional	15
1.1.8. A alimentação e a diabetes	18
1.2. Homocisteína	23
1.2.1. Bioquímica e metabolismo	23
1.2.2. Classificação dos níveis plasmáticos de homocisteína e cisteína	25
1.2.3. Determinantes dos níveis plasmáticos da homocisteína	25
1.2.4. Homocisteína, cisteína e a doença cardiovascular	28
1.2.5. Homocisteína e a diabetes	31
1.2.6. A alimentação e a hiperhomocisteinémia	32
<b>2. OBJECTIVOS</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
3.1. População em estudo	37
3.2. Considerações éticas	37
3.3. Colheita de dados	38
3.3.1. Gerais, clínicos e fisiológicos	38
3.3.2. Antropometria e composição corporal	38
3.3.3. Alimentares	40
3.3.4. Bioquímicos	41
3.4. Análises bioquímicas	42
3.4.1. Desenvolvimento e optimização dos métodos bioquímicos	42
3.4.1.1. Doseamento da homocisteína e cisteína	42
3.4.1.1.1. Reagentes e soluções	42
3.4.1.1.2. Preparação de soluções padrão	42
3.4.1.1.3. Tratamento da amostra	43
3.4.1.1.4. Condições cromatográficas	43
3.4.1.1.5. Optimização do método	43
3.4.1.2. Doseamento da vitamina B <sub>6</sub>	44
3.4.1.2.1. Reagentes e soluções	44
3.4.1.2.2. Preparação de soluções padrão	44
3.4.1.2.3. Tratamento da amostra	44
3.4.1.2.4. Condições cromatográficas	45
3.4.1.2.5. Optimização do método	45

3.4.1.3. Doseamento da vitamina C	46
3.4.1.3.1. Reagentes e soluções	46
3.4.1.3.2. Preparação de soluções padrão	46
3.4.1.3.3. Tratamento da amostra	46
3.4.1.3.4. Condições cromatográficas	47
3.4.1.3.5. Optimização do método	47
3.4.1.4. Doseamento do malondialdeído	47
3.4.1.4.1. Reagentes e soluções	47
3.4.1.4.2. Preparação de soluções padrão	47
3.4.1.4.3. Tratamento da amostra	48
3.4.1.4.4. Condições cromatográficas	48
3.4.1.4.5. Optimização do método	48
3.4.1.5. Doseamento das vitaminas A e E e carotenóides	49
3.4.1.5.1. Reagentes e soluções	49
3.4.1.5.2. Preparação de soluções padrão	49
3.4.1.5.3. Tratamento da amostra	50
3.4.1.5.4. Condições cromatográficas	50
3.4.1.5.5. Optimização do método	51
3.4.1.6. Doseamento da vitamina B <sub>12</sub>	52
3.4.1.7. Doseamento do ácido fólico	52
3.4.2. Validação dos métodos bioquímicos	53
3.4.3. Aplicação dos métodos bioquímicos	54
3.5. Análises genéticas	55
3.5.1. Identificação dos polimorfismos genéticos da haptoglobina	55
3.5.2. Identificação do polimorfismo genético C677T da enzima MTHFR	55
3.5.2.1. Extracção do DNA	55
3.5.2.2. Quantificação e determinação da pureza do DNA	56
3.5.2.3. Identificação da mutação C677T	56
3.6. Tratamento de dados e análise estatística	57
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>59</b>
4.1. Características iniciais da população	59
4.2. Avaliação nutricional	61
4.2.1. Antropometria versus bioimpedância	61
4.2.2. Prevalência de obesidade e avaliação da gordura corporal	65
4.2.3. Comparação entre o método de bioimpedância eléctrica e as equações antropométricas	67
4.3. Caracterização dos hábitos alimentares	69
4.4. Optimização e validação de métodos	78

4.4.1. Doseamento da homocisteína e cisteína	78
4.4.2. Doseamento da vitamina B <sub>6</sub>	81
4.4.3. Doseamento da vitamina C	84
4.4.4. Doseamento do malondialdeído	86
4.4.5. Doseamento das vitaminas A e E e carotenóides	89
4.4.6. Doseamento da vitamina B <sub>12</sub>	98
4.4.7. Doseamento do ácido fólico	98
4.5. Avaliação das concentrações dos compostos bioquímicos em estudo	98
4.6. Associação dos níveis plasmáticos da homocisteína e cisteína com os outros compostos bioquímicos	105
4.7. Associação dos níveis plasmáticos da homocisteína e cisteína com o estado nutricional e clínico	107
4.8. Associação dos níveis plasmáticos da homocisteína e cisteína com a ingestão alimentar	110
4.9. Associação entre o <i>stress</i> oxidante, antioxidantes alimentares, estado nutricional e clínico	113
4.10. Polimorfismos genéticos da haptoglobina e sua associação com os parâmetros bioquímicos	118
4.11. Polimorfismo C677T da enzima MTHFR e sua associação com os parâmetros bioquímicos	120
4.12. Combinação dos polimorfismos genéticos da haptoglobina e do C677T da enzima MTHFR e sua associação com os parâmetros bioquímicos	123
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>127</b>
5.1. Avaliação nutricional	127
5.2. Caracterização dos hábitos alimentares	130
5.3. Otimização e validação de métodos	139
5.4. Avaliação das concentrações dos compostos bioquímicos em estudo	144
5.5. Associação dos níveis plasmáticos da homocisteína e cisteína com os outros compostos bioquímicos	152
5.6. Associação dos níveis plasmáticos da homocisteína e cisteína com o estado nutricional e clínico	156
5.7. Associação dos níveis plasmáticos da homocisteína e cisteína com a ingestão alimentar	157
5.8. Associação entre o <i>stress</i> oxidante, antioxidantes alimentares, estado nutricional e clínico	159
5.9. Associação dos polimorfismos genéticos da haptoglobina e do C677T da enzima MTHFR com os parâmetros bioquímicos	163

<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>167</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>171</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>173</b>
<b>ANEXO I</b> - Folheto informativo - diabéticos	217
<b>ANEXO II</b> - Folheto informativo - controlos	221
<b>ANEXO III</b> - Consentimento informado - diabéticos	224
<b>ANEXO IV</b> - Consentimento informado - controlos	229
<b>ANEXO V</b> - Questionário geral aplicado aos diabéticos	233
<b>ANEXO VI</b> - Questionário geral aplicado aos controlos	243
<b>ANEXO VII</b> - Registo de dados antropométricos e fisiológicos	253
<b>ANEXO VIII</b> - Trabalhos de investigação realizados no âmbito deste estudo	257

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Fisiopatologia da hiperglicémia e aumento dos ácidos gordos em circulação na diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	2
<b>Figura 2.</b>	Vias de formação e produtos finais de glicação avançada	5
<b>Figura 3.</b>	Associação entre a insulino-resistência, diabetes do tipo 2 e doença cardiovascular	14
<b>Figura 4.</b>	Metabolismo da homocisteína	25
<b>Figura 5.</b>	Possível mecanismo de doença aterotrombótica	29
<b>Figura 6.</b>	Análise Bland-Altman para comparar a percentagem de gordura corporal estimada pela aplicação de equações antropométricas e pelo método de bioimpedância eléctrica	68
<b>Figura 7.</b>	Cromatogramas obtidos no método de doseamento de homocisteína e cisteína	80
<b>Figura 8.</b>	Cromatograma de uma mistura padrão das várias formas da vitamina B <sub>6</sub>	82
<b>Figura 9.</b>	Cromatogramas obtidos no método de doseamento de piridoxal-5-fosfato	83
<b>Figura 10.</b>	Cromatogramas obtidos no método de doseamento de ácido ascórbico	85
<b>Figura 11.</b>	Cromatogramas obtidos no método de doseamento de malondialdeído com detecção por fluorescência	87
<b>Figura 12.</b>	Cromatogramas obtidos no método de doseamento de malondialdeído com detecção por ultravioleta	88
<b>Figura 13.</b>	Cromatograma de uma mistura padrão de carotenóides	90
<b>Figura 14.</b>	Cromatograma de uma amostra de soro de diabético do tipo 2 obtido no método de doseamento de carotenóides	91
<b>Figura 15.</b>	Cromatogramas obtidos no método de doseamento de retinol	92
<b>Figura 16.</b>	Cromatogramas obtidos no método de doseamento de $\alpha$ -tocoferol	93



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Métodos de avaliação do consumo alimentar	16
<b>Tabela 2.</b>	Equações antropométricas utilizadas para calcular a percentagem de gordura corporal na população em estudo	40
<b>Tabela 3.</b>	Coeficientes de extinção ( $\epsilon_{1cm}^{1\%}$ ), solventes e comprimentos de onda máximos ( $\lambda_{máx.}$ ) para as vitaminas A e E e carotenóides	50
<b>Tabela 4.</b>	Métodos analíticos para a quantificação dos parâmetros bioquímicos em estudo	54
<b>Tabela 5.</b>	Sequência dos <i>primers</i> utilizados e condições de PCR para amplificação do DNA	56
<b>Tabela 6.</b>	Características clínicas e laboratoriais iniciais da população em estudo	59
<b>Tabela 7.</b>	Prevalência das complicações angiopáticas e factores clássicos de risco cardiovascular	61
<b>Tabela 8.</b>	Medições antropométricas e composição corporal por bioimpedância eléctrica na população em estudo	64
<b>Tabela 9.</b>	Avaliação do índice de massa corporal, perímetro abdominal e percentagem de gordura corporal na população em estudo	66
<b>Tabela 10.</b>	Comparação entre a aplicação das equações antropométricas e do método de bioimpedância eléctrica para avaliar a percentagem de gordura corporal na população em estudo	69
<b>Tabela 11.</b>	Ingestão média diária de energia, macronutrientes e seus constituintes na população em estudo	70
<b>Tabela 12.</b>	Ingestão média diária de micronutrientes na população em estudo	71
<b>Tabela 13.</b>	Prevalência da inadequação de ingestão de macronutrientes e seus constituintes na população em estudo	74
<b>Tabela 14.</b>	Prevalência da inadequação de ingestão de micronutrientes na população em estudo	77
<b>Tabela 15.</b>	Parâmetros de validação dos métodos cromatográficos	96
<b>Tabela 16.</b>	Níveis plasmáticos ou séricos dos compostos bioquímicos	101
<b>Tabela 17.</b>	Avaliação dos níveis plasmáticos ou séricos dos parâmetros bioquímicos	103
<b>Tabela 18.</b>	Efeito da presença de DMT2 na variação dos parâmetros bioquímicos	104
<b>Tabela 19.</b>	Efeito da presença de angiopatia diabética na variação dos parâmetros bioquímicos	104

<b>Tabela 20.</b>	Efeito combinado da presença de DMT2 e da angiopatia na variação dos parâmetros bioquímicos	105
<b>Tabela 21.</b>	Regressão linear simples dos níveis plasmáticos de homocisteína e cisteína com outros parâmetros bioquímicos	107
<b>Tabela 22.</b>	Associação da homocisteína e cisteína com as variáveis antropométricas e fisiológicas	109
<b>Tabela 23.</b>	Associação da homocisteína e cisteína com a ingestão diária de nutrientes	111
<b>Tabela 24.</b>	Associação do malondialdeído, vitaminas antioxidantes e carotenóides com as variáveis antropométricas e fisiológicas	115
<b>Tabela 25.</b>	Distribuição das frequências dos fenótipos da haptoglobina nos grupos da população de diabéticos	118
<b>Tabela 26.</b>	Efeito do fenótipo 1-1 da Hp na variação dos parâmetros bioquímicos	118
<b>Tabela 27.</b>	Efeito do fenótipo 2-1 da Hp na variação dos parâmetros bioquímicos	119
<b>Tabela 28.</b>	Efeito do fenótipo 2-2 da Hp na variação dos parâmetros bioquímicos	119
<b>Tabela 29.</b>	Efeito combinado dos fenótipos 2-1 e 2-2 da Hp na variação dos parâmetros bioquímicos	120
<b>Tabela 30.</b>	Distribuição das frequências genóticas do polimorfismo C677T da MTHFR nos grupos da população de diabéticos	120
<b>Tabela 31.</b>	Efeito do genótipo CC do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos	121
<b>Tabela 32.</b>	Efeito do genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos	121
<b>Tabela 33.</b>	Efeito do genótipo TT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos	122
<b>Tabela 34.</b>	Efeito combinado dos genótipos CC e CT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos	122
<b>Tabela 35.</b>	Efeito combinado dos genótipos CT e TT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos	123
<b>Tabela 36.</b>	Efeito combinado do fenótipo 2-2 da Hp com o genótipo TT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos	124
<b>Tabela 37.</b>	Efeito combinado do fenótipo 2-2 da Hp com o genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos	124
<b>Tabela 38.</b>	Efeito combinado do fenótipo 2-1 da Hp com o genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos bioquímicos	125

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Diabetes *mellitus* tipo 2

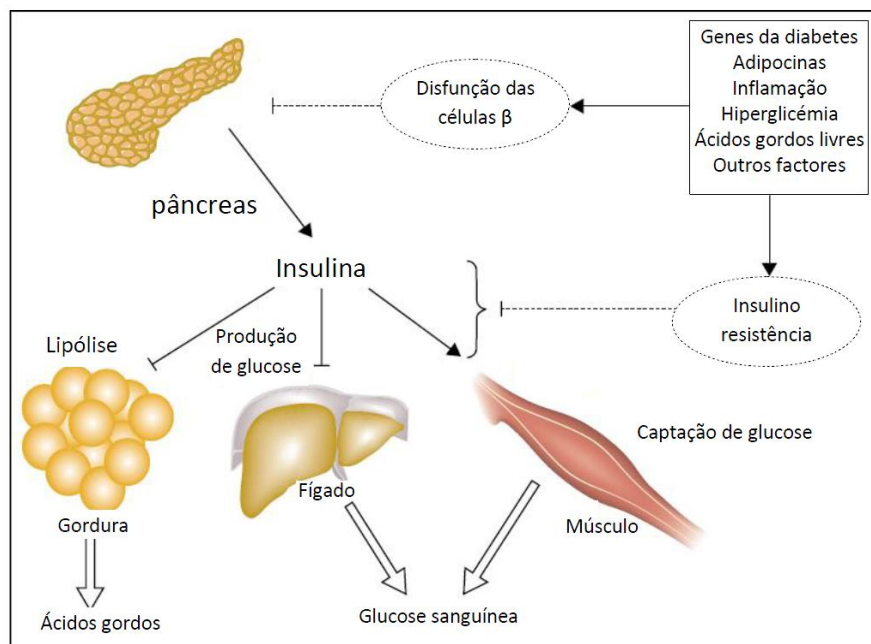
### 1.1.1. Etiologia e fisiopatologia da diabetes

A diabetes é uma doença heterogénea caracterizada por uma hiperglicémia crónica (1). As causas desta doença são multifactoriais e incluem factores genéticos e ambientais que afectam a secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas e simultaneamente a sensibilidade dos tecidos (ex. músculo, fígado, tecido adiposo, pâncreas) à acção da insulina (1,2). A hereditariedade é um factor preponderante no aparecimento da diabetes *mellitus* do tipo 2 (DMT2). A presença de antecedentes familiares de DMT2 aumenta em 2,4 vezes o risco de ter esta doença crónica (3). Entre 15-25% de familiares directos de diabéticos do tipo 2, têm uma menor tolerância à glucose ou desenvolvem diabetes. Se um dos pais é diabético do tipo 2, o risco de um descendente ter esta doença ao longo da vida é de 38%, mas se ambos os pais forem diabéticos do tipo 2, 60% dos seus descendentes aos 60 anos terão desenvolvido esta doença (3).

Uma das manifestações metabólicas da DMT2 é a hiperglicémia, que resulta da resistência à acção da insulina e de uma diminuição na secreção da glucagina em resposta à glucose ingerida. A insulina que regula o metabolismo da glucose é produzida nas células do pâncreas, conhecidas como ilhéus de Langerhans. Existem dois tipos de células no pâncreas, as  $\alpha$  e as  $\beta$ . As Células  $\alpha$  ocupam cerca de 30% do pâncreas e têm a função de secretar a glucagina quando existe uma diminuição dos níveis plasmáticos de glucose. As células  $\beta$  ocupam cerca de 60% do mesmo órgão e têm como função produzir insulina que é libertada no sangue em resposta à elevação dos níveis plasmáticos de glucose (4). A interacção entre a actividade das células  $\alpha$  e  $\beta$  permite ao organismo regular o equilíbrio entre o armazenamento e a disponibilidade plasmática de glucose. A resposta metabólica à ingestão de hidratos de carbono é extremamente diferente entre indivíduos com uma tolerância normal à glucose em relação aos diabéticos do tipo 2. Nos indivíduos com metabolismo da glucose normal, depois da sua ingestão existe um aumento dos níveis plasmáticos de glucose, bem como, um aumento de secreção de insulina e uma diminuição da secreção de glucagina (5). Nos diabéticos do tipo 2 e após uma refeição, os níveis plasmáticos de glucose aumentam mais do que nos indivíduos não diabéticos, o pico plasmático de insulina é menor e os níveis de glucagina aumentam ligeiramente. A ausência da diminuição dos níveis plasmáticos de glucagina é um dos factores chave para compreender a desregulação do metabolismo da glucose, a insulino-resistência e a produção insuficiente de insulina que ocorre nos diabéticos do tipo 2 (5). A insulina é a hormona chave para a regulação da glucose no sangue e habitualmente uma normoglicémia é mantida pelo equilíbrio entre a acção e a secreção da insulina. Num indivíduo não diabético as células  $\beta$  pancreáticas conseguem adaptar-se a alterações na acção da insulina. Normalmente, uma diminuição da acção da insulina é

## Introdução

acompanhada por uma maior secreção desta hormona. Na DMT2 existe uma disfunção das células  $\beta$  e o equilíbrio metabólico deixa de existir, conseqüentemente a glucose acumula-se no sangue e surge a hiperglicémia. A insulino-resistência é caracterizada por uma diminuição dos efeitos biológicos da insulina, não permitindo o armazenamento da glucose no tecido muscular e simultaneamente não actuando devidamente na supressão da produção endógena da glucose pelo fígado. Em jejum, as reservas de glucose no músculo são inferiores a 20%, sendo, a produção endógena do fígado a principal responsável pela introdução de glucose na corrente sanguínea (3). Nos diabéticos do tipo 2, a produção endógena de glucose está aumentada e porque este aumento acontece na presença de hiperinsulinémia, pelo menos nas fases iniciais e intermédias da doença, a resistência hepática à insulina é a principal causa da presença de hiperglicémia (Fig. 1).



**Figura 1. Fisiopatologia da hiperglicémia e aumento dos ácidos gordos em circulação na DMT2.** A secreção normal da insulina pelo pâncreas reduz a produção endógena de glucose pelo fígado, aumenta a captação de glucose pelo músculo e inibe a libertação dos ácidos gordos pelo tecido adiposo. Na DMT2, a diminuição da secreção de insulina reduz a sua actividade nos tecidos alvo. Na via da insulino-resistência a acção da insulina em cada um dos tecidos alvo é afectada, conseqüentemente surge a hiperglicémia e o aumento de ácidos gordos na circulação. Por sua vez, o aumento das concentrações de glucose e ácidos gordos na corrente sanguínea estimula a diminuição da secreção da insulina e a insulino-resistência [adaptado de (3)].

A resistência à insulina está fortemente associada à obesidade e ao sedentarismo. Vários compostos como hormonas, citocinas e ácidos gordos não esterificados modelam a acção da insulina. Estes últimos têm origem nos adipócitos e por isso quando existe uma grande quantidade de triglicéridos armazenados (especialmente a nível visceral ou nos depósitos adiposos subcutâneos) ocorre um aumento do volume dos adipócitos que são resistentes à capacidade da insulina em suprimir a lipólise. Esta resistência resulta no aumento da libertação

e dos níveis circulatórios de ácidos gordos não esterificados e glicerol. Ambos os compostos agravam a insulino-resistência dos dois órgãos alvo (músculo e fígado) (3).

### 1.1.2. Epidemiologia da diabetes

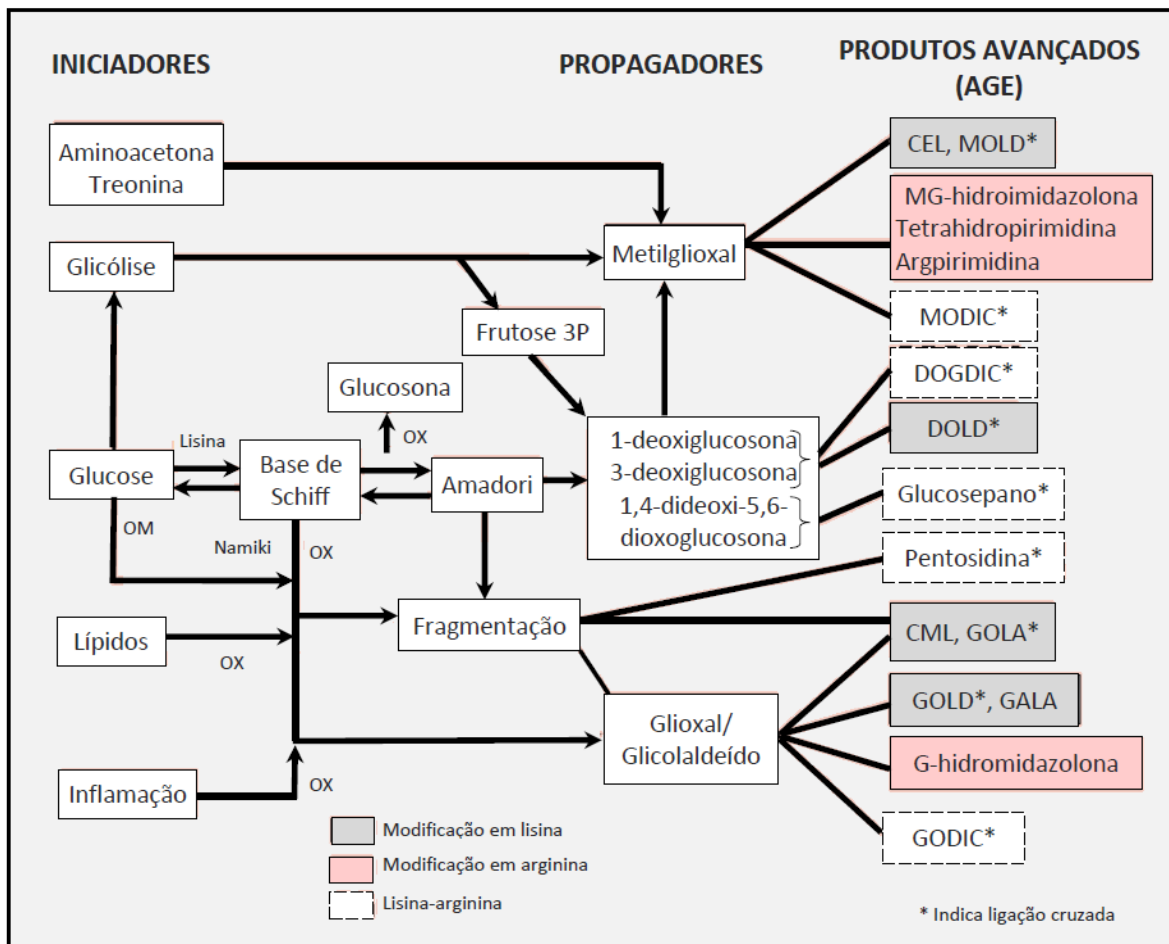
A diabetes *mellitus* é uma doença crónica com elevados custos sociais, humanos e económicos, estando em franco crescimento nos países desenvolvidos e em rápida expansão por todo o mundo. A prevalência da diabetes tem vindo a aumentar em consequência do efeito de diversos factores, como sendo, o aumento e envelhecimento da população mundial, a globalização, o desenvolvimento, a longevidade, a obesidade e o sedentarismo (6). Nos últimos 15 anos têm sido realizados vários estudos mundiais para estimar a prevalência da diabetes. King *et al.* (7), estimou que o número de diabéticos em 2025 seria de 300 milhões. Em 2004, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que em 2000 existiam 171 milhões de diabéticos e que esse número passaria para 366 milhões em 2030 (8). Recentemente no âmbito do projecto *Global Burden Disease* foram publicados os resultados da estimativa dos níveis médios de glucose na população. Utilizando esses valores, foi estimado que a prevalência da diabetes para 2008 seria de 346 milhões (9). Este número é muito semelhante à prevalência calculada pela *International Diabetes Federation* (IDF), que estimou um total de 366 milhões de diabéticos para 2011 e 552 milhões em 2030. Entre 2011 e 2030, a IDF estimou um aumento da prevalência mundial da diabetes em 50,7%, sendo os países com grande aumento da densidade populacional (ex. Índia, China e Brasil) considerados os que mais contribuiriam para o aumento desta prevalência (6). De acordo com Boavida *et al.* (10), em 2011 foi estimada a existência de mais de um milhão de pessoas com diabetes em Portugal. A prevalência da doença nesse ano foi assim de 12,7% da população com idades entre os 19 e os 79 anos. Em 44% dos casos a diabetes não estava diagnosticada. A hiperglicémia intermédia afectou cerca de 26,5% da população Portuguesa com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos e cerca de 39,2% dessa população tinha diabetes ou hiperglicémia intermédia. Mais de um quarto das pessoas (27,1%) com idades entre os 60 e os 79 anos tinha diabetes. A prevalência desta doença crónica foi maior nos homens (15,2%) do que nas mulheres (10,4%). Em 2011 foram detectados 652 novos casos de diabetes por cada 100 mil habitantes e morreram 4536 pessoas em Portugal devido a esta doença. A prevalência e incidência da diabetes tem vindo a aumentar nestes últimos anos (10). De acordo com o Observatório Nacional da Diabetes, nos últimos 10 anos o número de novos casos em Portugal aumentou cerca de 90%. Em 2011, verificou-se uma diminuição da letalidade intra-hospitalar nos doentes hospitalizados com diabetes, quer no diagnóstico principal, bem como, no diagnóstico associado. É ainda importante referir que houve um aumento (42% nos últimos 10 anos) do número de óbitos nos internamentos com registo de diabetes. A letalidade intra-hospitalar para outras doenças (ex. neoplasias, doenças circulatórias e doenças respiratórias) foi superior nos diabéticos quando comparada com os valores globais para cada

patologia. No entanto alguns indicadores têm evidenciado que nos últimos anos o sistema de saúde tem conseguido controlar o crescimento de algumas das complicações associadas à diabetes. Em 2011, a diabetes em Portugal teve um custo de 1816 milhões de euros, o que representou 1% do Produto Interno Bruto Português e 10% da despesa em Saúde (10). É ainda importante referir que de acordo com os resultados do primeiro estudo de prevalência da diabetes realizado em Portugal, verificou-se a existência de uma associação entre o índice de massa corporal (IMC) e a diabetes. Os resultados do referido estudo indicaram que cerca de 90% da população diabética estudada tinha excesso de peso ou era obesa e que um obeso tinha um risco de ter diabetes 3 vezes superior ao de uma pessoa sem excesso de peso (11).

### 1.1.3. Patogénese da angiopatia na diabetes

A morbidade e mortalidade na diabetes *mellitus* são provocadas essencialmente pela presença de complicações vasculares: macro- e microangiopáticas. A retinopatia e a nefropatia são as principais complicações microangiopáticas na DMT2, sendo a cegueira e a insuficiência renal as consequências finais das respectivas complicações. A neuropatia diabética é também uma das complicações microangiopáticas tardias e resulta de lesões nos nervos do nosso organismo. Quando os nervos são lesados há manifestações tais como alterações da sensibilidade, aparecimento de queixas dolorosas mais ou menos intensas e, frequentemente, perda das sensibilidades dolorosa e térmica. A macroangiopatia na diabetes consiste principalmente numa forma acelerada de aterosclerose, que aumenta o risco de enfarte agudo do miocárdio (EAM), acidente vascular cerebral (AVC) e de doença vascular periférica (12). A lesão da parede vascular na diabetes é uma consequência típica da presença de hiperglicémia crónica. Vários estudos epidemiológicos indicam que a disfunção do endotélio está fortemente associada ao desenvolvimento da retinopatia diabética, nefropatia e aterosclerose em diabéticos (12,13). A patogénese da angiopatia na diabetes é controversa e vários modelos explicativos têm sido propostos para esclarecer os mecanismos que estão na base das complicações vasculares. Diferentes mecanismos patogénicos como a glicação não enzimática, via do sorbitol, activação da proteína cinase C, *stress* oxidante e alterações hemodinâmicas estão envolvidos no aparecimento da disfunção endotelial, enquanto etapa inicial do desenvolvimento da angiopatia diabética (14). O endotélio é um importante local do controlo vascular e das funções renais. Regula activamente o tónus e a permeabilidade vascular, o equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise, a composição da matriz do subendotélio e a proliferação do músculo liso vascular e das células mesangiais renais. Para exercer estas funções, o endotélio produz componentes da matriz extracelular e uma variedade de mediadores da regulação (ex. óxido nítrico, prostanóides, endotelina, angiotensina II, activadores do plasminogénio, factor *von Willebrand*, moléculas de adesão e citocinas). Normalmente o endotélio diminui o tónus vascular através da acção do óxido nítrico. Regula também a permeabilidade vascular aos nutrientes, hormonas e outras macromoléculas, bem como, aos leucócitos. As células do endotélio

normalmente inibem a adesão plaquetária e a agregação, limitam a activação da cascata de coagulação e regula a fibrinólise. Considera-se que existe disfunção do endotélio quando as suas propriedades estão de tal forma alteradas que este não consegue preservar as funções normais dos órgãos. Nestas situações a permeabilidade e o tónus vascular podem aumentar e posteriormente o endotélio pode perder as suas propriedades antitrombóticas e profibrinolíticas (12). Um dos principais mecanismos patogénicos da angiopatia na diabetes é a glicação não enzimática. Em condições de hiperglicémia parte do excesso de glicose reage não enzimaticamente com proteínas, tecidos ou constituintes do sangue, aumentando assim, o nível fisiológico da glicação não enzimática (15). Os *Advanced glycation end-products* (AGEs) são um grupo heterogéneo de substâncias formadas a partir da interacção (não enzimática) de um grupo amina das proteínas, aminofosfolípidos ou ácidos nucleicos com um grupo carbonilo de açúcares redutores ou lípidos oxidados (16). O processo de glicação avançada é bastante complexo mas podem definir-se três etapas principais: iniciação, propagação e terminação. Na Fig. 2 são apresentadas as principais vias de formação e os produtos finais da glicação avançada (17).



**Figura 2. Vias de formação e produtos finais de glicação avançada.** CML, N $\alpha$ -(carboximetil)lisina; CEL, N $\epsilon$ -(carboxietil)lisina; DOGDIC, dímero de lisina-arginina, com formação de imidazolidina, para a glicose; DOLD, dímero de lisina e 3-deoxiglicose; GOLA, glioxal lisina amida; GOLD, dímero de glioxal-lisina; GALA, ácido glioxílico lisina amida; GODIC, dímero de lisina-arginina derivado para o glioxal; MODIC, dímero de lisina-arginina derivado para o metilglioxal; MOLD, dímero de lisina derivado para o metilglioxal [adaptado de (17)].

## Introdução

A via clássica da reacção de *Maillard*, também denominada glicação, inicia-se com a formação de uma base de *Schiff*, proveniente da condensação do grupo carbonilo de um açúcar redutor (ex. glicose) com um grupo amina (ex. lisina) (16). A base de *Schiff*, é instável e altamente susceptível à oxidação e formação de radicais livres, estando por isso sujeita a diversos rearranjos até originar um produto de *Amadori* (17). Estes produtos são formados por grupos carbonilo reactivos que se condensam com grupos aminas primários disponíveis formando os produtos avançados da reacção de *Maillard*, os AGEs. Os mecanismos alternativos de formação de AGEs incluem a chamada via do *stress* carbonílico, na qual a oxidação de lípidos ou de açúcares origina a formação de compostos dicarbonílicos intermediários altamente reactivos que interagem com aminoácidos para formar os AGEs (18). Estes compostos dicarbonílicos são potentes agentes de glicação, sendo 200 a 50.000 vezes mais reactivos do que a glicose (19). Em condições fisiológicas normais, a formação de AGEs ocorre lentamente e afecta predominantemente moléculas com tempo de vida longa, como o colagénio (20). No entanto, na presença de hiperglicémia ou *stress* oxidante, a formação de AGEs aumenta significativamente e por isso os diabéticos têm habitualmente concentrações séricas de AGEs significativamente mais elevadas do que os indivíduos não diabéticos (21).

A hemoglobina glicosilada (HbA1C) é um importante marcador biológico com várias aplicações clínicas e patológicas. A medição da HbA1C é habitualmente utilizada para avaliar o controlo metabólico da diabetes a longo prazo, algo que contribuiu para um melhor tratamento da doença e prevenção de complicações cardiovasculares. A HbA1C foi o primeiro exemplo *in vivo* de glicação não enzimática das proteínas a ser descoberto (22). Esta reacção de *Maillard* foi identificada pela primeira vez em 1912 e resulta da combinação da glucose com grupos amina livres para formar inicialmente uma base de *Schiff* e posteriormente um produto de *Amadori* (23).

A formação de AGEs é predominantemente endógena, mas estes produtos podem ser introduzidos no organismo por fontes exógenas, como sendo, o fumo e a alimentação (21,24). Vários estudos têm demonstrado que a alimentação é uma importante fonte exógena de AGEs extremamente reactivos. O processamento e aquecimento dos alimentos promove a formação de produtos de glicoxidação e lipoxidação. Nos últimos anos, os fabricantes da indústria alimentar têm produzido alimentos com AGEs sintéticos incorporados com o objectivo de intensificar o sabor natural dos alimentos. Este facto tornou a dieta ocidental muito rica em AGEs (21). Cerca de 10% dos AGEs ingeridos são absorvidos com os alimentos e existe uma aparente correlação directa entre a ingestão de AGEs e os seus níveis plasmáticos. Da fracção absorvida, cerca de dois terços são retidos no organismo (23) e apenas um terço é excretado pela urina, dentro de 48 horas, em indivíduos com função renal normal (25). Os diabéticos têm níveis mais elevados de AGEs do que indivíduos sem diabetes porque a presença de hiperglicémia e de *stress*

oxidante contribuem para a acumulação dos AGEs no organismo. Alguns estudos têm demonstrado um aumento de 20-30% dos níveis plasmáticos de AGEs em diabéticos sem complicações e de 40-100% em diabéticos com doença arterial coronária ou microalbuminúria (26,27). Alguns estudos têm demonstrado que existe uma importante relação entre uma elevada ingestão de AGEs de origem alimentar e o desenvolvimento e/ou progressão da diabetes (28). A restrição alimentar de AGEs tem vindo a ser associada com uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos de marcadores da doença vascular, bem como, de mediadores da inflamação (29-31). Este tipo de evidência sustenta a ideia de que seguir um plano alimentar com um teor AGEs reduzido é cada vez mais importante e prioritário no tratamento da diabetes.

Os AGEs promovem a lesão vascular e aceleram a progressão da placa de aterosclerótica por dois mecanismos principais: 1) Alteração das propriedades funcionais das proteínas da matriz extracelular da parede dos vasos, o que origina disfunção e 2) activação do *receptor for advanced glycation end-products* (RAGE) que se liga a proteínas e lípidos circulantes modificados e a consequente formação de citocinas inflamatórias e factores de crescimento (18,32). Na diabetes a hiperglicémia crónica afecta principalmente as células endoteliais dos capilares da retina, as células mesangiais do glomérulo renal, os neurónios e as células de *Schwann* nos nervos periféricos (33). As características destas células impedem a regulação do transporte da glicose para o meio intracelular, ficando estas sujeitas às oscilações de glicose no plasma e especialmente aos chamados picos glicémicos após uma refeição.

A retinopatia diabética é a principal causa da deterioração da visão e da cegueira nos adultos (34) sendo clinicamente diagnosticada a partir do desenvolvimento de sinais oftalmoscópicos, como microaneurismas, hemorragias e manchas características que afectam a retina (35). Os AGEs podem ser detectados em grandes quantidades nos vasos sanguíneos da retina (36) e de acordo com o conhecimento actual pensa-se que contribuem para o aumento do espessamento da membrana basal, perda de pericitos e aumento da permeabilidade das células endoteliais, resultando na oclusão vascular (37). O aumento da espessura dos vasos, a coagulação, a oclusão, a isquemia, e a indução de factores de crescimento resultam na angiogénese e na vascularização (38).

A macroangiopatia na diabetes consiste numa forma acelerada de aterosclerose que afecta as artérias coronária, carótida e periférica. A disfunção endotelial desempenha uma função muito importante no aparecimento e progressão da aterosclerose (39). O aumento da oxidação de ácidos gordos livres provenientes dos adipócitos como resultado da mecanismo de resistência à insulina (Fig. 1) ou pela presença de hipoinsulinémia favorece a produção excessiva de *Reactive oxygen species* (ROS) e consequentemente activa os mecanismos bioquímicos responsáveis pelas alterações fisiopatológicas da diabetes: via dos polióis, via da hexosamina, via de formação dos AGEs e via da proteína

cinase C (16,33,40). Os efeitos da acção dos AGEs na doença vascular e na diabetes têm vindo a ser comprovados por diversos estudos *in vitro* e *in vivo* (18). Um desses efeitos é a disfunção mecânica provocada por ligações cruzadas dos AGEs entre as macromoléculas das paredes dos vasos (41). Outra forma da acumulação dos AGEs promoverem a aterosclerose é causando a adesão das células em circulação à parede dos vasos. A função celular pode ainda ser alterada por ligação dos AGEs a vários receptores que estão presentes em diversos tipos de células, como sendo, os macrófagos, células endoteliais, células dos músculo liso, células renais e neurónios (42,43). A formação excessiva de AGEs pode acelerar o processo da aterosclerose por dois tipos de mecanismos classificados como sendo mediados pelos RAGE e os não dependentes de receptores (41). Do primeiro grupo fazem parte os efeitos dos AGEs nos fagócitos mononucleares, nas células dos músculo liso e nas endoteliais. Já os efeitos dos AGEs ao nível da matriz extracelular e na modificação das lipoproteínas não dependem da acção dos RAGE (41).

Tem vindo a ser investigada uma grande quantidade de compostos que inibem a acção dos AGEs no organismo (20). Um dos mais conhecidos é a aminoguanidina, uma hidrazina que previne a formação de AGEs reagindo essencialmente com derivados de produtos iniciais da glicação que não estão ligados a proteínas (44). A piridoxamina (forma natural da vitamina B<sub>6</sub>) é efectiva na inibição dos AGEs a três diferentes níveis (45,46). Tem vindo a ser demonstrado que a piridoxamina diminui a hiperlipidémia e previne a formação de AGEs (47,48). A benfotiamina é um derivado da tiamina lipossolúvel que inibe a formação da via dos AGEs (49,50). A acção dos AGEs no processo de aterogénese e no aparecimento da angiopatia na diabetes pode ser prevenida por uma dieta alimentar adequada já que a alimentação é uma importante fonte de AGEs (25). Alimentos ricos em proteína e gordura, como sendo, o queijo, carne e ovos são excelentes fontes de AGEs, no entanto os alimentos ricos em hidratos de carbono são os que apresentam o menor teor deste tipo de compostos (51). O tempo, temperatura e o tipo de confecção culinária também influenciam a quantidade de AGEs existentes nos alimentos. Fritar e grelhar os alimentos a temperatura elevadas e por longos períodos de tempo favorece a formação de AGEs (51). Uma alimentação rica em AGEs aumenta proporcionalmente as concentrações séricas destes compostos (25). Contrariamente, foi demonstrado que uma dieta com restrição de AGEs leva a uma redução em 30-40% nos níveis séricos de AGEs em indivíduos saudáveis (51).

### 1.1.4. O stress oxidante e a angiopatia

O *stress oxidante* pode ser definido como um estado de desequilíbrio entre os factores que geram ROS e os factores que protegem as macromoléculas celulares da acção dos ROS (ex. antioxidantes, catalase, glutathione peroxidase). O *stress oxidante* tem sido associado com a diabetes e as suas complicações angiopáticas. Algumas das consequências da presença de

um ambiente oxidativo são a insulino-resistência, a disfunção das células  $\beta$ , uma diminuição da tolerância à glucose e a disfunção mitocondrial. Dados experimentais e clínicos sugerem que existe uma associação inversa entre a sensibilidade à insulina e os níveis de ROS (52). Os factores que estão na origem dos ROS surgem enquanto produtos da fisiologia celular normal, bem como, de diversas fontes exógenas (53). A diabetes induz a formação de ROS por diferentes vias patogénicas. As moléculas dos ROS incluem vários derivados do oxigénio e do azoto como o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), peróxido ( $H_2O_2$ ) e peróxinitrito ( $ONOO^-$ ), que são altamente reactivos e podem danificar a estrutura das proteínas, ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA). No entanto a sua actividade é habitualmente inibida pela acção de antioxidantes que actuam para manter a estabilidade do meio intracelular (54). Diversas evidências têm indicado que a activação e a disfunção endoteliais são os principais eventos iniciais da aterosclerose (55). A diminuição da função endotelial resulta da perda da actividade e da degradação do óxido nítrico disponível, seguido da expressão de moléculas de adesão e de receptores para as moléculas lipídicas oxidadas. A expressão dos receptores à superfície das células endoteliais induz a resposta inflamatória, bem como, a acumulação de lípidos na camada íntima (56). Posteriormente, o excesso de partículas de LDL oxidadas que existam em circulação são ingeridas por monócitos e macrófagos, resultando numa citocina inflamatória e sendo libertado o factor de crescimento que perpétua este ciclo vicioso da inflamação, deposição lipídica e crescimento (57). Todo este processo termina com a formação da placa aterosclerótica. Esta placa está coberta por uma camada fibrosa em que a sua espessura depende do equilíbrio entre a formação do colagénio e a degradação enzimática. Aterogénese é o processo que envolve a disfunção endotelial, seguido da activação, lesão e inflamação, terminando na migração de células de músculo liso e proliferação. A hiperglicémia está associada a todos estes eventos adversos que podem ocorrer na aterogénese e o seu efeito é essencialmente mediado no organismo pelo equilíbrio entre o *stress* oxidante e factores com propriedades antioxidantes (54). O excesso de produção de ROS no nosso organismo resulta na presença de *stress* oxidante. Uma etapa importante da degradação das membranas celulares é a lipoperoxidação que consiste na reacção dos ROS com as ligações duplas dos ácidos gordos polinsaturados (AGP), produzindo hidroperóxidos lipídicos (58). A peroxidação lipídica é uma via de formação de ROS que após o seu início resulta na deterioração oxidativa dos AGP. Os principais alvos da acção dos AGP oxidados são os compostos das membranas biológicas. A peroxidação lipídica é um processo degenerativo da membrana dos lípidos insaturados em condições de *stress* oxidante que origina a destruição da sua estrutura e que pode levar à morte celular por apoptose (59,60). A lipoperoxidação induz diversas alterações da função celular (ex. alterações da permeabilidade, selectividade e DNA, oxidação das LDL) e tem vindo a ser relacionada com a genotoxicidade e a carcinogénese (61). Os AGP têm um grande número de ligações duplas na sua cadeia, o que facilita a remoção de átomos de hidrogénio e os torna mais susceptíveis à peroxidação (62). No

## Introdução

organismo a lipoperoxidação pode ocorrer de acordo com três tipos de mecanismos: (1) enzimático com a oxidação dos AGP mediada por enzimas (ex. peroxidases e dioxigenases); (2) não enzimático, com a oxidação mediada por ROS; (3) não enzimática e não mediada por ROS (ex. oxigénio singlete) (63).

O processo da lipoperoxidação não enzimática com oxidação mediada por ROS pode ser dividido em três etapas essenciais: iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação o AGP sofre um ataque de uma espécie que é suficientemente reactiva para captar um átomo de hidrogénio a partir de um grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-), formando um radical de carbono. O hidrogénio é um electrão simples e a sua remoção deixa a cadeia dos AGP com um electrão desemparelhado no átomo de carbono (62). Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (64). Em meio aeróbio, o radical alquilo inicialmente formado combina-se com o oxigénio originando o radical peroxilo, o qual pode captar um hidrogénio alílico de um outro ácido gordo, formando assim, outro radical de carbono e promovendo a etapa de propagação (65). A reacção do radical peroxilo com o átomo de hidrogénio captado leva à formação de um hidroperóxido lipídico (LOOH) e de um novo radical lídico (65). A última etapa da reacção é a fase de terminação, em que o hidroperóxido lipídico devido à sua instabilidade, é fragmentado dando origem a vários subprodutos (64). É extremamente complicado medir a concentração de ROS no organismo, pelo que, para avaliar o grau de *stress* oxidante é necessário quantificar componentes celulares que reagem com os ROS (ex. proteínas, DNA ou lípidos). Os peróxidos lipídicos são compostos muito instáveis e tendem a degradar-se rapidamente levando à formação de diversos produtos secundários. O malondialdeído (MAD) é um dos produtos secundários mais conhecidos da peroxidação lipídica e pode ser utilizado como indicador da lesão oxidativa nas células e nos tecidos. Este composto é reactivo em relação aos grupos amina das proteínas e dos ácidos nucleicos (66), demonstrando ter efeitos mutagénicos e citotóxicos (67) e participar no processo de formação da placa aterosclerótica (68). Diversos estudos têm evidenciado a elevação dos níveis plasmáticos de MAD em diversas doenças, e desde então, tem sido associado à lesão oxidativa e amplamente utilizado como índice de peroxidação lipídica (69). Outra forma de medir o efeito do *stress* oxidante é através de modificações nas proteínas e no DNA, mas estes dois marcadores podem muitas vezes ser formados por outras vias que não a dos ROS (70).

### 1.1.5. Haptoglobina e complicações vasculares na diabetes

A Haptoglobina (Hp) é uma glicoproteína do plasma com propriedades antioxidantes e imunomoduladoras. Em seres humanos, o locus Hp localiza-se no braço longo do cromossoma 16 (16q22) e é polimórfico, com dois alelos principais (HP1 e HP2), resultando em três genótipos/fenótipos distintos (Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2) (71). A massa molecular dos diferentes tipos de Hp é bem distinto: a proteína Hp 1-1 é a molécula mais pequena (86 kDa), Hp 2-1

possui uma massa molecular intermédia (86-300 kDa) e Hp 2-2 apresenta a maior massa molecular (170-900 kDa) (72). A síntese da Hp é realizada principalmente nos hepatócitos, embora também tenha sido descrita em cultura de adipócitos e no tecido cerebral, sendo induzida em resposta à secreção de algumas citocinas (73,74). A Hp tem alta afinidade para hemoglobina (Hb) livre, ligando-se à Hb de forma irreversível e exercendo assim uma importante acção antioxidante mediante o potencial oxidativo de Hb livre (72,73,75). A depuração do complexo Hp-Hb é realizada por meio da ligação com o receptor CD163 presente nos monócitos e macrófagos (76,77). O ferro é libertado pela acção da heme oxigenase, armazenado na forma de ferritina e transportado pela transferrina para a medula óssea para ser reutilizado na síntese de Hb. Entretanto, a Hp não é reciclada e o seu nível no plasma só se recupera após 5 a 7 dias (77). A concentração sérica de Hp é influenciada pela idade, aumentando gradualmente até à idade adulta, sendo as concentrações habituais 30-200 mg/dL por dos vinte anos. A Hp é também considerada uma proteína de fase aguda positiva, com propriedades imunomoduladoras que podem ser inibitórias ou estimulatórias da resposta imune. Esta proteína está aumentada nos processos inflamatórios, infecciosos e tumorais (78-80). Os diferentes fenótipos da Hp possuem propriedades bioquímicas e biofísicas distintas, e esse polimorfismo tem sido associado à susceptibilidade e progressão de diversas doenças crónicas (73,75,80). A capacidade da Hp em reduzir os danos causados pelos radicais livres é fenótipo-dependente (74). Alguns estudos experimentais demonstraram que há uma diferença funcional entre a capacidade antioxidante da Hp purificada produzida pelos diferentes alelos. A proteína Hp 1-1 mostrou conferir, *in vitro*, uma protecção maior contra danos oxidativos que a proteína Hp 2-2 (81). No entanto, outros estudos demonstraram que a afinidade de ligação com a Hb é igual para os três principais fenótipos da Hp (82,83). Assim, a diferença entre Hp 1-1 e Hp 2-2 em inibir a oxidação pode ser resultado das diferenças na habilidade dos diferentes tipos de Hp em prevenir a libertação do grupo heme, devido às diferenças de tamanho entre os tipos de Hp. A proteína Hp 2-2 apresenta uma remoção mais lenta do ferro para o espaço extravascular por ser uma molécula mais complexa, permanecendo a Hb livre mais tempo no espaço intravascular, o que favorece o *stress* oxidante (83). A análise do polimorfismo da Hp em 49 indivíduos Portugueses jovens e saudáveis demonstrou que existia uma associação do genótipo Hp 2-2 com o aumento da susceptibilidade à lesão oxidativa numa idade mais precoce e conseqüentemente maior risco de aterosclerose na vida adulta (84). Os estudos de associação entre a Hp e as cardiopatias têm demonstrado que o fenótipo Hp 2-2 está associado ao aumento do risco de doenças cardíacas (85). A lesão provocada após um EAM é muito superior em indivíduos com fenótipo Hp 2-2, em relação aos indivíduos que apresentam outros fenótipos, sugerindo que este fenótipo é um factor de risco genético para a aterosclerose coronária, independentemente da exposição aos outros factores de risco para essa patologia (74,86). O fenótipo Hp 2-2 confere menor protecção ao *stress* oxidante nas artérias de pacientes portadores de placas

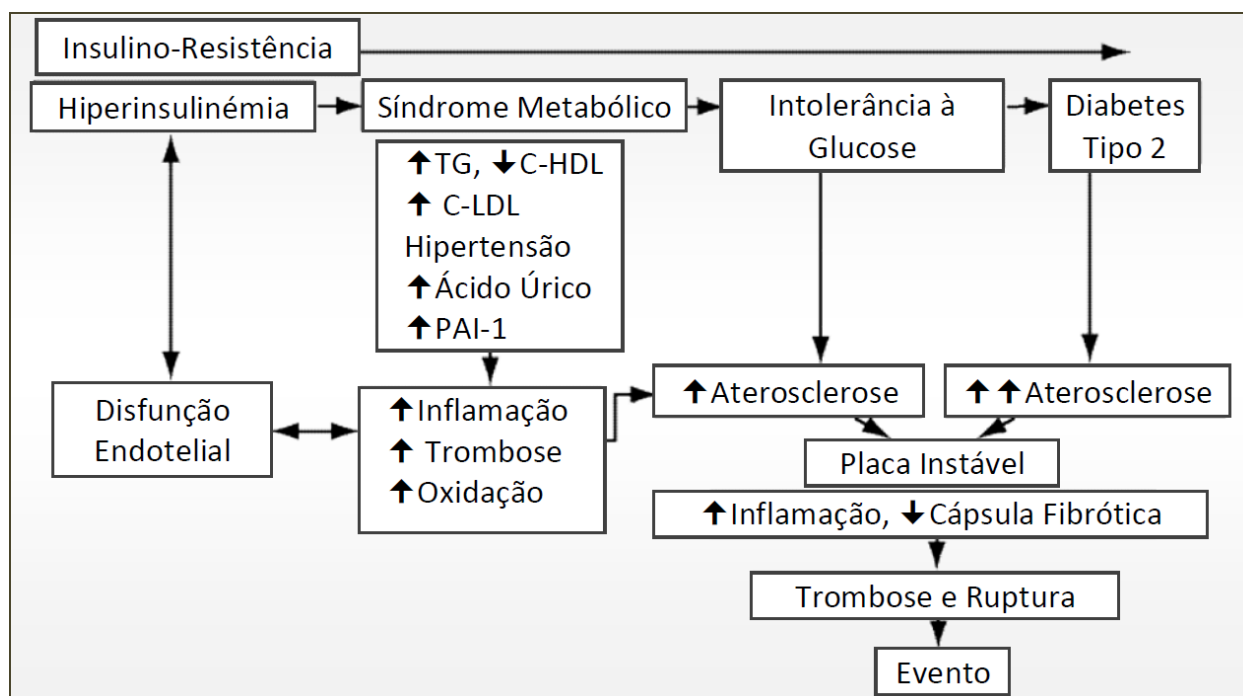
ateroscleróticas, sugerindo também ser um factor de risco para o desenvolvimento da hipertensão refractária (87). Os estudos das propriedades antioxidantes da Hp em pacientes com diabetes *mellitus* concluíram que diabéticos com fenótipo Hp 1-1 possuíam maior protecção contra o *stress* oxidante e menor risco de desenvolver DCV, quando comparados com os diabéticos com fenótipos Hp 1-2 e Hp 2-2 (88-94). No entanto, os resultados dos diversos estudos que têm sido realizados em diabéticos não são consensuais, parecendo depender da população estudada e dos aspectos analisados.

### *1.1.6. A doença cardiovascular e a diabetes*

A doença arterial aterosclerótica pode manifestar-se clinicamente como doença cardiovascular (DCV). Diversos estudos epidemiológicos e patológicos têm evidenciado que a diabetes é um factor de risco independente da DCV (95). A DCV é a principal causa de morte nos diabéticos, sendo responsável por 50% da mortalidade nestes doentes (96). Em média, um diabético do tipo 2 morrerá 5 a 10 anos mais cedo do que uma pessoa sem diabetes e a maior parte desta mortalidade é provocada por DCV (97). Um diabético do tipo 2 tem um risco 2 vezes superior de ter um EAM ou AVC do que a população não diabética. No entanto, a probabilidade de um diabético ter um segundo EAM é idêntica à de um não diabético. O AVC ocorre com uma frequência duas vezes superior em diabéticos hipertensos quando comparado com não diabéticos com hipertensão. Os doentes diabéticos tem um risco 2 a 4 vezes superior de desenvolver aterosclerose do que os não diabéticos. Na Europa, os custos de saúde com o tratamento de DCV são extremamente elevados e estima-se que cerca de 10-12% das despesas totais com cuidados de saúde sejam atribuídos ao tratamento de diabéticos (98). Em Portugal, 28% dos internamentos por AVC ocorrem em pessoas com diabetes, tendo a sua importância relativa aumentado 5,5% nos últimos 10 anos. No entanto, a mortalidade das pessoas com diabetes e AVC é inferior à registada globalmente para o AVC. Para o mesmo período de tempo, 31% dos internamentos por EAM ocorrem em pessoas diabéticas, tendo a sua importância relativa aumentado 6% nos últimos 10 anos. No que se refere à mortalidade, esta é superior nos diabéticos com EAM do que na população não diabética com EAM. É ainda importante referir que na última década a taxa de letalidade intra-hospitalar por EAM na população com diabetes diminuiu 58% (10). Os factores de risco clássicos da DCV, como sendo, a hiperglicémia, hipertensão tabagismo, obesidade, sedentarismo e a presença de antecedentes familiares, contribuem de uma forma idêntica para o aparecimento de DCV em diabéticos e não diabéticos (99). A prevalência destes factores de risco nos diabéticos é elevada mas não permite explicar o aumento do risco DCV nestes doentes quando comparado com a população em geral. Os factores de risco específicos da diabetes poderão explicar o aumento do risco cardiovascular em diabéticos (95).

O início das complicações macrovasculares na diabetes surgem antes da própria doença se manifestar clinicamente. Diversos estudos têm confirmado que existe um aumento do risco

DCV em indivíduos com intolerância à glucose (100). A insulino-resistência poderá explicar o aumento do risco de DCV em diabéticos com intolerância à glucose, isto porque está associada com a hiperglicémia/hiperlipidémia pós-prandial. Nos diabéticos do tipo 2 existe um aumento significativo no risco de morte por DCV e de ocorrência de eventos cardiovasculares quando os níveis de hemoglobina glicosilada são superiores a 7% (101). Existe um número elevado de factores de risco associados com a insulino-resistência. De entre eles estão, a hipertensão arterial, hiperinsulinémia, diminuição dos níveis de colesterol das lipoproteínas de elevada densidade plasmática (C-HDL), elevação dos níveis de triglicéridos, aumento dos níveis de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade plasmática (C-LDL), disfunção endotelial, microalbuminúria, aumento da viscosidade do sangue, entre outros. A associação entre a insulino-resistência, diabetes tipo 2 e a DCV está representada na Fig. 3. A insulino-resistência, hiperinsulinémia e a disfunção endotelial estão presentes antes de existirem manifestações clínicas da diabetes do tipo 2 (102). Estes três distúrbios induzem a múltiplas alterações metabólicas, levando ao aparecimento do síndrome metabólico que é caracterizado por um conjunto de factores de risco cardiovascular, usualmente, relacionados com a deposição central de gordura e a insulino-resistência. Esta patologia crónica foi descrita pela primeira vez em 1988, por Reaven *et al.* (103) como a presença simultânea de vários factores de risco cardiovascular, como aumento dos níveis de triglicéridos, C-LDL, ácido úrico, baixas concentrações de C-HDL e a presença de hipertensão. A resistência à insulina é definida como a diminuição da acção da insulina endógena nos tecidos alvo, especialmente, nos músculos e no tecido adiposo (104). Com o desenvolvimento da insulino-resistência, ocorre uma hiperinsulinémia compensatória, e posteriormente uma deficiência na secreção de insulina, em função da exaustão da capacidade secretora das células  $\beta$ . Em consequência surgem as glicémias elevadas no período pós-prandial, posteriormente a hiperglicémia de jejum e por fim a diabetes *mellitus* (105). Alguns estudos epidemiológicos têm demonstrado que o tecido adiposo secreta substâncias com funções biológicas importantes a nível local e sistémico e que estão directamente relacionadas com a insulino-resistência (106). Actualmente sabe-se que o tecido adiposo é um órgão endócrino complexo e com elevada actividade metabólica (107). Os adipócitos expressam e secretam várias hormonas endócrinas conhecida por adipocinas como sendo a leptina, resistina, IL-6, TNF- $\alpha$  e a adiponectina (108). A obesidade aumenta a produção da maior parte das adipocitocinas, sendo que, o impacto desse aumento afecta diversas funções relacionadas com a DCV como o apetite, balanço energético, imunidade, insulino-resistência, angiogénese, pressão arterial, metabolismo dos lípidos e a homeostase. Adiponectina é a única adipocitocina que é produzida em menor quantidade com o aumento do tecido adiposo e que actua aumentando a sensibilidade à insulina (106). A hiperinsulinémia estimula e é estimulada pela disfunção endotelial que induz a aterosclerose e que poderá evoluir no sentido da ocorrência de um evento cardiovascular (105).



**Figura 3. Associação entre a insulino-resistência, diabetes do tipo 2 e DCV.** C-HDL, colesterol lipoproteína de elevada densidade plasmática; PAI-I, peptídeo inibidor do activador do plasminogénio; C-LDL, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade plasmática; TG, triglicéridos. [adaptado de (109)].

Diversos estudos têm avaliado o impacto da diabetes na probabilidade de ocorrência de um evento cardiovascular. O *Nurses Health Study*, foi realizado em 117 mil mulheres (com e sem diabetes) por um período de 20 anos (110). As mulheres que durante o estudo desenvolveram diabetes apresentaram um risco relativo superior para a ocorrência de um EAM ou AVC. As mulheres que no início do estudo não tinham diagnóstico de diabetes, o seu risco relativo inicial foi de 2,82 e depois do diagnóstico de diabetes passou a ser 3,71. Para as mulheres que no início do estudo já tinham um diagnóstico de diabetes, o risco relativo foi de 5,02. Estes resultados indicam que existiu um aumento significativo na probabilidade de ocorrência de um evento cardiovascular antes de ser estabelecido o diagnóstico da diabetes do tipo 2 (110). O estudo de intervenção *Multiple risk factor* foi realizado em 348 mil homens durante um período médio de 12 anos, com o objectivo de avaliar o efeito da diabetes no risco de morte por DCV (111). Os resultados indicaram que a elevação dos níveis de colesterol total, a hipertensão e/ou tabagismo aumentam o risco de morte por DCV em diabéticos e não diabéticos. A taxa de mortalidade foi duas vezes superior nos diabéticos que tinham um factor de risco cardiovascular do que em não diabéticos sem factores de risco. Foi também 3 vezes superior nos diabéticos com 2 factores de risco e 4 vezes superiores nos diabéticos com os 3 factores de risco (111). Em ambos os estudos foi evidenciado o impacto da diabetes no aumento do risco cardiovascular, especialmente na presença de outros factores de risco para a DCV.

### *1.1.7. Avaliação do estado nutricional na diabetes*

O estado nutricional é uma medida da condição de saúde de um indivíduo como resultado da satisfação das necessidades fisiológicas de nutrientes para manter a composição e funções adequadas do organismo (112). As alterações do estado nutricional contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade, sendo o sobrepeso e a obesidade factores de risco de diversas doenças crónicas não transmissíveis, como as DCV e a DMT2 (113).

A avaliação nutricional deve ser feita recorrendo a diversos métodos: clínicos, alimentares, antropométricos e bioquímicos. Um método isolado não pode ser usado como indicador confiável da condição nutricional geral de um indivíduo, sendo necessário associar vários indicadores do estado nutricional para aumentar a precisão da avaliação (114). A avaliação clínica consiste no reconhecimento de sintomas e sinais clínicos de alteração do estado nutricional e é de grande importância por ser prática, simples e económica. Este tipo de avaliação permite observar manifestações que podem estar relacionadas com uma possível alimentação inadequada, evidenciando-se por meio de alterações de tecidos orgânicos, órgãos externos como a pele, mucosas, cabelos e os olhos (115). Quando a carência está na fase inicial é difícil a sua interpretação, o que torna a avaliação clínica limitada e impossibilita a sua utilização como único meio de diagnóstico precoce da desnutrição (116). A avaliação do consumo alimentar é realizada para conhecer os hábitos alimentares, identificar a ingestão excessiva de alimentos com pobre conteúdo nutricional e avaliar a adequabilidade da ingestão de nutrientes (117). A escolha do método para avaliar o consumo alimentar requer a definição do objectivo específico a alcançar (118). Em estudos epidemiológicos, a escolha do método a utilizar depende de muitos factores. Antes de ser realizada a escolha do instrumento mais apropriado para avaliar o consumo alimentar deverão ser dadas respostas às seguintes questões: (1) Quais as necessidades de obtenção de informação sobre alimentos, nutrientes, outros componentes ou comportamentos alimentares específicos? (2) Para descrever a ingestão será necessário estimar a ingestão média e a sua distribuição? (3) A avaliação da ingestão tem como objectivo conhecer a relação causal entre a dieta e a doença? (4) É necessário conhecer as ingestões relativa e absoluta? (5) Qual o nível de precisão e exactidão requeridos? (6) O estudo deverá ser feito em algum período específico do ano? (7) Quais as limitações do estudo em termos monetários, de tempo e disponibilidade de recursos humanos? (118). A Tabela 1 resume os principais métodos de avaliação do consumo alimentar, respectivas vantagens e desvantagens.

**Tabela 1.** Métodos de avaliação do consumo alimentar [adaptado de (117)].

<b>Avaliação quantitativa de ingestão de nutrientes</b>		
Métodos	Vantagens	Desvantagens
Questionário 24 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rápida aplicação</li> <li>• Não altera a ingestão alimentar</li> <li>• Pode ser utilizado em qualquer faixa etária e em analfabetos</li> <li>• Baixo custo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Depende da memória do entrevistado</li> <li>• Depende da capacidade do entrevistador estabelecer uma boa comunicação e evitar a indução de respostas</li> <li>• Não estima a dieta habitual</li> <li>• Maior erro de estimativa de consumo associado à variação intraindividual</li> </ul>
Diário Alimentar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os alimentos são anotados no momento do consumo</li> <li>• Não depende da memória</li> <li>• Mede o consumo actual</li> <li>• Menor erro quando há orientação detalhada para o registo</li> <li>• Identifica tipos de alimentos e preparações, bem como, horários das refeições</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Consumo pode ser alterado, pois o indivíduo sabe que está a ser avaliado</li> <li>• Requer que o indivíduo saiba ler e escrever</li> <li>• Há dificuldade para estimar as porções</li> <li>• Exige alto nível de motivação e colaboração</li> <li>• Requer tempo</li> <li>• O indivíduo deve conhecer as medidas caseiras</li> </ul>

<b>Avaliação do consumo de alimentos ou grupos alimentares</b>		
Métodos	Vantagens	Desvantagens
Questionário de Frequência Alimentar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estima a ingestão habitual do indivíduo</li> <li>• Não altera o padrão de consumo</li> <li>• Baixo custo</li> <li>• Classifica os indivíduos em categorias de consumo</li> <li>• Diminui as variações do consumo intraindividual</li> <li>• Tem em consideração a variação sazonal</li> <li>• A introdução de dados e a análise do questionário são tarefas relativamente simples quando comparadas a outros métodos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Depende da memória do entrevistado sobre os hábitos alimentares passados e de habilidades cognitivas para estimar o consumo médio num longo período de tempo passado</li> <li>• Desenho do questionário requer esforço e tempo</li> <li>• Dificuldade para a aplicação conforme o número e a complexidade da lista de alimentos</li> <li>• Quantificação pouco exacta</li> <li>• Não estima o consumo absoluto, visto que nem todos os alimentos consumidos pelo indivíduo podem constar na lista</li> </ul>

<b>Avaliação do padrão alimentar</b>		
Métodos	Vantagens	Desvantagens
História Alimentar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminui as variações do consumo intraindividual</li> <li>• Tem em consideração a variação sazonal</li> <li>• Fornece a descrição da ingestão habitual em relação aos aspectos qualitativos e quantitativos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requer entrevistadores treinados</li> <li>• Depende da memória do entrevistado</li> <li>• Tempo de aplicação do método é longo</li> </ul>

A avaliação quantitativa do consumo de nutrientes permite obter informações sobre a ingestão e a posterior comparação dos valores obtidos com as necessidades individuais. Em relação à ingestão, os dados devem reflectir a dieta habitual, uma vez que os efeitos da ingestão inadequada surgem somente após uma exposição prolongada a uma situação de risco alimentar (114). No que diz respeito às necessidades são habitualmente utilizadas estimativas obtidas em estudos populacionais e posteriormente calculada a probabilidade da adequabilidade do consumo alimentar (114). Para a análise da adequação da dieta consumida, deve-se considerar os valores definidos nas DRIs utilizando os procedimentos recomendados pelo *Institute of Medicine* (114). Assim, para quantificar e avaliar correctamente a ingestão de nutrientes, os instrumentos mais adequados são os que permitem obter informação detalhada dos alimentos consumidos e das quantidades ingeridas (117). O questionário de frequência alimentar (QFA) é actualmente o método mais utilizado na avaliação dos hábitos alimentares em estudos epidemiológicos. É considerado o método mais prático e informativo para avaliar a causalidade entre o consumo alimentar e a doença (119). A estrutura do QFA é habitualmente composta por uma lista de alimentos predefinida e uma secção com a frequência de consumo. Alguns QFA são semi-quantitativos, isto é, definem uma porção média de referência consumida, para que o indivíduo relate se o seu consumo foi superior, igual ou inferior do que a porção média apresentada em medidas caseiras (115).

A avaliação do estado nutricional pelo método antropométrico baseia-se na medida das dimensões corporais (116). As medidas antropométricas mais utilizadas na avaliação do estado nutricional são: peso, altura, circunferências (braço e cintura), comprimento do braço e pregas cutâneas (tríceps, bíceps, subescapular, suprailíaca). Através da combinação destas medidas é possível calcular as relações entre peso e altura, bem como, entre a circunferência muscular do braço e o índice de gordura do braço (119). O IMC é actualmente um dos indicadores antropométricos mais utilizados na avaliação do estado nutricional de populações, com o objectivo de estudar a associação da obesidade com outras doenças, especialmente as cardiovasculares (120). No entanto várias limitações têm sido apresentadas em relação à sua utilização, entre elas, a incapacidade para estimar a composição corporal e a distribuição da gordura corporal (GC) (121). A baixa sensibilidade do IMC em detectar indivíduos com excesso de GC foi comprovada num estudo em que os indivíduos foram avaliados por bioimpedância. Cerca de 61% das mulheres e 23,6% dos homens com IMC <30 kg/m<sup>2</sup> tinham uma percentagem de GC superior a 30% e a 25%, respectivamente (122). Outros parâmetros antropométricos, como circunferência da cintura, relação cintura-anca e medida de dobras cutâneas, parecem ser mais sensíveis que o IMC na identificação de indivíduos com excesso de GC e alterações metabólicas. A circunferência da cintura permite avaliar a distribuição central da GC. Actualmente, esta medida tem vindo a ser associada com o risco cardiometabólico por estar fortemente relacionada com gordura visceral que é a principal responsável pelo aparecimento de alterações metabólicas e de doenças cardiovasculares

(123). As medidas antropométricas têm também sido utilizadas em equações para estimar a GC em adultos. Deurenberg *et al.* (124), desenvolveram equações baseadas no IMC, na idade e no género, utilizando a pesagem hidrostática como método de referência. Gallagher *et al.* (125), também desenvolveram fórmulas para estimar a GC pelo IMC e outras variáveis como idade, género e etnia, utilizando o *Dual energy X-ray absorptiometry* (DEXA) e o modelo de quatro compartimentos como métodos de referência. As medidas das pregas cutâneas têm sido amplamente utilizadas na determinação da GC por serem de simples utilização e de baixo custo operacional. Na literatura, são documentadas mais de 100 equações para estimar a GC que utilizam as medidas de pregas cutâneas (126). Antigamente, a hidrodensitometria era o método mais utilizado como referência para validação das equações envolvendo medidas de pregas cutâneas (127,128). Entretanto, nos últimos anos a sua utilização como método de referência tem sido questionada, e outros métodos como o DEXA e o modelo de quatro compartimentos têm sido utilizados em estudos de validação (129-131). Recentemente, o interesse tem aumentado na aplicação da bioimpedância eléctrica (BIA), por ser um método barato, portátil e seguro na estimativa da composição corporal. A BIA tem considerável potencial, quando usada individualmente ou em combinação com a antropometria. O método BIA é baseado na condução de uma corrente eléctrica indolor, de baixa intensidade, aplicada ao organismo por meio de cabos conectados a eléctrodos ou superfícies condutoras, que são colocados em contacto com a pele. A impedância, dada pelos valores de reactância e resistência, é baixa no tecido magro e elevada no tecido adiposo (132). Os aparelhos disponíveis para este tipo de avaliação fornecem os valores de massa gorda, massa magra e água corporal por meio de equações ajustadas para género, idade, peso, altura, etnia e nível de actividade física (121). Na avaliação do estado nutricional, as determinações bioquímicas são usadas como complemento de outros métodos. No entanto, os exames bioquímicos são as medidas mais objectivas do estado nutricional, sendo utilizados para detectar deficiências subclínicas e para a confirmação de um diagnóstico. Na prática clínica, são habitualmente utilizadas determinações urinárias (ex. creatinina, hidroxiprolina e 3-metilhistidina) e plasmáticas de parâmetros hematológicos, aminoácidos, transferrina, albumina, minerais e vitaminas (115). Estudos clínicos e populacionais têm confirmado a utilidade de alguns desses indicadores bioquímicos e identificado as limitações de outros na sua utilização como biomarcadores da ingestão alimentar (133,134).

### 1.1.8. A alimentação e a diabetes

A obesidade e o sedentarismo estão directamente relacionados com a incidência de DMT2 e do síndrome metabólico (135). Alguns estudos têm demonstrados que pessoas que têm uma dieta rica em cereais integrais (136) e ácidos gordos polinsaturados (137), associada a um baixo consumo de ácidos gordos *trans* (138) e de alimentos com elevado índice glicémico (139), têm um menor risco de desenvolver diabetes *mellitus*. O sedentarismo e a alimentação são os

principais factores de risco modificáveis para o desenvolvimento da obesidade, estando directamente relacionados com o aumento da incidência da DMT2, independentemente do IMC ou da presença de antecedentes familiares para a diabetes *mellitus* (140). Os resultados de diversos estudos têm evidenciado os benefícios das intervenções alimentares na progressão da intolerância à glucose para a diabetes *mellitus*. Em 2001, Tuomilehto *et al.* (141) realizaram um ensaio clínico aleatório controlado em 522 adultos com intolerância à glucose com uma duração média de 3,2 anos. No início do estudo, a população foi dividida em dois grupos: intervenção (n = 265) e controlo (n = 257). Os indivíduos do grupo de intervenção receberam aconselhamento individual detalhado, escrito e oral para atingir os objectivos de reduzir o peso corporal em pelo menos 5%, ter um consumo de lípidos inferior a 30% e de ácidos gordos saturados menor que 10% do valor energético total, aumentar o consumo de fibras (pelo menos 15 g a cada mil calorias ingeridas) e praticar exercício físico (pelo menos 30 min/dia). Já os participantes que constituíram o grupo controlo receberam apenas orientação oral e escrita sobre alimentação saudável e actividade física, no início do estudo e a cada consulta anual. Cada indivíduo do grupo de intervenção realizou 7 consultas com o nutricionista no primeiro ano, e uma consulta a cada três meses nos anos seguintes. Os resultados obtidos no grupo de intervenção, demonstraram que o risco de DMT2 foi reduzido em 58%, em relação ao grupo de controlo e que nenhum dos participantes que atingiu os 5 objectivos definidos no estudo desenvolveu diabetes. Um terço dos indivíduos do grupo de intervenção que não conseguiram alcançar qualquer um dos objectivos desenvolveu diabetes. Os resultados apresentados por estes autores permitiram concluir que a adopção de um estilo de vida saudável poderá reduzir o risco de desenvolver diabetes (141).

A prevenção da DCV nos diabéticos do tipo 2 tem como objectivo principal controlar os factores de risco modificáveis por alteração do estilo de vida. Habitualmente os programas de intervenção do estilo de vida nos diabéticos do tipo 2 são essencialmente focados na perda de peso, no entanto os especialistas na área acreditam que os principais objectivos neste tipo de programas deveriam ser a melhoria do controlo glicémico e a diminuição de outros factores de risco cardiovascular (142). A educação alimentar e a actividade física regular combinados com reavaliações regulares dos programas de intervenção alimentar e comportamental implementados parece ser a abordagem mais correcta para verificar a melhoria dos resultados a longo prazo (143-145). Diversos estudos têm sido realizados com o objectivo de identificar a combinação perfeita de macronutrientes que permita prevenir o aparecimento de DCV, no entanto a melhor combinação de proteínas, hidratos de carbono e lípidos varia consoante o indivíduo, facto que impossibilita a definição de um plano alimentar universal para este tipo de doentes (146-148). A implementação de dietas com grande restrição de hidratos de carbono (ingestão <130 g/dia) não são recomendadas em diabéticos do tipo 2 (142,149), isto porque, estão altamente associadas à diminuição da ingestão de frutos e hortícolas que são excelentes fontes de alimentares de vitaminas, minerais e fibra. A restrição alimentar de gordura saturada,

## Introdução

colesterol e ácidos gordos *trans*, bem como, o aumento do consumo de fibra e de ácidos mono- e polinsaturados são estratégias recomendadas para melhorar o perfil lipídico nos doentes com DMT2 (143,150,151). Nas directrizes da *American Diabetes Association* (ADA), estão disponíveis recomendações dietéticas de carácter geral para a prevenção de DCV (150). Na presença de insuficiência cardíaca sintomática ou para a redução da pressão arterial, é recomendada uma dieta rica em frutas, hortícolas, grãos integrais, nozes e produtos lácteos com baixo teor de gordura, bem como, a restrição de sódio. Além disso, a redução do peso está indicada para aqueles com adiposidade corporal excessiva (150,152). A redução da ingestão calórica e do peso corporal é um objectivo importante para os indivíduos obesos com DMT2 por estar associada com a melhoria do controlo glicémico e a redução dos risco cardiovascular (153,154). De acordo com Cernea *et al.* (155) existem duas estratégias de intervenção alimentar que permitem prevenir de forma eficiente a doença arterial coronária. A primeira é a modificação da qualidade da gordura consumida através da substituição da gordura saturada e do colesterol alimentares por gorduras monoinsaturadas e polinsaturadas, e em especial o aumento do consumo de ácidos gordos ómega-3. A segunda é a alteração da qualidade dos hidratos de carbono consumidos optando por cereais com elevado teor de fibra e alimentos com baixo índice glicémico em vez de cereais mais refinados com elevado teor de açúcares simples (155). À semelhança de Cernea *et al.* (2003), o estudo clínico de intervenção multicêntrico *Look Action for Health in Diabetes* (156) também sustenta a ideia de que a modificação dos hábitos alimentares nos diabéticos do tipo 2 diminui a probabilidade de ocorrência de um evento cardiovascular por melhoria do controlo glicémico e diminuição de factores de risco cardiovascular. O referido ensaio clínico aleatório controlado foi realizado durante um ano com o objectivo de determinar o efeito da redução do peso corporal a longo prazo sobre o controle glicémico e sobre a incidência de eventos cardiovasculares em pacientes com DMT2. Os 2570 pacientes submetidos à intervenção (modificação dos hábitos alimentares e aumento da actividade física) apresentaram uma perda de peso média de 8,6%, melhoria do controle glicémico (-21,5 mg/dL) e dos factores de risco cardiovascular, tais como, pressão arterial sistólica (-6,8 mmHg), hemoglobina glicosilada (-0,64%), triglicéridos (-30,3 mg/dL) e C-HDL (3,4 mg/dL) (156).

As vitaminas e minerais são micronutrientes que estão presentes numa grande variedade de alimentos. Estes compostos desempenham uma função essencial no metabolismo e na manutenção das funções bioquímicas do organismo (157). Embora sejam necessários em pequenas quantidades, é necessária uma ingestão adequada de micronutrientes para que possam exercer funções de cofactores, coenzimas ou antioxidantes (158). Os micronutrientes não estão directamente envolvidos no controlo da glicémia, mas alimentos que são boas fontes alimentares de vitaminas e minerais são também ricos em hidratos de carbono (150). Uma ingestão elevada de frutos por refeição está relacionada com picos de hiperglicémia que devem ser evitados na prevenção primária e secundária da DMT2. Embora o tipo de fruto possa

influenciar a elevação da glicémia plasmática, a quantidade total ingerida é o factor que mais contribui para a presença de hiperglicémia (159). Deste modo, na prescrição de um plano alimentar em diabéticos tipo 2 será necessário que os alimentos ricos em vitaminas e minerais sejam distribuídos ao longo do dia para facilitar o controlo glicémico e em simultâneo fornecer ao organismo os nutrientes necessários para o seu adequado funcionamento (160).

Os alimentos contêm compostos oxidantes, os quais podem ocorrer naturalmente ou ser introduzidos durante o processamento e actuar a diferentes níveis na protecção do organismo (161). Os antioxidantes são compostos ou sistemas que impedem a autooxidação inibindo a formação de radicais livres ou interrompendo a propagação desses radicais através de vários mecanismos: (1) eliminação de espécies que iniciam a peroxidação; (2) quelatando iões metálicos ou decompondo peróxidos lipídicos; (3) capturando o  $O_2$  e prevenindo a formação de peróxidos; (4) quebrando as reacções oxidativas em cadeia; (5) activando enzimas antioxidantes ou inibindo enzimas que promovem a formação de radicais livres; (6) prevenindo a modificação de proteínas ou (7) evitando a lesão do DNA (162,163). Os antioxidantes provenientes dos alimentos são extremamente importantes, já que complementam os efeitos protectores dos antioxidantes endógenos. Os frutos e hortícolas são uma excelente fonte alimentar de antioxidantes, no entanto as ervas aromáticas e as especiarias são a principal fonte exógena de antioxidantes (164). Nos alimentos existe grande variedade de substâncias que podem actuar sinergicamente na protecção das células e tecidos (165). O efeito conjunto das vitaminas C e E é conhecido (166), evidenciando que a sua interacção é efectiva na inibição da peroxidação lipídica da membrana e na protecção do DNA (167).

A vitamina E é um composto quiral, lipossolúvel e com elevado potencial antioxidante. Na natureza existem oito estereoisómeros da vitamina E ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tocoferóis e  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tocotrienóis), sendo o  $\gamma$ -tocoferol a forma mais abundante nos alimentos e o  $\alpha$ -tocoferol o isómero com maior biodisponibilidade e bioactividade nos humanos. O  $\alpha$ -tocoferol desempenha uma função importante na protecção das membranas celulares de possíveis lesões provocadas por peróxidos lipídicos (168). Para beneficiar dos efeitos protectores do  $\alpha$ -tocoferol é necessário garantir uma ingestão adequada deste composto através da ingestão de boas fontes alimentares de vitamina E, como sendo, óleos vegetais, especialmente o óleo de germen de trigo, cereais, vegetais de folhas verdes, nozes, gema de ovo, gordura do leite, manteiga, frango e outras carnes (169,170). Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado que existe uma associação directa entre a ingestão de vitamina E e a diminuição da morbilidade e mortalidade cardiovascular (171,172), mas é ainda muito limitada a informação disponível sobre o efeito da suplementação com vitamina E na diminuição do *stress* oxidante em diabéticos do tipo 2 (173-175).

A vitamina C é um composto antioxidante, hidrossolúvel que não é armazenado no organismo. Esta vitamina desempenha diversas funções no organismo e actua em três tipos de células vasculares envolvidas no processo da aterosclerose. Nas células endoteliais, o ascorbato ajuda

## Introdução

a prevenir a disfunção endotelial, estimula a síntese do colagénio do tipo IV e aumenta a proliferação celular. Ao nível das células do músculo liso vascular, inibe a diferenciação e a proliferação em áreas de lesão vascular. Nos macrófagos, diminui o *stress* oxidante e inibe diversas funções (ex. adesão, fagócitos) (176). Enquanto antioxidante tem a capacidade de inibir a peroxidação lipídica directamente, eliminando os radicais peróxido e indirectamente, regenerando a forma activa de outros compostos antioxidantes (ex. vitamina E, flavonóides e a glutatona) (176). Existe alguma evidência científica de que uma alimentação rica em frutos e hortícolas poderá ser benéfica na prevenção de eventos cardiovasculares (177) e que uma baixa ingestão de frutos e hortícolas está associada a uma diminuição rápida dos níveis plasmáticos desta vitamina (178). No entanto, nos ensaios clínicos de suplementação com vitaminas antioxidantes (C e E) em humanos não foi demonstrada relação com a diminuição de eventos cardiovasculares (171,177,179-181).

Existem cerca de 600 carotenóides identificados na natureza, sendo que seis deles ( $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina) representam mais de 95% da concentração total de carotenóides plasmáticos e têm vindo a ser associados com a promoção da saúde (171). Alguns estudos epidemiológicos sugerem que os carotenóides têm uma função importante na prevenção das DCV (182). Pensa-se que a protecção conferida por estes compostos esteja relacionada com a sua actividade antioxidante, embora o mecanismo não seja ainda totalmente conhecido (183). No entanto em estudos epidemiológicos de suplementação com  $\beta$ -caroteno ou licopeno não foi observado qualquer efeito protector e por vezes foi verificada a presença de um efeito prejudicial em determinadas populações (184-186). Os resultados desses estudos sustentam as recomendações actuais que apontam no sentido de não utilizar suplementos à base de carotenóides para a redução do risco cardiovascular. No entanto, deverá ser promovido o consumo de frutos e hortícolas ricos em carotenóides, já que são vários os benefícios para a saúde (187,188).

A vitamina A é um micronutriente essencial para os humanos, sendo necessário para a função normal do sistema visual, desenvolvimento embrionário, diferenciação da pele, função imunitária e reprodução (189). A vitamina A poderá ter diversas formas: retinol, retinal, ácido retinóico e ésteres de retinil. No entanto, o termo vitamina A engloba qualquer composto que possua actividade biológica equivalente à do retinol (vitamina A pré-formada). De acordo com esta definição os carotenóides com actividade de pró-vitamina são considerados precursores alimentares do retinol (190). As suas necessidades alimentares são normalmente satisfeitas pela ingestão de retinol e de carotenóides com actividade pró-vitamina A, como sendo, o  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina (191). As principais fontes alimentares do retinol são produtos de origem animal, como o leite e derivados, gema de ovo e fígado (191). A actividade de pró-vitamina A dos carotenóides pode ser convertida em unidades de retinol, sendo que cada um deles tem uma capacidade diferente de conversão em equivalente de actividade de retinol (190). Nos últimos anos têm sido realizados alguns ensaios clínicos controlados para

avaliar o efeito da suplementação com vitamina A nos eventos cardiovasculares mas os resultados obtidos têm sido contraditórios (151,192,193).

## 1.2. Homocisteína

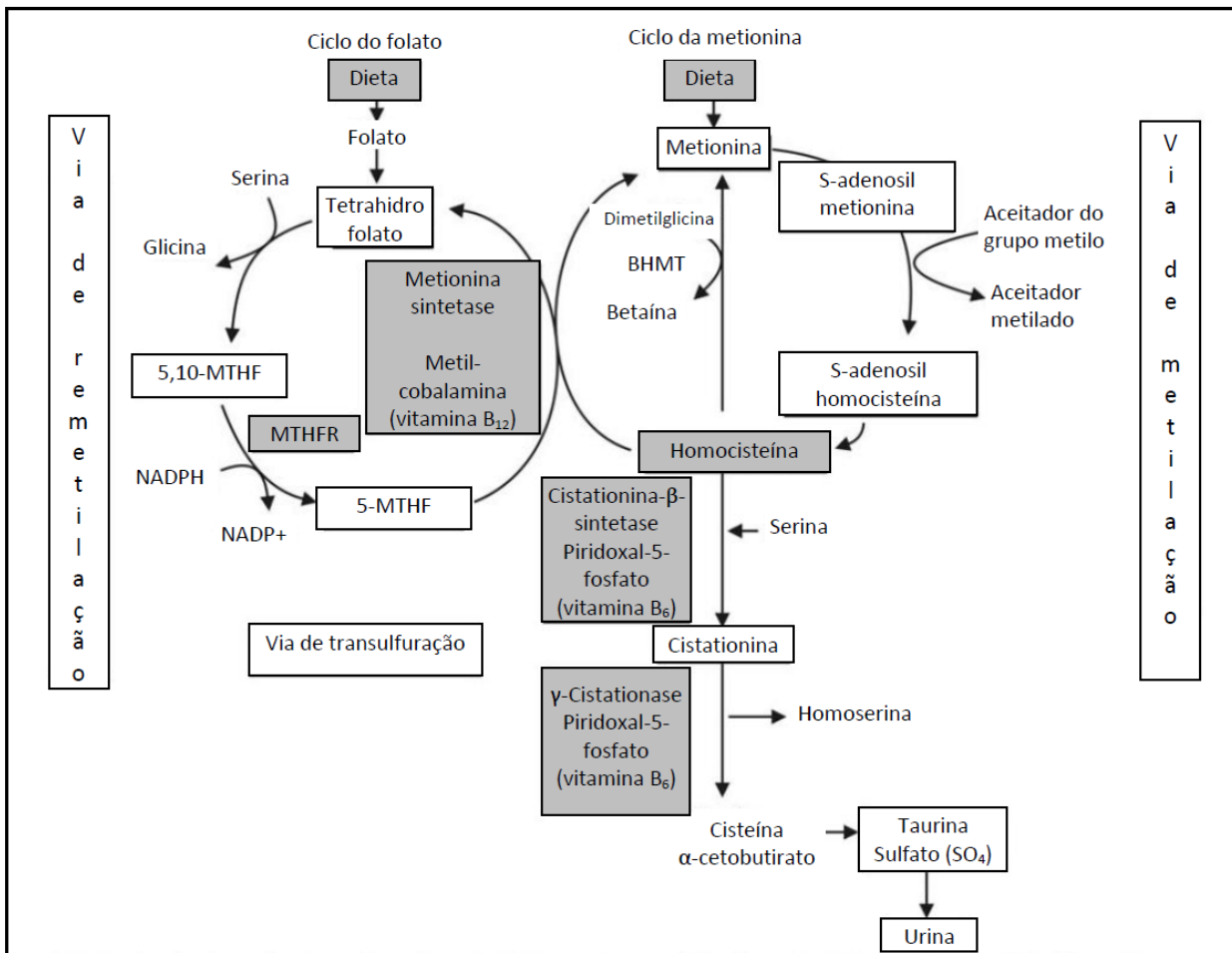
### 1.2.1. Bioquímica e metabolismo

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado, formado exclusivamente a partir da metionina proveniente da alimentação ou do catabolismo desse aminoácido essencial. Na Fig. 4 estão esquematizadas as vias metabólicas da Hcy. A metionina dietética é convertida em S-adenosilmetionina (AdoMet) pela enzima metionina-adenosiltransferase (MAT). A MAT forma uma ligação de enxofre de alta energia entre o carbono 5' da ribose do ATP e o enxofre da metionina. Uma pequena quantidade de AdoMet é utilizada para a síntese de poliaminas, e a maior parte doa seu grupo metil a outros compostos, incluindo creatina, DNA e RNA. Deste modo, AdoMet é metabolizada em S-adenosil-homocisteína que, por sua vez, é hidrolisada em Hcy e adenosina. A Hcy sintetizada, a partir da metionina, tem dois destinos possíveis: metabolização em cistationina (pela via da transulfuração) ou em metionina (pela via de remetilação) (194). A origem da metionina para estas reacções metabólicas é em grande parte da sua própria capacidade em se regenerar, a partir da Hcy, prevenindo a sua depleção. A via de transulfuração, na qual a Hcy é irreversivelmente convertida em cisteína (Cys), existe como uma excepção a esta regra. Aproximadamente 50% da Hcy é convertida, irreversivelmente, em cistationina, reacção catalisada pela enzima cistationina  $\beta$ -sintetase (C $\beta$ S) e que tem como cofactor a vitamina B<sub>6</sub>. Nesta reacção, a Hcy sofre uma condensação com serina para formar um tioéter, a cistationina. A reacção é alostérica e positivamente regulada pela AdoMet, o que serve para promover a depleção de um excesso de Hcy, quando os níveis plasmáticos de metionina estão altos. A enzima seguinte na reacção é a  $\gamma$ -cistationase, que é também dependente da vitamina B<sub>6</sub> e actua hidrolisando a cistationina para gerar cisteína e  $\alpha$ -cetobutirato. A Cys é convertida em glutatona e posteriormente em sulfatos que são excretados pela urina (195). A Hcy remanescente é remetilada através da enzima 5-metiltetrahydrofolato-homocisteína metiltransferase, também denominada de metionina sintetase (MS). Esta enzima está disponível em todas as células e tem como cofactor, a vitamina B<sub>12</sub>. Simultaneamente a MS leva à conversão do 5-metiltetrahydrofolato (a forma circulante do folato reduzido) a tetrahydrofolato, para que possa entrar no meio celular. A formação do 5-metiltetrahydrofolato por esta reacção requer a redução do 5,10-metilenotetrahydrofolato a 5-metiltetrahydrofolato, que é catalisado pela metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) (196). A MTHFR é inibida alostericamente pela AdoMet, deste modo, elevadas concentrações plasmáticas de metionina inibem a formação de 5-metiltetrahydrofolato. A betaína é um aminoácido com origem na colina alimentar que tem uma função importante na via alternativa de remetilação da Hcy, por ser um doador de grupos metilo. Esta reacção é catalizada pela betaína-homocisteína metiltransferase, que também é

## *Introdução*

dependente da vitamina B<sub>12</sub> e que existe em quantidades consideráveis no fígado (197). A concentração da Hcy no plasma humano é definida como a soma de todas as formas de Hcy plasmática, incluindo as formas livres, as oxidadas e as que se ligam às proteínas plasmáticas (198). Cerca de 80 a 90% da Hcy plasmática circula ligada à albumina, o seu principal transportador no plasma (199). Os restantes 10 a 20% circulam na forma livre oxidada, formando dois tipos de dissulfetos: dímeros de Hcy ou dímeros de homocisteína-cisteína. Aproximadamente 1% da Hcy plasmática está na sua forma livre reduzida (198). A maior parte da Hcy na célula apresenta-se no estado reduzido. A concentração da Hcy intracelular é rigorosamente controlada e qualquer excesso é exportado da célula para o plasma (200).

A AdoMet é determinante na regulação do metabolismo da Hcy. De forma a evitar a acumulação de Hcy, potencialmente citotóxica, a AdoMet estimula o catabolismo da Hcy aumentando a actividade da CβS e da γ-cistationase. Quando há um aumento acentuado do consumo de proteínas animais com elevado teor de metionina, ocorre um aumento da AdoMet tecidual e cerca de 70% da Hcy é catabolizada pela CβS através da via de transulfuração. Contrariamente, em situações de restrição proteica a via da remetilação é favorecida por uma aceleração da mobilização da MTHFR dependente do folato e, neste caso, apenas 10% da Hcy presente é catabolizada por transulfuração. No entanto, um consumo elevado de metionina poderá levar à saturação da via de transulfuração, associado com uma inibição da remetilação, causando um efluxo de Hcy para a célula (195).



**Figura 4. Metabolismo da Hcy.** BHMT, betaína-homocisteína metiltransferase; MTHF, metilenotetrahidrofolato; NADPH+, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida; NADP+, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma oxidada. [adaptado de (201)].

### 1.2.2. Classificação dos níveis plasmáticos de homocisteína e cisteína

Os valores de referência (considerados normais) para Hcy plasmática são até 15  $\mu\text{M}$ . As suas concentrações plasmáticas são habitualmente de 6-12  $\mu\text{M}$  nas mulheres e de 8-14  $\mu\text{M}$  nos homens. A hiperhomocisteinémia é considerada moderada para valores entre 15-30  $\mu\text{M}$ , intermédia para valores entre 30-100  $\mu\text{M}$  e severa para valores maiores que 100  $\mu\text{M}$  (199,200). A prevalência de hiperhomocisteinémia ocorre em 5-7% da população geral, porém níveis moderados a intermédios ocorrem em 13-47% dos indivíduos com doença vascular aterosclerótica sintomática (202). De acordo com El-Khairy *et al.* (203), os níveis de Cys podem ser categorizados em: baixos (<250  $\mu\text{M}$ ), médios (250-300  $\mu\text{M}$ ) e elevados (>300  $\mu\text{M}$ ).

### 1.2.3. Determinantes dos níveis plasmáticos da homocisteína

Os factores fisiológicos, genéticos, nutricionais, induzidos por drogas e hormonas determinam os níveis de Hcy plasmática. Alterações genéticas nas enzimas que metabolizam a homocisteína podem contribuir para a hiperhomocisteinémia ligeira, moderada ou grave, dependendo do produto genético e do nível de actividade enzimática residual. Estes defeitos incluem mutações na codificação genética das enzimas C $\beta$ S, MTHFR e MS (196,198). A causa

genética mais frequente para a hiperhomocisteinémia grave e a homocistinúria é a deficiência homozigótica da enzima C $\beta$ S, condição que se caracteriza por um aumento de até 40 vezes da homocisteína plasmática em jejum (198,204). A incidência da deficiência homozigótica é estimada em 1 para cada 335 mil nascimentos. Os homozigotos para a deficiência de C $\beta$ S desenvolvem a clássica síndrome de homocistinúria, incluindo doença vascular prematura e trombose, atraso mental e anormalidades esqueléticas. Os doentes com homocistinúria homozigótica normalmente não sobrevivem até à terceira década de vida, sendo o tromboembolismo a principal causa de morte em aproximadamente 80% dos casos. Embora doses elevadas de vitamina B<sub>6</sub> possam melhorar o prognóstico da doença, muitos dos doentes não respondem a este tratamento (205). A herança de apenas um gene C $\beta$ S funcional pode resultar também em hiperhomocisteinémia moderada, o que resulta em cerca de 50% da actividade da actividade normal. A incidência de deficiência heterozigótica de C $\beta$ S é estimada entre 0,3 e 1,0% da população geral (196). Duas outras doenças genéticas raras que podem causar um aumento de até 20 vezes da Hcy plasmática e consequente excreção na urina resultam da deficiência nas actividades das enzimas MTHFR e MS. O gene MTHFR tem pelo menos dois polimorfismos funcionais: a substituição de citosina para timina no nucleotídeo 677 (C677T) e de adenina para citosina no nucleótido 1298 (A1298C) (198). O alelo MTHFR 677T está associado a redução da actividade enzimática, diminuição das concentrações séricas de folato e a aumento moderado da homocisteína plasmática. O polimorfismo A1298C afecta igualmente a actividade da MTHFR, mas não está associado a concentrações mais elevadas de homocisteína plasmática ou à diminuição dos níveis séricos de folato (199). Os indivíduos com o genótipo 677TT têm aproximadamente 50% da actividade enzimática normal da MTHFR, enquanto os heterozigóticos 677CT têm cerca de 75% da actividade (206). A incidência da deficiência homozigótica para a variante termolábil foi estimada em 8% da população em geral (202). A outra alteração genética rara encontra-se no gene da MS, estando associada com a doença cardíaca isquémica, especialmente em fumadores (207).

A hiperhomocisteinémia severa surge na maioria dos casos em pacientes homozigóticos para a mutação da C $\beta$ S e apenas em 5 a 10% dos indivíduos com deficiência em MTHFR. A hiperhomocisteinémia moderada ou intermédia ocorre em casos de heterozigóticos para as deficiências em C $\beta$ S e MTHFR, quando associadas com baixas concentrações de folato (208). As alterações dos genes MTHFR e MS levam ao desenvolvimento de sintomas clínicos semelhantes aos descritos para a mutação C $\beta$ S, sugerindo que a presença de elevados níveis de Hcy são um factor patogénico nas complicações vasculares.

Os principais factores fisiológicos determinantes para os níveis plasmáticos de Hcy são género e idade. Sabe-se que homens saudáveis têm níveis plasmáticos de Hcy 21% superiores ao das mulheres, mesmo após a menopausa (209). Esta diferença entre os dois géneros deve-se em parte ao efeito dos estrogénios na mulher (205) e à maior produção de Hcy no homem, devido à maior percentagem de massa muscular (204). Com a idade, os níveis de Hcy aumentam em

ambos os géneros, algo que pode ser explicado por uma deficiência em vitaminas e pelo declínio da função renal (210,211). O estado nutricional é outro factor que afecta a Hcy plasmática. A deficiência de vitaminas do complexo B envolvidas no metabolismo da Hcy é provavelmente a causa mais comum de hiperhomocisteinémia moderada. As concentrações plasmáticas da Hcy estão inversamente relacionadas com as concentrações sanguíneas de folato, vitamina B<sub>6</sub> e vitamina B<sub>12</sub>. A ingestão crónica de álcool está também associada a défices nutricionais, podendo levar a um aumento da concentração plasmática de Hcy (198).

O tratamento com determinados medicamentos pode igualmente originar o aumento dos níveis plasmáticos de Hcy. No decurso da terapia com metotrexato (análogo estrutural do folato) e anticonvulsionantes (fenitoína e carbamazepina), os níveis de ácido fólico encontram-se diminuídos, o uso do anestésico óxido nitroso reduz os níveis séricos da vitamina B<sub>12</sub> e a vitamina B<sub>6</sub> encontra-se alterada com a teofilina (200,208).

As alterações hormonais, como a diminuição de estrogénios que ocorre na menopausa, aumenta os níveis de Hcy. A Hcy plasmática é 50% inferior nas grávidas e diminui com a terapia hormonal. Hormonas tiroideias também alteram a concentração de Hcy no plasma, sendo que, os doentes com hipotiroidismo apresentam níveis elevados de Hcy e os com hipertiroidismo têm níveis normais (200,212).

Várias condições patológicas podem interferir nas concentrações plasmáticas da homocisteína, entre elas estão: a insuficiência renal crónica (na qual o aumento poderá estar relacionado com uma diminuição da excreção de Hcy), a psoríase, vários tipos de carcinomas, o lúpus eritematoso sistémico, a diabetes, os doentes sujeitos a transplante cardíaco e renal, as doenças gastrointestinais, a anemia perniciosa e a hiperuricemia (200). O tabaco tem sido positivamente associado à concentração de Hcy (198,200,204). O mecanismo exacto pelo qual o tabaco aumenta a Hcy plasmática ainda não está identificado, mas parece estar relacionado com a inibição da enzima MS e com o facto de os fumadores seguirem uma dieta alimentar pouco saudável, aumentando por diversas vias o nível de *stress* oxidante (198). O consumo regular de café demonstrou estar positivamente associado com os níveis plasmáticos de Hcy (213,214). O possível mecanismo que poderá estar na base dessa elevação está relacionado com a actividade da cafeína. Este composto funciona como antagonista da vitamina B<sub>6</sub>, inibindo a conversão de Hcy em Cys. Várias evidências têm também demonstrado que o polifenol, ácido clorogénico, está presente no café em quantidades semelhantes às da cafeína e é parcialmente responsável pelo aumento da concentração plasmática da Hcy (200). O mecanismo responsável por esse aumento está relacionado com a necessidade da metionina doar grupos metil durante a metabolização desse polifenol e consequente conversão da metionina em Hcy (215,216).

#### 1.2.4. Homocisteína, cisteína e a doença cardiovascular

A hiperhomocisteinémia é considerado um factor importante e independente de risco cardiovascular e aterosclerótico (199,217). A relação entre a hiperhomocisteinémia e a doença vascular foi pela primeira vez descrita em 1969 por McCully, que observou evidências de trombose arterial precoce e aterosclerose num doente com homocistinúria (218). Estando a homocistinúria associada a níveis elevados de homocisteína plasmática, McCully concluiu que, a hiperhomocisteinémia contribuía para a doença aterosclerótica e trombótica. Estudos retrospectivos mostram que existe correlação entre homocistinúria, aterosclerose, tromboembolismo arterial e venoso e a hiperhomocisteinémia em pacientes com DCV (219,220). As lesões arteriais em indivíduos que morreram de homocistinúria evidenciaram hiperplasia proeminente da íntima, vascularização, descamação endotelial e fibrose. McCully *et al.* (1975) propuseram, posteriormente que elevações moderadas nos níveis de Hcy poderiam ser causas importantes de aterosclerose (221). Em 1976, Wilcken *et al.* foram os primeiros a publicar resultados que implicavam a hiperhomocisteinémia moderada na patogénese da doença arterial coronária (219). Desde então, foram realizados vários estudos retrospectivos e prospectivos que demonstraram que a hiperhomocisteinémia constituía um factor de risco independente para o EAM, AVC e tromboembolismo venoso (222-224). Após um evento (EAM ou AVC) cardiovascular ocorre uma lesão tecidual e um aumento da concentração plasmática de Hcy. Por este facto, alguns autores têm sugerido que a hiperhomocisteinémia poderá ser uma consequência e não uma causa da oclusão vascular aguda (225). Por outro lado, a estimativa do risco relativo (com significância) associado à hiperhomocisteinémia moderada tem sido maior em estudos retrospectivos (em que a Hcy plasmática foi medida antes do evento) do que nos estudos prospectivos (em que a Hcy plasmática foi avaliada após o evento vascular) (226-228). Apesar da grande quantidade de dados epidemiológicos disponíveis que estabelecem uma associação entre hiperhomocisteinémia e aumento do risco para doenças vasculares, os mecanismos pelos quais a hiperhomocisteinémia contribui para a aterogénese e trombogénese são hipotéticos e controversos (Fig. 5).

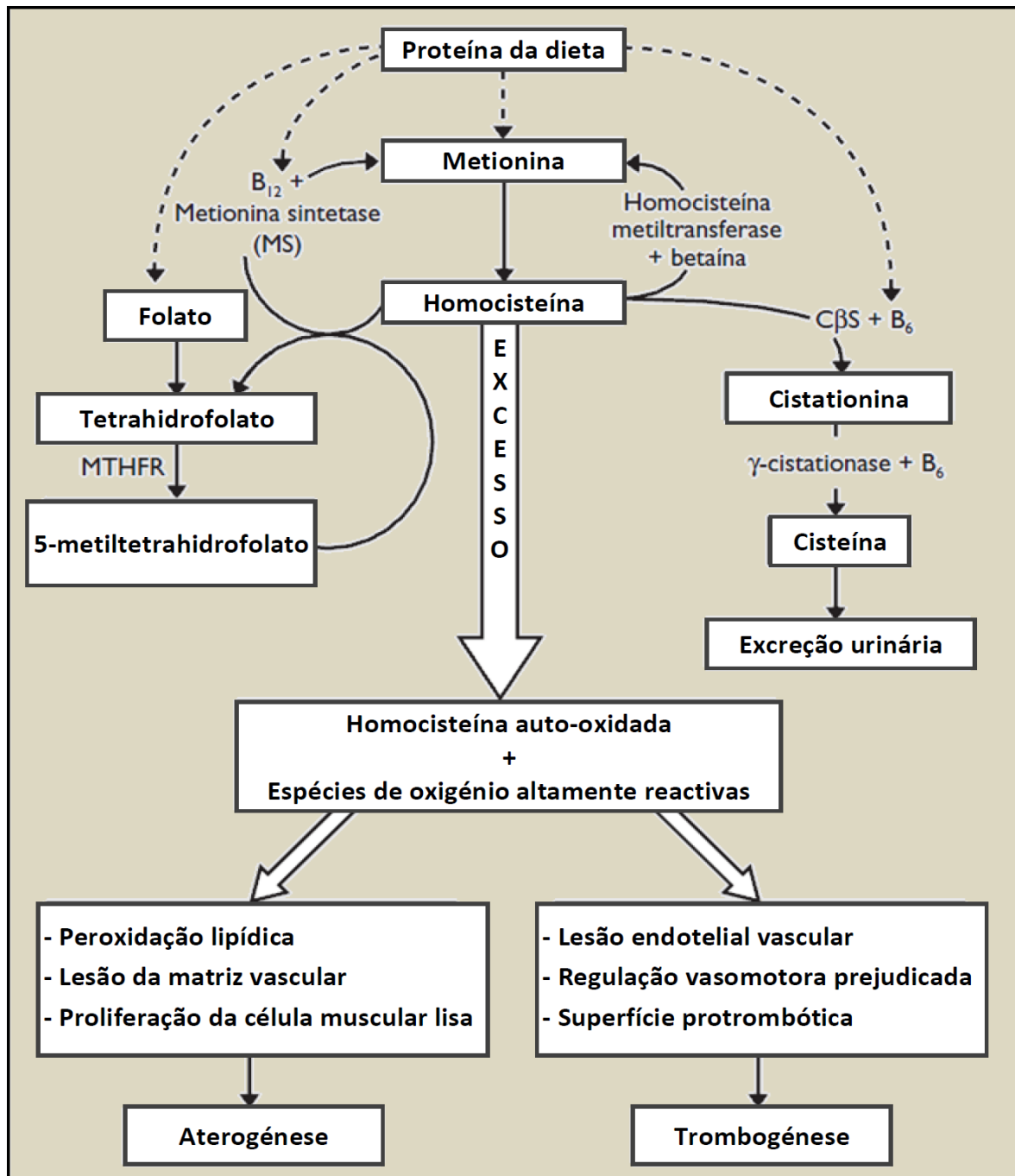


Figura 5. Possível mecanismo de doença aterotrombótica [adaptado de (229)].

A agressão do endotélio parece ser um dos mecanismos pelos quais a homocisteína leva à lesão vascular. Trabalhos pioneiros com primatas não humanos (babuínos) mostraram que a injeção intravenosa de Hcy durante 5 dias provocou lesão endotelial caracterizada pela descamação endotelial, proliferação de células musculares lisas e espessamento da camada íntima vascular, mediada pela redução da meia vida plaquetária, com a rápida formação de lesões vasculares, similares a lesões ateroscleróticas precoces em humanos (230,231). O grau de lesão endotelial provocada pela hiperhomocisteinemia foi semelhante ao observado em associação com outros factores de risco, como na hipercolesterolemia e na hipertensão arterial sistêmica. Estudos realizados em animais comprovam que a hiperhomocisteinemia induzida

pela sobrecarga de metionina originou a aterosclerose na artéria ilíaca de suínos (232) e na aorta de coelhos (233). Um dos principais mecanismos de disfunção endotelial induzida pela hiperhomocisteinémia estaria relacionado com a diminuição da biodisponibilidade do factor de relaxamento do endotélio, o óxido nítrico, sintetizado a partir de L-arginina pela acção da enzima óxido nítrico sintase (234). Este composto é um potente vasodilatador endógeno, que inibe a agregação plaquetária, a migração de leucócitos e a proliferação e migração das células musculares lisas. O óxido nítrico tem também a função de restringir a activação e expressão de moléculas de adesão e a produção de aniões superóxido (235). Alguns estudos anteriores realizados em animais hiperhomocisteinémicos demonstraram que a Hcy reduziu a biodisponibilidade do óxido nítrico em cultura de células endoteliais, provavelmente por indução do *stress* oxidante, que inactiva o óxido nítrico, ou por inibição da actividade da óxido nítrico sintase, ou ainda por aumentar as concentrações de dimetilarginina assimétrica, que contribui para a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (236). A Hcy tem na sua estrutura um grupo sulfidril (SH) que é altamente reactivo por ser doador de electrões nos sistemas de oxidação, sendo oxidado rapidamente em dissulfito (SS). No plasma, a Hcy é autoxidada formando um dissulfito (homocistina) ou pode combinar-se com a tiolactona, sendo esta última a sua forma mais reactiva. Pensa-se que a autooxidação da Hcy no plasma pode reduzir a expressão e actividade da glutathione peroxidase e, assim, inibir o potencial antioxidante das células endoteliais (237). O grupo SH dos SS e da Hcy tiolactona poderá reagir com o oxigénio, produzindo o peróxido de hidrogénio e o superóxido, os quais iniciam a peroxidação lipídica tanto na superfície endotelial como nas LDL (238). Existem vários mecanismos possíveis pelos quais a Hcy tiolactona pode acelerar a aterosclerose. A evidência científica tem demonstrado que as LDL são susceptíveis à homocisteinilação e que a interacção entre a Hcy-tiolactona e os grupos amina dos resíduos de lisina da apo B100 induz a modificação das LDL (239). Tem vindo a ser sugerido que a homocisteinilação das LDL aumenta a sua aterogenicidade (240,241). As LDL homocisteiniladas induzem o *stress* oxidante em culturas de células endoteliais da aorta humana e reduzem a viabilidade celular, sugerindo que a homocisteinilação poderá contribuir para a disfunção endotelial, que é um evento chave no início da formação da placa aterosclerótica (242). Em 2001, Poddar *et al.* (243) comprovaram que a Hcy induzia a expressão das citocinas proinflamatórias, a proteína quimiotática de monócitos-1 e a interleucina-8, nas células do endotélio da aorta humana. Estes resultados sugeriram uma nova função da Hcy na patogénese da doença vascular. Actualmente estão também descritos diversos efeitos da Hcy nas propriedades antitrombóticas do endotélio vascular (244,245). O efeito da Hcy e da homocistina nas propriedades electrofisiológicas do coração tem sido pouco estudado, no entanto já em 2001 Shontz *et al.* (246), realizaram um estudo experimental em ratos com o objectivo de determinar os efeitos directos da Hcy nas propriedades electrofisiológicas do coração. Os autores chegaram à conclusão que a Hcy e a

homocistina inibiam intensamente os canais de potássio nos miócitos ventriculares, podendo contribuir para alterações da repolarização e favorecer a arritmia cardíaca.

A Cys é um aminoácido com um grupo sulfidril e partilha propriedades estruturais e químicas semelhantes à Hcy. A autooxidação da Cys *in vitro* promove vários processos, estando envolvida na aterogénese e trombogénese (247-251). A Cys tem também um efeito citotóxico *in vitro* contra vários tipos de células (252) e estimula a modificação das LDL mediada pelo radical superóxido, o que favorece a formação de células espumosas da placa de ateroma (247,251). Por este motivo o excesso de Cys no plasma tem um efeito especialmente aterogénico em indivíduos com hipercolesterolemia. É também conhecido que a Cys tem a capacidade de formar um derivado com o óxido nítrico que promove a disfunção endotelial (253). A concentração habitual de Cys em indivíduos saudáveis é cerca de 250  $\mu\text{M}$ . A Cys, Hcy e outros aminotióis circulam no plasma nas formas reduzidas, oxidadas e ligadas a proteínas, sendo que, cada uma dessas formas participa em reacções redox e dissulfito (254). A Cys tem também propriedades de autooxidação na presença de iões metálicos, resultando na formação de radicais livres e de peróxido de hidrogénio (255). Os níveis elevados de Hcy alteram a concentração total de Cys e de outros aminotióis no plasma. Poucos estudos têm avaliado a relação entre a elevação dos níveis plasmáticos da Cys e a DCV. No entanto, os resultados existentes indicam que os indivíduos com doença vascular apresentam níveis de Cys plasmática significativamente superiores aos valores obtidos para os controlos (256-259). Um estudo epidemiológico demonstrou que a Cys plasmática está associada de uma forma independente com a DCV, bem como, com a lesão aterosclerótica em doentes com hiperlipidémia (260), no entanto, neste estudo não foram ajustados algumas variáveis de confundimento. Um outro estudo do tipo caso-controlo apresentou resultados para uma amostra de 750 indivíduos com doença vascular e 800 controlos, recrutados em 9 Países Europeus, tendo-se verificado que existia uma associação directa e significativa entre os níveis plasmáticos da Cys e a DCV, mesmo após ajustamento para a Hcy, creatinina e outros factores de risco cardiovascular (203).

#### 1.2.5. Homocisteína e a diabetes

A relação entre a elevação moderada dos níveis de Hcy e as complicações da diabetes não está ainda esclarecida. Alguns estudos epidemiológicos têm demonstrado a existência de uma forte correlação positiva entre a hiperhomocisteinémia e as complicações vasculares na diabetes do tipo 2 (261-265). No entanto, outros têm evidenciado que não existe associação entre a hiperhomocisteinémia e a angiopatia na diabetes (266-268). Estes resultados contraditórios poderão ser justificados pelo tamanho e heterogeneidade dos grupos populacionais avaliados (265). De acordo com os resultados descritos por Hoogeveen *et al.*, um aumento de 5  $\mu\text{M}$  nos níveis de Hcy sérica levou a um agravamento de 60% no risco de mortalidade em 5 anos nos diabéticos do tipo 2 e de 17% em não diabéticos. Assim, a

hiperhomocisteinémia parece ser o maior factor de risco da mortalidade em diabéticos quando comparado com não diabéticos (261). De acordo com estudo realizado por Passaro *et al.*, em 95 diabéticos do tipo 2, seguidos durante 3 anos, verificou-se uma redução dos níveis de Hcy após a melhoria do controlo glicémico, comprovado pela medição da HbA1c (269). Os resultados deste estudo sugerem que um bom controlo metabólico da diabetes é factor protector no aparecimento da hiperhomocisteinémia. Uma possível interacção biológica da hiperhomocisteinémia com a diabetes pode ser a resposta para um maior aumento do risco de mortalidade nos diabéticos. As elevadas concentrações de Hcy poderão promover o *stress* oxidante, favorecendo a lesão endotelial, o aumento da proliferação das células do músculo liso e conseqüentemente, o aumento da trombogenicidade (270-275). A relação entre a hiperhomocisteinémia e a angiopatia da diabetes é um tema ainda bastante contraditório, sendo necessários mais estudos epidemiológicos com maior tamanho amostral e com ajustamento para outros factores de risco vascular.

### 1.2.6. A alimentação e a hiperhomocisteinémia

O papel da inadequação alimentar no aparecimento de doenças crónicas não transmissíveis já é conhecido e pode ser caracterizado, pelo excesso de ingestão calórica, pelo aumento do consumo de alimentos ricos em gordura, pelo tamanho das porções consumidas e de dietas ricas em açúcares simples (276). Num estudo prospectivo em que foram avaliadas mais de 80 mil mulheres com idades entre os 34 e 59 anos foi demonstrado que um aumento de 5% do valor energético total da ingestão de lípidos saturados, estava associado a um acréscimo de 17% no risco de doença coronária (277). Em 2007, Berstad *et al.* (278) demonstraram que a ingestão elevada de gordura saturada estava associada com a hiperhomocisteinémia e que existia uma associação das gorduras alimentares com os marcadores da insulino-resistência, inflamação, dislipidémia e síndrome metabólica.

Estima-se que cerca de 70% dos casos de hiperhomocisteinémia são parcialmente causados pela ingestão inadequada de vitaminas do complexo B (210). As deficiências, isoladas ou combinadas, das vitaminas envolvidas nas diversas vias do metabolismo da Hcy são importantes marcadores da hiperhomocisteinémia (279). Em idosos norte-americanos, dois terços (67%) dos casos de hiperhomocisteinémia foram atribuídos a hábitos alimentares inadequados, no que se refere à ingestão de uma ou mais vitaminas do complexo B (210). Em indivíduos com doença arterial periférica, a frequência de hiperhomocisteinémia naqueles que tinham uma ingestão insuficiente de duas ou três vitaminas do complexo B (53%) foi muito superior em relação aos com ingestão insuficiente de uma única vitamina (7,5%), o que confirma a relação entre hiperhomocisteinémia e estado nutricional vitamínico (280).

De acordo com um estudo de coorte prospectivo de 12 anos realizado em cerca de 46 mil participantes do género masculino (195), o consumo de folato alimentar e suplementos contendo ácido fólico estaria inversamente associado à ocorrência de doença arterial periférica

e poderia contribuir para a sua prevenção. A deficiência dietética de folato levaria à formação insuficiente de 5-metiltetrahydrofolato, o qual é necessário como grupo doador do radical metil na remetilação da Hcy para metionina. A deficiência da vitamina B<sub>12</sub>, por sua vez, levaria à inibição da transferência do radical metil da 5-MTHF para a Hcy na via de remetilação através da MS. Já a deficiência da vitamina B<sub>6</sub> prejudicaria a conversão da Hcy em Cys pelas enzimas CBS e  $\gamma$ -cistationase, as quais são activadas pela vitamina B<sub>6</sub> na via da transulfuração. Essas condições favoreceriam a acumulação de Hcy intracelular, a qual seria transportada para o compartimento extracelular e, conseqüentemente, provocaria aumento das concentrações circulantes de Hcy. Esse processo restringiria a toxicidade intracelular, mas, por outro lado, poderia expor o meio vascular aos efeitos nocivos do excesso de homocisteína (281). Dessas três vitaminas, os folatos são o determinante dietético mais importante na concentração de Hcy, pois a sua deficiência poderá restringir a via de remetilação da Hcy em metionina e favorecer a sua acumulação no meio extracelular (279). O folato, isoladamente ou em combinação com as vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, pode reduzir a homocisteína plasmática. A dose exacta dessas vitaminas para o tratamento da hiperhomocisteinémia não está consensualmente definida. Um estudo comparativo do efeito de três formas de suplementação com ácido fólico para diminuir a homocisteinémia mostrou que o consumo diário de cereais matinais fortificados e o uso de suplementos parecem ser os métodos mais eficientes para aumentar os níveis de folato e reduzir a Hcy no plasma. No entanto, o aumento do consumo de alimentos ricos em folato não é uma estratégia eficiente para reduzir a homocisteinémia, provavelmente pelas variações na biodisponibilidade dos folatos em frutas e hortícolas e pela ingestão pouco frequente desses alimentos na população em estudo (282). O consumo de alimentos fortificados ou suplementos com vitamina B<sub>12</sub> é também recomendado no tratamento da hiperhomocisteinémia na população sénior, pois 10 a 30% dessas pessoas podem apresentar má absorção de vitamina B<sub>12</sub> pela redução do factor intrínseco, e os suplementos garantem absorção adequada por difusão passiva, portanto sem a presença desse factor (283). Para seguir um padrão de alimentação saudável, as recomendações alimentares actuais apontam no sentido do aumento do consumo de frutos, hortícolas e produtos lácteos magros (284). Um dos principais benefícios destas recomendações dietéticas poderá ser o aumento da ingestão de folatos, vitaminas B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub> e conseqüentemente a redução dos níveis plasmáticos de Hcy. A maior parte dos frutos e hortícolas são ricos em nutrientes, têm baixo valor energético e elevado teor em fibra. Uma alimentação rica em frutos e hortícolas permite assegurar todas as necessidades em macronutrientes, micronutrientes e fibra, sem com isso estar associada a uma ingestão calórica muito elevada. Diversos estudos têm demonstrado que uma alimentação rica em frutos e hortícolas diminui o risco de DCV por reduzir a pressão arterial e melhorar outros dos seus factores de risco clássicos (285-287). Em estudos observacionais longitudinais, pessoas que consumiam regularmente este tipo de alimentos apresentavam um menor risco de desenvolver DCV, especialmente AVC (288,289). Para além de consumir com

regularidade frutos e hortícolas é também importante variar a escolha diária destes alimentos. Assim, deve dar-se preferência aos que apresentam uma coloração muito acentuada (ex. cenouras, espinafres, pêssego e frutos silvestres), isto porque, habitualmente têm uma maior concentração de micronutrientes do que outros menos pigmentados (151). De um modo geral, poderá dizer-se que a adopção de uma alimentação rica em frutos e hortícolas é uma estratégia para controlar a ingestão de energia, metionina e prevenir o risco de aparecimento e progressão de DCV. Em vários estudos foram encontradas associações inversas entre as concentrações plasmáticas de Hcy e o consumo de frutos e hortícolas, sugerindo que esta reflecte a qualidade da dieta alimentar (290,291). Um estudo epidemiológico realizado em 2010 (292) numa população espanhola de 120 universitários tinha como objectivo encontrar uma associação inversa entre as concentrações plasmáticas de Hcy e o consumo de frutos, leguminosas e outros vegetais. Os resultados indicaram que uma elevada ingestão desses alimentos (>600 g/dia) estava associada a menores concentrações plasmáticas de Hcy. Num outro estudo realizado na Grécia, em 486 adultos aparentemente saudáveis (293), foi verificado que o consumo de frutos, leguminosas e outros vegetais acima do valor da mediana era factor protector da hiperhomocisteinémia. Assim, um consumo mínimo de batatas de 360 g/dia, de leguminosas de 300 g/dia e de frutos e/ou vegetais igual ou superior a 360 g/dia foi respectivamente associado a uma diminuição do risco de ter baixas concentrações séricas de ácido fólico em 58%, 61% e 79%. Para além disso, os indivíduos com maior consumo de frutos, leguminosas e outros vegetais também apresentaram níveis plasmáticos de Hcy diminuídos. Simultaneamente verificou-se que, a maior ingestão de cereais e carnes (especialmente carne vermelha) estava inversamente associada às concentrações plasmáticas de ácido fólico, o que sugere o papel fundamental desempenhado pelo equilíbrio entre grupos alimentares e em especial pelo grupo dos frutos, leguminosas e outros vegetais, que deve ser consumido diariamente de acordo com as porções descritas na roda dos alimentos para prevenir o aparecimento de hiperhomocisteinémia moderada.

## 2. OBJECTIVOS

### 2.1. Objectivos gerais

- Avaliar o estado nutricional da população e relacionar a obesidade com os níveis plasmáticos ou séricos dos compostos bioquímicos em estudo;
- Caracterizar os hábitos alimentares da população em estudo e correlacioná-los com os níveis plasmáticos da Hcy e Cys;
- Relacionar a presença de angiopatia diabética do tipo 2 com a hiperhomocisteinémia, hipercisteinémia e com a diminuição dos níveis plasmáticos ou séricos de compostos antioxidantes (vitaminas A, C e E e carotenóides) e de cofactores do metabolismo da Hcy (vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e folatos);
- Avaliar o contributo da variação genética da Hp e do polimorfismo C677T da MTHFR para os níveis plasmáticos da Hcy e Cys na angiopatia diabética.

### 2.2. Objectivos específicos

- Avaliar e comparar o estado nutricional dos três grupos populacionais pela aplicação de métodos antropométricos e de bioimpedância;
- Determinar e comparar a prevalência de obesidade nos três grupos populacionais pela aplicação de diferentes metodologias;
- Estimar e comparar a ingestão média diária de nutrientes na população;
- Avaliar e comparar a prevalência de inadequação da ingestão de nutrientes nos três grupos populacionais em estudo;
- Validar os métodos de HPLC para o doseamento de Hcy, Cys, MAD, vitaminas B<sub>6</sub>, C, A, E e carotenóides no plasma ou soro humano;
- Determinar e comparar as concentrações séricas ou plasmáticas de Hcy, Cys, MAD, vitaminas A, C, E, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico e carotenóides nos três grupos populacionais utilizando métodos validados de HPLC e electroquimioluminescência;
- Determinar, avaliar e comparar a prevalência de hiperhomocisteinémia e de hipercisteinémia nos três grupos em estudo;
- Avaliar o grau de *stress* oxidante na população em estudo por avaliação dos níveis séricos do MAD;
- Determinar a prevalência de baixos níveis de compostos antioxidantes (vitaminas A, C, E e carotenóides) e de vitaminas cofactores (vitamina B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e ácido fólico) do metabolismo da Hcy;

## Objectivos

- Correlacionar a presença de DMT2 e de angiopatia diabética com a hiperhomocisteinémia, hipercisteinémia e com a diminuição dos níveis plasmáticos ou séricos de compostos antioxidantes (vitaminas C, A, E e carotenóides) e de cofactores do metabolismo da Hcy (vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e folatos);
- Testar possíveis associações entre os vários parâmetros bioquímicos avaliados na população de diabéticos avaliada;
- Relacionar as concentrações plasmáticas de Hcy e Cys com o estado nutricional e clínico dos participantes no estudo, nomeadamente com a obesidade;
- Associar a ingestão de nutrientes com as concentrações plasmáticas de Hcy e Cys;
- Relacionar o *stress* oxidante e os antioxidantes alimentares com estado nutricional e clínico da população;
- Relacionar o polimorfismo da Hp com a hiperhomocisteinémia e hipercisteinémia na angiopatia da DMT2;
- Relacionar o polimorfismo C677T da enzima MTHFR com a hiperhomocisteinémia e hipercisteinémia na angiopatia da DMT2;
- Avaliar o efeito combinado do polimorfismo da Hp e do polimorfismo C677T da enzima MTHFR na probabilidade de ocorrência da hiperhomocisteinémia e hipercisteinémia em diabéticos do tipo 2 com angiopatia.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. População em estudo

Foi realizado um estudo epidemiológico observacional analítico do tipo caso-controlo. A população em estudo foi constituída por 300 adultos Portugueses, sendo 150 diabéticos do tipo 2 e 150 controlos. Os diabéticos foram recrutados na Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal e os controlos na Universidade Internacional para a Terceira Idade. Todos os participantes foram convidados a integrar o estudo através de um contacto inicial telefónico ou presencial. Todos os participantes foram categorizados de acordo com três grupos: grupo I (n = 75) - diabéticos do tipo 2 com angiopatia; grupo II (n = 75) - diabéticos do tipo 2 sem angiopatia; grupo III (n = 150) - controlos. Inicialmente estava prevista a inclusão de 150 pessoas no grupo III, mas durante o estudo sete pessoas desse grupo desistiram. O cálculo do tamanho amostral de cada grupo foi realizado recorrendo à utilização de *software* específico. O procedimento realizado para o seu cálculo encontra-se descrito no ponto 3.6. (tratamento de dados e análise estatística) desta tese. Os seguintes critérios de inclusão foram aplicados a todos os grupos: a) ambos os géneros; b) 40-75 anos; c) caucasianos; e d) assinar o consentimento informado. Foi critério de inclusão para os grupos I e II a presença de DMT2 diagnosticada há pelo menos 1 ano. Um critério de inclusão adicional para o grupo I foi a presença de pelo menos uma das seguintes complicações angiopáticas: acidente vascular cerebral, enfarte agudo do miocárdio, doença vascular periférica ou retinopatia. A presença das referidas complicações foi confirmada pela informação disponível no registo clínico do doente. Foram excluídos do estudo, todos os indivíduos que não preenchiam os requisitos definidos nos critérios de inclusão. Foi considerado critério de exclusão para o grupo II a presença de complicações micro- e/ou macroangiopáticas. No grupo III foi considerado critério de exclusão a presença de DMT2, doença cardiovascular e de síndrome metabólico.

#### 3.2. Considerações éticas

Este estudo foi previamente aprovado pelas Comissões de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, da Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal e do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. Todo o trabalho de investigação foi desenvolvido de acordo com as considerações constantes na Declaração de Helsínquia (294). Todos os participantes receberam informação detalhada do projecto. Foram explicados os objectivos, métodos, principais benefícios e potenciais desvantagens do estudo, sendo também, entregue um folheto informativo (Anexos I e II). Todos os participantes foram informados de que podiam recusar a participação ou desistir a qualquer momento. Por fim, cada participante assinou o consentimento informado (Anexos III e IV).

### **3.3. Colheita de dados**

#### *3.3.1. Gerais, clínicos e fisiológicos*

Foi desenvolvido um questionário geral de acordo com o 4º Inquérito Nacional de Saúde de 2005-2006 (Anexos V e VI) (295). O questionário foi aplicado por entrevista a toda a população em estudo (n = 293), tendo sido obtidos dados referentes a aspectos demográficos, socioeconómicos e culturais. Informações sobre os hábitos tabágicos, consumo de álcool, utilização de suplementos, presença de alergias alimentares, utilização de medicação para o tratamento da diabetes e da doença cardiovascular, história clínica do participante, antecedentes pessoais e familiares de doença cardiovascular foram também obtidas pela aplicação do questionário geral. Informação referente ao nível de actividade física também constou no questionário geral aplicado à população. O formato curto do Questionário Internacional de Actividade Física (296) serviu de referência às questões elaboradas. A actividade física foi classificada em três níveis: elevado, moderado e baixo. O nível mais elevado de actividade física foi definido pela prática de actividade física vigorosa ou pela combinação de caminhadas com exercício físico moderado em cinco ou mais dias por semana durante pelo menos 30 min por sessão. O nível moderado corresponde à prática de exercício físico vigoroso durante três ou mais dias por semana pelo menos 20 min por sessão ou caminhadas e actividades físicas moderadas durante cinco dias por semana pelo menos 30 min por sessão ou ainda a soma de qualquer tipo de actividade física durante cinco dias e pelo menos 150 min por semana. O nível mais baixo de actividade física foi estabelecido para pessoas que não praticam exercício físico ou que não atinjam os critérios estabelecidos para o nível moderado.

A consulta da ficha clínica dos diabéticos participantes permitiu obter a informação referente aos anos de evolução da diabetes, à presença de complicações angiopáticas e de insulino dependência.

A pressão arterial e os batimentos cardíacos foram medidos no braço esquerdo após 10 min de descanso e com o participante na posição sentada. Para esta medição fisiológica foi utilizado um medidor de tensão arterial de pulso R6 (HEM-6052-E) da Omron® (OMRON Management Center of America, Inc., Schaumburg, USA). O resultado médio de duas medições foi avaliado (Anexo VII). A hipertensão foi definida para uma pressão arterial sistólica (PAS)  $\geq 140$  mmHg e/ou uma pressão arterial diastólica (PAD)  $\geq 90$  mmHg durante a colheita de dados e mesmo para os participantes que estivessem a fazer tratamento anti-hipertensivo (297).

#### *3.3.2. Antropometria e composição corporal*

Todas as medições antropométricas foram efectuadas de acordo com procedimentos padrão internacionais e com equipamentos calibrados (298,299). Os dados antropométricos colhidos foram: peso, altura, perímetro abdominal (PA) e pregas cutâneas (tricipital, subescapular, abdominal e suprailíaca) (Anexo VII). O peso foi medido em quilogramas com uma precisão de

100 g utilizando uma balança BF552 da marca Tanita® (Tanita Corporation of America, Inc., Illinois, USA) e com o participante a usar roupas leves, posicionado no centro da plataforma e a olhar em frente. A altura foi registada com uma precisão de 5 mm utilizando um estadiómetro de ultrasons da marca ADE® (ADE GmbH & Co., Hamburg, Deutschland). Esta medição foi efectuada com o participante descalço, na posição antropométrica (peso distribuído sobre os dois pés e cabeça orientada segundo o plano de Frankfurt) (298), sobre uma superfície lisa perpendicular ao estadiómetro e usando pouca roupa no momento da medição para que fosse visível a posição do seu corpo. O IMC foi calculado de acordo com a equação  $\text{peso}/(\text{altura})^2$  ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). O resultado obtido foi comparado com o valor de referência da OMS (300). O PA foi medido na região umbilical ao nível do maior volume anterior (abdominal). O instrumento de medição utilizado foi uma fita métrica inextensível. A fita métrica foi colocada numa posição horizontal perfeita em relação ao plano definido pelo solo ou perpendicularmente ao eixo longitudinal do segmento que estamos a medir. De acordo com a OMS, a obesidade abdominal foi definida para um PA >102 cm nos homens e PA >88 cm nas mulheres (300). Foi também considerado obesidade quando se verificou um IMC  $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$  e excesso de peso para um IMC  $\geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$  e  $< 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ . A obesidade foi dividida de acordo com as seguintes classes: obesidade de classe I: IMC  $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$  e  $< 35 \text{ kg}/\text{m}^2$ ; obesidade de classe II: IMC  $\geq 35 \text{ kg}/\text{m}^2$  e  $< 40 \text{ kg}/\text{m}^2$ ; e obesidade de classe III: IMC  $\geq 40 \text{ kg}/\text{m}^2$ .

Todas as pregas cutâneas foram medidas em triplicado no hemi-corpo direito do avaliado, utilizando o dedo indicador e o polegar da mão esquerda para diferenciar o tecido adiposo subcutâneo do tecido muscular, com uma precisão de 0,1 mm e utilizando um adipómetro da marca Harpenden® (John Bull British Indicators Ltd., Herts, England). A prega tricipital foi medida na linha média da parte superior do braço, a meio caminho entre o ombro e o cotovelo. A prega subescapular é uma prega oblíqua média, que se situa 20 mm abaixo da extremidade inferior da omoplata. A prega suprailíaca foi medida 20 mm acima da crista ilíaca, 20 mm afastada da linha mediana e que coincide com uma linha imaginária descida da linha axilar anterior. A prega abdominal é uma prega vertical medida a uma distância lateral de aproximadamente 3 cm e 1 cm abaixo do ponto médio do umbigo (298,299). A composição corporal de todos os participantes (Anexo VII) foi avaliada pelo método de BIA, para isso foi utilizado um analisador tetrapolar de frequência única (50 kHz) da marca Maltron (BF-907, Maltron International Ltd, UK). A aplicação do método BIA foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante e da Sociedade Europeia para a Nutrição Clínica e Metabolismo (132,301). Todas as medições foram efectuadas no hemi-corpo direito dos participantes, na posição de decúbito dorsal sobre uma superfície não condutora e à temperatura ambiente. Os eléctrodos foram colocados nas superfícies dorsais das mãos e pés ligeiramente afastados do tronco. Na mão, o eléctrodo distal foi colocado na base do dedo médio e o eléctrodo proximal coincidindo com a zona central do pulso. No pé, o eléctrodo distal foi colocado entre o terceiro e segundo dedos junto à união com o pé e o eléctrodo proximal numa zona central do

tornozelo. Durante a execução das medições de BIA, foi considerado factor de exclusão para todos os grupos a presença de *pacemakers* ou qualquer tipo de peças metálicas existentes no corpo. A aplicação do método BIA permitiu obter resultados referentes à percentagem de GC, percentagem de massa magra (MM) e de água corporal total (ACT). A percentagem de GC foi também calculada pela aplicação de diversas equações antropométricas (Tabela 2). Dessas equações podem distinguir-se três grupos: 1) equações que utilizam directamente as medidas das pregas cutâneas (302-304); 2) equações que estimam a GC com base no IMC, idade e género (305-309); 3) equações que calculam a percentagem GC a partir da respectiva densidade corporal (310,311). A percentagem de GC dos participantes foi calculada pelos diferentes métodos descritos e os resultados obtidos comparados com os valores de referência definidos pela OMS (312). A prevalência de participantes com excesso de GC foi calculada para cada grupo e comparada entre os grupos.

**Tabela 2.** Equações antropométricas utilizadas para calcular a percentagem de gordura corporal na população em estudo.

Equação	Referências	Equações antropométricas
Lohman (1986)	(302)	$\%GC = [1,35(\text{Tric} + \text{Subsc}) - 0,012(\text{Tric} + \text{Subsc})^2 \times I] / 100$
Boileau (1985)	(303)	M: $\%GC = [1,35(\text{Tric} + \text{Subsc}) - 0,012(\text{Tric} + \text{Subsc})^2] - 4,4$ F: $\%GC = [1,35(\text{Tric} + \text{Subsc}) - 0,012(\text{Tric} + \text{Subsc})^2] - 2,4$
Faulkner (1968)	(304)	$\%GC = [0,153\Sigma(\text{Tric} + \text{Subsc} + \text{Suprai} + \text{Abdo})] + 5,783$
Deurenberg (1991)	(305)	$\%GC = 1,20(\text{IMC}) + 0,23(I) - (10,8 \times \text{género}^*) - 5,4$
Deurenberg (1998)	(306)	$\%GC = 1,29(\text{IMC}) + 0,20(I) - (11,4 \times \text{género}^*) - 8$
Gallagher (1996)	(307)	$\%GC = 1,46(\text{IMC}) + 0,14(I) - (11,6 \times \text{género}^*) - 10$
Jackson & Pollock (1980)	(308)	$\%GC = 1,61(\text{IMC}) + 0,13(I) - (12,1 \times \text{género}^*) - 13,9$
Heritage study (2002)	(309)	$\%GC = 1,39(\text{IMC}) + 0,16(I) - (10,34 \times \text{género}^*) - 9$
Siri (1961)	(311)	$\%GC = [(4,95/\text{DC}^a) - 4,5] \times 100$

<sup>a</sup>During & Womersley (310). Abdo, prega cutânea abdominal (mm).

\*Género: Masculino = 1 e Feminino = 0.

%GC, percentagem de gordura corporal; DC, densidade corporal; I, idade (anos); IMC, índice de massa corporal ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ); F, feminino; M, masculino; Subsc, prega cutânea subescapular (mm);  $\Sigma$ , somatório; Suprai, prega cutânea supraílica (mm); Tric, prega cutânea tricipital (mm).

### 3.3.3. Alimentares

A recolha de informação quantitativa sobre o consumo alimentar da população em estudo no período dos 12 meses antecedentes à data da entrevista foi obtida pela aplicação de um QFA. O referido questionário foi previamente desenvolvido e validado para a população adulta Portuguesa (313) no Serviço de Higiene e Epidemiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, tendo como modelos o QFA desenhado por Willet *et al.* (119) e o questionário desenvolvido no Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina da Universidade de Alicante (314). O QFA utilizado é composto por uma lista de alimentos ou

grupos de alimentos, com 82 itens alimentares, uma secção fechada com nove categorias de frequências de consumo e uma secção aberta para o registo de alimentos não referenciados e consumidos numa frequência de pelo menos uma vez por semana. A aplicação deste questionário à população estudada permitiu também obter informação sobre a sazonalidade do consumo dos diversos alimentos listados e as quantidades consumidas de cada alimento de acordo com porções médias padrão. Foi utilizado um manual fotográfico (315) como suporte visual para a identificação de múltiplos e submúltiplos da porção média. A conversão dos alimentos em nutrientes foi efectuada utilizando como base o programa informático *Food Processor Plus*<sup>®</sup> (ESHA Research, Salem, Oregon, 1997), baseado na *USDA National Nutrient Database for Standard Reference* do *United States Department of Agriculture* que contém informação nutricional de cerca de 14000 alimentos. Para os alimentos consumidos que não constavam nestas tabelas ou para aqueles em que a composição nutricional era diferente da estimada para os alimentos Portugueses, os valores de composição foram obtidos a partir da última versão da Tabela da Composição de Alimentos (316). Os dados foram analisados estatisticamente com o objectivo de conhecer as diferenças entre os três grupos em estudo no que se refere à ingestão média diária de nutrientes. Os valores de ingestão obtidos para vitaminas e minerais foram comparados com os valores das DRI's publicados pelo *National Institute of Medicine* (317). A prevalência de inadequação da ingestão de micronutrientes foi calculada para todos o grupos e os valores obtidos foram comparados.

#### *3.3.4. Bioquímicos*

As amostras de plasma para o doseamento de homocisteína, cisteína e vitamina B<sub>6</sub> foram obtidas a partir de sangue colhido para tubo de sistema fechado com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Vacutainer Tubes, Sarstedt, Portugal). As amostras de plasma para o doseamento de vitamina C foram obtidas a partir de sangue colhido para tubo de sistema fechado com heparinato de lítio da Sarstedt. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas a 2000 x g durante 15 min. O plasma obtido foi então removido, dividido em alíquotas e congelado a -80 °C. Para as amostras de plasma heparinizado, o período máximo de armazenamento a -80 °C foi de 2 semanas.

As amostras de soro para o doseamento de malondialdeído, carotenóides, ácido fólico e vitaminas A, E e B<sub>12</sub> foram obtidas a partir de sangue colhido para tubo de sistema fechado sem anticoagulante da Sarstedt. O sangue foi imediatamente centrifugado a 2000 x g durante 15 min. O soro obtido foi removido, dividido em alíquotas e congelado a -80 °C. Foi solicitado aos participantes que disponibilizassem informação ou facultassem o acesso às últimas análises de rotina. Foi recolhida informação dos seguintes dados bioquímicos: glucose, hemoglobina glicosilada, colesterol total (CT), C-LDL, C-HDL, triglicéridos e hemograma. Definiu-se como dislipidemia quando uma das seguintes situações estava presente: triglicéridos (TG) ≥150 mg/dL, C-LDL ≥100 mg/dL, C-HDL ≤40 mg/dL nos homens ou ≤50

mg/dL nas mulheres (152). O controlo metabólico da diabetes foi classificado como insatisfatório quando o valor de HbA1C era >7% (152).

### **3.4. Análises bioquímicas**

#### **3.4.1. Desenvolvimento e optimização dos métodos bioquímicos**

##### **3.4.1.1. Doseamento da homocisteína e cisteína**

###### **3.4.1.1.1. Reagentes e soluções**

O padrão de DL-Hcy com pureza  $\geq 95\%$ , dihidrogenofosfato de potássio e EDTA foram obtidos na Sigma (St. Louis, MO, EUA). Tris-(2-carboxietil)-fosfina (TCEP) e 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato (SBD-F) foram adquiridos na Sigma ou na Fluka (Buchs, Suíça). O padrão de L-Cys com pureza  $\geq 99\%$  foi adquirido na Panreac (Montcada, Barcelona, Espanha), enquanto o acetonitrilo para HPLC foi comprado no Carlo Erba Reagenti (Rodano, Itália). Todos os outros reagentes foram obtidos na Merck (Darmstadt, Alemanha). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida a partir de um equipamento de filtração de água Milli-Q (Millipore Corporation, Bedford, EUA). As soluções de TCEP (174 mM) e SBD-F (4,25 mM) foram protegidas da luz, divididas respectivamente em alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  e 60  $\mu\text{L}$  e armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A solução de ácido tricloroacético (612 mM) com EDTA (1,98 mM) foi colocada num banho de ultrassons durante 15 min para garantir a sua completa dissolução e mantida à temperatura ambiente. A solução de tampão de borohidreto de sódio (125 mM) com EDTA (4,0 mM) e valor de pH 9,5 ajustado com hidróxido de sódio (1,5 M) foi preparada semanalmente e armazenada a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

###### **3.4.1.1.2. Preparação de soluções padrão**

As soluções *stock* de Hcy (600  $\mu\text{M}$ ) e de Cys (600  $\mu\text{M}$ ) foram preparadas com uma solução 5 mM de ácido clorídrico (37%). A Cys tem uma solubilidade moderada em soluções aquosas e por isso foi necessário colocar a solução *stock* durante 15 min num banho de ultrassons para garantir a sua completa dissolução. As soluções *stock* de Hcy e Cys foram divididas em alíquotas e armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As soluções padrão de trabalho foram preparadas diariamente a partir da solução *stock* diluída com uma solução de ácido clorídrico (5 mM) para obter as concentrações finais de Hcy (1, 10, 20, 30, 40, 50 e 60  $\mu\text{M}$ ) e Cys (150, 175, 200, 225, 250, 275 e 300  $\mu\text{M}$ ). De seguida os padrões foram tratados de acordo com o descrito no procedimento de tratamento da amostra.

###### **3.4.1.1.3. Tratamento da amostra**

Cem microlitros de plasma foram misturados com 30  $\mu\text{L}$  de TCEP (174 mM). Esta mistura foi incubada durante 10 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  para reduzir os compostos aminotióis e libertá-los das ligações proteicas. A desproteínização foi obtida pela adição de 150  $\mu\text{L}$  da solução de ácido

tricloroacético (100 g/L), seguida de centrifugação a 11 000 x g durante 10 min a 20 °C. Cinquenta microlitros do sobrenadante obtido foram misturados com 10 µL de uma solução de hidróxido de sódio (1,55 M), 125 µL de tampão borato (125 mM) a pH 9,5, contendo 4 mM de EDTA e 50 µL SBD-F (1 g/L). A mistura foi colocada numa incubadora durante 40 min a 60 °C para garantir a total derivatização. Depois de arrefecida a 4 °C durante 10 min, a mistura foi filtrada com um filtro de seringa com diâmetro de poro de 0,22 µm em fluoreto de polivinilideno (PVDF) da Millipore.

#### 3.4.1.1.4. Condições cromatográficas

A separação e quantificação dos aminotióis foi realizada no sistema de UPLC<sup>®</sup> Acquity (Waters, Milford, EUA) equipado com uma coluna analítica Supelcosil<sup>™</sup> LC-18-DB (150 x 4,6 mm diâmetro interno, 3 µm tamanho de partícula) da Supelco (Bellefonte, PA, EUA) protegida com uma pré-coluna Supelcosil<sup>™</sup> LC 18-DB (20 x 2,1 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula). A fluorescência foi medida utilizando um detector de fluorescência Acquity<sup>®</sup> a um comprimento de onda de excitação de 385 nm e emissão de 515 nm. O sinal de emissão da fluorescência foi registado e as áreas dos picos de Hcy e Cys foram quantificadas e processadas utilizando o *software* Empower<sup>™</sup> versão 2.0 (Waters, Milford, EUA). A fase móvel foi constituída por dihidrogenofosfato de potássio monobásico (30 mM) a pH 2,1 (ajustado com ácido ortofosfórico a 85%), contendo 40 mL/L acetonitrilo. A fase móvel foi filtrada com um filtro de membrana em polipropileno hidrofílico (GHP) de 0,22 µm da Pall e depois desgaseificada durante 30 min. O tempo total de análise foi de 10 min a um fluxo de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 20 °C e a do injector automático a 6 °C. Foram injectados 10 µL de padrão ou amostra no sistema de separação de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC).

#### 3.4.1.1.5. Optimização do método

Durante a optimização do método foi testado o tempo da reacção de derivatização. O tempo total da reacção foi testado para 10 min, 40 min e 60 min. Os resultados dos três procedimentos foram analisados e comparados. A composição da fase móvel foi também optimizada. Foram testadas diferentes percentagens de acetonitrilo (4 - 8%) e concentrações de tampão fosfato (30 - 100 mM). O pH da fase aquosa foi também optimizado, sendo 2,1 o valor de pH considerado mais adequado para obter uma intensidade de fluorescência máxima, já que os derivados de Hcy e Cys que se formam durante a reacção de derivatização têm fluorescência máxima em meio ácido. Foram testados e comparados dois equipamentos cromatográficos: um sistema de UPLC<sup>®</sup> Acquity e um sistema de HPLC Alliance<sup>®</sup> 2695, ambos da Waters, Milford, MA, USA. Vários parâmetros foram testados: (a) volume de injeção (10, 20 e 30 µL); (b) fluxo (0,8, 1,0 e 1,5 mL/min); (c) temperatura do injector automático (6, 8 e 15 °C); (d) temperatura da coluna (20, 25 e 30 °C).

### 3.4.1.2. Doseamento da vitamina B<sub>6</sub>

#### 3.4.1.2.1. Reagentes e soluções

O dihidrogenofosfato de potássio, o piridoxal-5-fosfato (PLF) com pureza ≥98%, o piridoxal (PL) com pureza ≥99%, a piridoxamina (PXM) com pureza ≥98% e a piridoxina (PXN) com pureza ≥98% foram obtidos na Sigma. O perclorato de sódio foi adquirido na Fluka, enquanto o acetonitrilo para HPLC, bissulfito de sódio, ácido ortofosfórico a 85% e o ácido perclórico a 70% foram comprados na Merck. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida a partir de um equipamento de filtração de água Milli-Q. Depois de preparadas, as soluções de ácido foram mantidas à temperatura ambiente.

#### 3.4.1.2.2. Preparação de soluções padrão

A solução *stock* do PLF (1 mg/mL) foi preparada diariamente com uma solução 0,1 M de ácido perclórico (70%). O PLF tem uma solubilidade moderada em soluções aquosas e por isso foi necessário colocar a solução *stock* durante 10 min num banho de ultrasons para garantir a sua completa dissolução. As soluções padrão de trabalho foram preparadas diariamente a partir da solução *stock* diluída com água ultrapura para obter as concentrações finais de PLF (10, 50, 90, 130, 170 e 210 nM). Depois de preparadas as soluções padrão (que correspondem às seis concentrações finais da recta de calibração), foram retirados de cada uma delas, 500 µL para um microtubo e adicionados 500 µL da solução de ácido perclórico 0,1 M. De seguida, os padrões foram tratados de acordo com o descrito no procedimento de tratamento da amostra.

#### 3.4.1.2.3. Tratamento da amostra

Trezentos microlitros de plasma foram misturados com 300 µL da solução de ácido perclórico (0,8 M). Esta mistura foi agitada num vortex durante 1 min, de seguida foi centrifugada a 18400 x g durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi imediatamente removido e a amostra filtrada com um filtro de seringa de 0,45 µm em PVDF da Millipore e 50 µL foram injectados no sistema de cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC).

#### 3.4.1.2.4. Condições cromatográficas

A optimização e validação do método foram realizadas num sistema de HPLC Alliance<sup>®</sup> 2695 da Waters (Milford, MA, EUA) equipado com uma coluna analítica Synergi<sup>™</sup> Hydro RP (150 × 4,6 mm diâmetro interno, 4 µm tamanho de partícula) da Phenomenex (Torrance, California, EUA) protegida com uma pré-coluna AQ C18 (40 × 2,0 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula). A fluorescência foi medida utilizando um detector de fluorescência Alliance<sup>®</sup> 2475 (Waters, Milford, MA) a um comprimento de onda de excitação de 290 nm e emissão de 400 nm. O sinal de emissão da fluorescência foi registado, a área do pico de PLF quantificada e processada utilizando o *software* Empower<sup>™</sup> versão 2.0. A fase móvel foi constituída por uma solução aquosa de perclorato de sódio (100 nM), dihidrogenofosfato de potássio (100 mM) e

bissulfito de sódio (1 g/L) a pH 3,0 (ajustado com ácido ortofosfórico a 5%). Para garantir uma completa dissolução de todos os reagentes da fase móvel, dissolveu-se primeiro o perclorato e só depois o dihidrogenofosfato de potássio. A fase móvel foi filtrada com um filtro de membrana em GHP de 0,45 µm da Pall e depois desgaseificada durante 30 min. O tempo total de análise foi de 4 min a um fluxo de 0,8 mL/min. As temperaturas da coluna e do injector automático foram mantidas a 8 °C. Após o tempo de corrida (4 min) para cada injeção da amostra foi realizada uma limpeza parcial da coluna para evitar a presença de picos resultantes de substâncias interferentes existentes na amostra e que pudessem surgir na injeção seguinte. Para isso estabeleceu-se um gradiente linear durante 10 min a um fluxo de 0,8 mL/min, com 100% de água ultrapura durante 2 min, depois uma passagem para 70:30 (v/v) de água ultrapura/acetoneitrilo durante 2 min, voltando a 100% de água ultrapura durante 2 min. De seguida, a coluna foi colocada a equilibrar durante 4 min antes da injeção seguinte para garantir a sua estabilização e para o detector regressar à linha de base da fluorescência.

#### *3.4.1.2.5. Optimização do método*

Foi realizado um varrimento no detector de fluorescência para definir os comprimentos de onda de emissão e de excitação máximos para os vitâmeros da B<sub>6</sub>. Diversas concentrações de tampão fosfato (30-100 mM) e de valor de pH (2,5; 3,0; 3,5) da fase móvel foram testados. O desempenho das seguintes colunas cromatográficas foi avaliado: (1) Purospher® STAR RP-18 endcapped (150 x 4,6 mm diâmetro interno, 4 µm tamanho de partícula) da Merck, protegida com uma pré-coluna LiChroCART® (40 x 4,0 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula); (2) Atlantis T3® (150 x x 4,6 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula) da Waters, protegida com uma pré-coluna Atlantis T3® Sentry (20 x 4,6 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula); (3) Hypersil GOLD™ C18 (150 x 4,6 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula) da Thermo Hypersil-Keystone LLC, protegida com uma pré-coluna (40 x 4,0 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula); (4) Aquasil™ C18 (150 x 4,6 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula) da Thermo Hypersil-Keystone LLC (Bellefonte, EUA), protegida com uma pré-coluna Aquasil™ C18 (10 x 4,6 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula); e (5) Synergi™ Hydro-RP (150 x 4,6 mm diâmetro interno, 4 µm tamanho de partícula) da Phenomenex protegida com uma pré-coluna AQ C18 (40 x 2,0 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula). O volume de injeção, o fluxo e as temperaturas da coluna e do injector automático foram outros dos parâmetros otimizados.

#### *3.4.1.3. Doseamento da vitamina C*

##### *3.4.1.3.1. Reagentes e soluções*

O padrão de ácido L-ascórbico (AA) com pureza ≥97% foi adquirido na Riedel-de Haëen (Seelze, Alemanha). O ácido metafosfórico foi obtido na Prolabo (Mollet del Vallés, Barcelona, Espanha), enquanto o ácido perclórico a 70%, ácido ortofosfórico e o dihidrogenofosfato de

amónio foram comprados na Merck. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida a partir do sistema de purificação Milli-Q. A solução de estabilização e desproteção foi preparada misturando ácido perclórico a 10% (v/v) com ácido metafosfórico a 1% (p/v).

#### *3.4.1.3.2. Preparação de soluções padrão*

A solução padrão *stock* de AA (1 mg/mL) foi preparada diariamente. As soluções padrão de trabalho do AA foram obtidas directamente a partir da solução *stock* com as concentrações finais de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL. De seguida os padrões foram tratados de acordo com o descrito no procedimento de tratamento da amostra.

#### *3.4.1.3.3. Tratamento da amostra*

Trezentos microlitros de plasma heparinizado foram misturados com 300 µL da solução de estabilização. Esta mistura foi agitada num vortex durante 1 min e de seguida colocada a 4 °C durante 60 min. Depois foi centrifugada a 10 400 x *g* durante 25 min a 4 °C. Trezentos microlitros do sobrenadante foram imediatamente removidos aos quais foram adicionados 300 µL de fase móvel. A amostra foi filtrada com um filtro de seringa de 0,22 µm em GHP da Pall e 10 µL foram injectados no sistema de UPLC<sup>®</sup>. Após o tempo de corrida (5 min) para cada injeção da amostra foi realizada uma limpeza parcial da coluna para evitar a presença de picos resultantes de impurezas existente e que pudessem surgir na injeção seguinte. Para isso estabeleceu-se um gradiente linear durante 10 min a um fluxo de 0,8 mL/min, com 100% de água ultrapura durante 2 min, depois uma passagem para 70:30 (v/v) de água ultrapura/acetonitrilo durante 2 min, voltando a 100% de água ultrapura durante 2 min. De seguida a coluna é colocada a equilibrar durante 4 min antes da injeção seguinte da amostra para garantir a estabilização da linha de base do detector.

#### *3.4.1.3.4. Condições cromatográficas*

A optimização e validação do método foram realizadas num sistema de UPLC<sup>®</sup> Acquity equipado com uma coluna analítica Synergi<sup>™</sup> Hydro-RP (150 x 4,6 mm diâmetro interno, 4 µm tamanho de partícula) da Phenomenex protegida com uma pré-coluna AQ C18 (40 x 2,0 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula). O sinal de detecção do AA foi obtido a partir de um detector de díodos (DAD) Acquity<sup>®</sup> a 254 nm. A área do pico foi quantificada, utilizando o *software* Empower<sup>™</sup> versão 2.0. A fase móvel foi constituída por dihidrogenofosfato de amónio (20 mM) a pH 3,5 (ajustado com ácido ortofosfórico a 85%), contendo 0,015% de ácido metafosfórico (p/v). A fase móvel foi filtrada com um filtro de membrana em GHP de 0,22 µm da Pall e depois desgaseificada durante 30 min. O tempo total de análise foi de 5 min com um fluxo de 0,8 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 20 °C e a do injector automático 4 °C.

#### 3.4.1.3.5. *Optimização do método*

Foi avaliada a estabilidade da amostra após congelação a -80 °C com e sem a adição da solução de estabilização durante 24 h, 48 h, 1 semana e 2 semanas. No que se refere à fase móvel, o pH foi otimizado e foram testadas diferentes concentrações de tampão fosfato (10 - 30 mM). Foram ainda otimizados os seguintes parâmetros: (a) volume de injeção (10, 30 e 50 µL); (b) fluxo (0,5, 0,8 e 1,0 mL/min); (c) temperatura da coluna (20, 30 e 35 °C); (d) temperatura do injector automático (4, 6, e 8 °C).

#### 3.4.1.4. Doseamento do MAD

##### 3.4.1.4.1. *Reagentes e soluções*

1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) com pureza de 97% e o dihidrogenofosfato de potássio foram obtidos na Sigma. O metanol para HPLC, ácido ortofosfórico (85%), ácido clorídrico fumegante (37%) e ácido perclórico a 70% foram comprados na Merck. As soluções de ácido perclórico a 0,8 M e de ácido clorídrico a 0,1 M foram preparadas semanalmente com água ultrapura e mantidas à temperatura ambiente.

##### 3.4.1.4.2. *Preparação de soluções padrão*

A solução padrão *stock* de MAD (93,13 µM) foi preparada a partir da hidrólise (100 °C durante 5 min) de uma solução de TEP (1 µg/mL) preparada com ácido clorídrico 0,1 M. A solução padrão foi rapidamente arrefecida em água. As soluções padrão de trabalho foram preparadas diariamente a partir da solução *stock* diluída com água ultrapura para obter as concentrações finais de MAD (0,3, 0,8, 1,3, 1,8, 2,3, 2,8, e 3,3 µM). De seguida os padrões foram tratados de acordo com o descrito no procedimento de tratamento da amostra.

##### 3.4.1.4.3. *Tratamento da amostra*

Uma alíquota de soro (50 µL) foi desproteïnizada com 250 µL de ácido perclórico a 0,8 M e diluída com 700 µL de água ultrapura. A amostra foi agitada num vortex durante 1 min e de seguida centrifugada a 5 000 x g durante 5 min a 20 °C. O sobrenadante foi imediatamente removido e filtrado com um filtro de seringa de 0,22 µm em GHP da Pall e 20 µL foram injectados no sistema de UPLC®.

##### 3.4.1.4.4. *Condições cromatográficas*

A optimização e validação do método foram realizadas num sistema de UPLC® Acquity equipado com uma coluna analítica Synergi™ Hydro-RP (150 × 4,6 mm diâmetro interno, 4 µm tamanho de partícula) da Phenomenex protegida com uma pré-coluna AQ C18 (40 × 2,0 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula). O sinal de detecção do MAD foi obtido utilizando um detector de DAD Acquity® a 254 nm. A área do pico foi quantificada, utilizando o *software*

Empower™ versão 2.0. A fase móvel foi constituída por dihidrogenofosfato de potássio (30 mM) a pH 4,0 (ajustado com ácido ortofosfórico a 85%), contendo 5% de metanol (v/v). A fase móvel foi filtrada com um filtro de membrana em GHP de 0,22 µm da Pall e depois desgaseificada durante 30 min. O tempo total de análise foi de 6 min com um de fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 20 °C e a do injector automático 6 °C.

#### *3.4.1.4.5. Optimização do método*

Inicialmente foi testado um outro método de HPLC com detecção por fluorescência para o doseamento de MAD no soro. O referido método é muito comum para avaliar a peroxidação lipídica e baseia-se na utilização do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) que reage com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos em meio ácido (pH 1 - 2) a temperaturas elevadas (100 °C). Um dos principais produtos formados neste processo oxidativo é o MAD. Em resumo o método consiste na reacção entre 50 µL soro e 100 µL de uma solução de TBA com 42 mM utilizando uma solução de ácido fosfórico a 0,44 M e uma solução de etanol a 95% (v/v) com 0,05% de hidroxitolueno butilado (BHT). De seguida a mistura foi agitada num vortex durante 1 min e incubada a 100 °C durante 60 min. Depois de formado o complexo fluorescente MAD-TBA, a amostra foi arrefecida em gelo e foram adicionados 250 µL de n-butanol para extrair o complexo. Posteriormente, a amostra foi agitada durante 5 min no vortex e centrifugada (19 957 x g durante 3 min a 20 °C). Um volume de 100 µL do sobrenadante foi filtrado com um filtro de seringa de 0,22 µm em GHP da Pall e 10 µL foram injectados no sistema de UPLC®. No que se refere às condições cromatográficas, a fase móvel foi composta por metanol/dihidrogenofosfato de potássio monobásico 50 mM a pH 6,8 com hidróxido de potássio 5 M (40:60,v/v). A fluorescência do complexo MAD-TBA foi medida utilizando um detector de fluorescência Acquity® com um comprimento de onda de excitação a 385 nm e de emissão a 515 nm. Após verificação que o método de HPLC com detecção por fluorescência não tinha a sensibilidade e especificação requeridas, foi necessário iniciar o processo de desenvolvimento e optimização de outro método de HPLC. O método escolhido tem detecção por UV e durante a validação do método foi comprovada a sua sensibilidade e especificidade. Em ambos os métodos foram testadas as seguintes condições cromatográficas: Colunas de HPLC: 1) Hypersil™ ODS C18 (150 x x 4,6 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula) da Thermo Hypersil-Keystone LLC, protegida com uma pré-coluna Hypersil™ ODS C18 (10 x 4,0 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula) e 2) Synergi™ Hydro-RP (150 x 4,6 mm diâmetro interno, 4 µm tamanho de partícula) da Phenomenex, protegida com uma pré-coluna AQ C18 (40 x 2,0 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula). No que se refere à fase móvel, o pH foi optimizado e foram testadas diferentes concentrações de tampão fosfato (10 - 30 mM). Foram ainda optimizados os seguintes parâmetros: (a) volume de injeção (10, 20 e 30 µL); (b) fluxo (0,5, 0,8 e 1,0 mL/min); (c) temperatura da coluna (20, 30 e 37 °C) e (d) temperatura do injector automático (4, 6, e 8 °C).

### 3.4.1.5. Doseamento das vitaminas A e E e carotenóides

#### 3.4.1.5.1. Reagentes e soluções

O *all-trans* retinol (pureza  $\geq 95\%$ ), o  $\beta$ -caroteno (pureza  $\geq 95\%$ ), o  $\alpha$ -tocoferol (pureza  $\geq 96\%$ ), o licopeno (pureza 90-95%) e a luteína (pureza  $\geq 75\%$ ) foram obtidos na Sigma. A zeaxantina (pureza  $\geq 97\%$ ),  $\beta$ -criptoxantina (pureza  $\geq 97\%$ ) e o  $\alpha$ -caroteno (pureza  $\geq 97\%$ ) foram adquiridos na CaroteNature (Lupsingen, Switzerland). O etanol absoluto foi adquirido no Carlo Erba Reagenti. O n-hexano, metanol, acetonitrilo e diclorometano para HPLC foram comprados na Merck. O BHT com pureza  $\geq 99\%$  foi obtido na Fluka. Foram preparadas previamente as seguintes soluções: etanol absoluto com 0,01% (p/v) de BHT e n-hexano com 0,01% (p/v) de BHT. Depois de preparadas, as duas soluções foram mantidas à temperatura ambiente. Durante o procedimento experimental, os padrões e as amostras foram protegidos da luz e sua oxidação foi prevenida pela adição de BHT. A água ultrapura utilizada na fase móvel foi obtida a partir do sistema de purificação Milli-Q.

#### 3.4.1.5.2. Preparação de soluções padrão

As soluções *stock* foram preparadas de acordo com os solventes descritos na Tabela 3 e com as seguintes concentrações: retinol (0,5 mg/mL);  $\alpha$ -tocoferol (1,6 mg/mL); luteína (0,02 mg/mL); zeaxantina (0,02 mg/mL);  $\beta$ -criptoxantina (0,02 mg/mL); licopeno (0,05 mg/mL);  $\alpha$ -caroteno (0,04 mg/mL) e  $\beta$ -caroteno (0,1 mg/mL). As soluções foram divididas em alíquotas de 3 mL e congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 meses. Em cada dia de análise, as soluções *stock* das vitaminas e dos carotenóides foram descongeladas, diluídas apropriadamente e as suas concentrações foram confirmadas pela leitura da absorvência no espectrofotómetro UV-Vis *Evolution 300 optics* da Thermo Electron Scientific Instruments LLC (Madison, EUA) e pela aplicação da equação da Lei de Lambert-Beer. Na Tabela 3 estão descritos os coeficientes de extinção ( $\epsilon$ ), comprimentos de onda ( $\lambda_{\text{máx.}}$ ) que correspondem ao máximo de absorvência e os solventes utilizados na preparação das soluções padrão.

As rectas de calibração das vitaminas e carotenóides foram preparadas em seis níveis de concentração e de acordo com as seguintes gamas de trabalho: retinol (1, 1,8, 2,6, 3,4, 4,2 e 5  $\mu\text{M}$ );  $\alpha$ -tocoferol (5, 20, 35, 50, 65 e 80  $\mu\text{M}$ ); luteína, licopeno e  $\beta$ -caroteno (0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5 e 1,8  $\mu\text{M}$ );  $\beta$ -criptoxantina (0,1, 0,44, 0,78, 1,12, 1,46 e 1,80  $\mu\text{M}$ ) zeaxantina e  $\alpha$ -caroteno (0,03, 0,06, 0,09, 0,12, 0,15 e 0,18  $\mu\text{M}$ ). Cada uma das seis soluções de trabalho individuais continha a mistura padrão de retinol,  $\alpha$ -tocoferol e de seis carotenóides. Essas soluções foram preparadas em cada dia de trabalho a partir da diluição directa da solução *stock* e utilizando como solvente a fase móvel.

**Tabela 3.** Coeficientes de extinção ( $\epsilon_{1cm}^{1\%}$ ), solventes e comprimentos de onda máximos ( $\lambda_{m\acute{a}x.}$ ) para as vitaminas A e E e carotenóides.

Padrão	( $\epsilon_{1cm}^{1\%}$ )	$\lambda_{m\acute{a}x.}$ (nm)	Solvente	Referência
Retinol	1835	325	etanol absoluto	(318)
$\alpha$ -Tocoferol	72	292	etanol absoluto	(319)
Luteína	2550	445	etanol absoluto	(319)
Zeaxantina	2540	450	etanol absoluto	(319)
$\beta$ -Criptoxantina	2486	452	etanol absoluto	(318)
Licopeno	3450	472	n-hexano	(318)
$\alpha$ -Caroteno	2710	445	n-hexano	(320)
$\beta$ -Caroteno	2560	450	n-hexano	(321)

#### 3.4.1.5.3. Tratamento da amostra

Uma alíquota de soro (400  $\mu$ L) foi desproteïnizada com 400  $\mu$ L de etanol absoluto contendo 0,01% de BHT (p/v). De seguida, a extracção da parte lipídica foi obtida pela adicção de 1 mL de n-hexano e agitaçção durante 15 min num vortex. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2500 x g durante 25 min a 4 °C. A camada superior de n-hexano foi imediatamente removida e evaporada em corrente de azoto até à secura. O resíduo foi dissolvido em 400  $\mu$ L de fase móvel e filtrado com um filtro de seringa do tipo GHP com um diâmetro de poro de 0,22  $\mu$ m da Pall. Por fim, 50  $\mu$ L foram injectados no sistema de UPLC®.

#### 3.4.1.5.4. Condições cromatográficas

A optimizaçção e validaçção do método foram realizadas num sistema de UPLC® Acquity equipado com uma coluna analítica Supelcosil™ LC-18-DB (150 x 4,6 mm diâmetro interno, 3  $\mu$ m tamanho de partícula) da Supelco protegida com uma pré-coluna Supelcosil™ LC 18-DB (20 x 2,1 mm diâmetro interno, 5  $\mu$ m tamanho de partícula). Foi utilizado um detector de DAD Acquity®, que captou o sinal do retinol a 325 nm, do  $\alpha$ -tocoferol a 292 nm e dos carotenóides a 450 nm. As áreas dos picos dos oito analitos foram quantificadas, utilizando o *software* Empower™ versão 2.0. A fase móvel foi composta pela seguinte mistura: acetonitrilo/metanol/diclorometano/água ultrapura (64/18/12/6, v/v/v/v). Depois de preparada, a fase móvel foi filtrada com um filtro de membrana em GHP de 0,22  $\mu$ m da Pall e depois degaseificada durante 30 min. O tempo total de análise foi de 25 min a um fluxo de 2,0 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C e a do injector automático a 6 °C.

#### 3.4.1.5.5. Optimizaçção do método

O método utilizado para o doseamento de vitamina A, E e carotenóides foi baseado no método de Lyan *et al.* (322), mas com a introduçção de algumas modificaçções. Inicialmente foram

preparadas soluções padrão dos compostos em estudo. Considerando os solventes descritos na Tabela 3 foi efectuado um varrimento (200 - 600 nm) no espectrofotómetro UV-Vis da Thermo Electron Scientific Instruments LLC, para verificar a pureza dos padrões e identificar o comprimento de onda que correspondia ao máximo de absorvência das soluções padrão do retinol,  $\alpha$ -tocoferol e carotenóides. No que se refere ao tratamento da amostra foram testadas diferentes proporções entre os volumes de soro e de etanol absoluto utilizado (1:1, v/v; 1:2 v/v; e 1:3, v/v). Para avaliar a eficácia da extracção dos analitos foram testados diferentes volumes de n-hexano (1, 2 e 4 mL) num processo com extracção única ou dupla. A reconstituição das amostras de soro foi também optimizada. Para isso, foram testadas as seguintes soluções: (1) diclorometano/metanol (65:35, v/v) com 0,01% (p/v) de BHT; (2) acetonitrilo/metanol/diclorometano/água ultrapura (60:20:13:7, v/v/v/v) com 0,01% (p/v) de BHT; (3) acetonitrilo/metanol/diclorometano (75:20:5, v/v/v) com 0,01% (p/v) de BHT; (4) acetonitrilo/metanol/diclorometano/água ultrapura (64:18:12:6, v/v/v/v). Durante a optimização foram testadas diferentes colunas cromatográficas. Inicialmente foi utilizado um sistema de duas colunas cromatográficas composto por uma coluna Alltima™ C18 (100 × 4,6 mm diâmetro interno, 3  $\mu$ m tamanho de partícula) da Grace Alltech® (Road Deerfield, EUA) acoplada com a coluna Vydac 201TP54 C18 (250 × 4,6 mm diâmetro interno, 5  $\mu$ m tamanho de partícula) da Grace/Vydac®. Este sistema de colunas analíticas foi utilizado com uma pré-coluna Alltima™ C18 (7,5 × 4,6 mm diâmetro interno, 5  $\mu$ m tamanho de partícula) da Grace Alltech®. Posteriormente e com o objectivo de manter a resolução e diminuir o tempo de retenção dos compostos em estudo foi utilizada a coluna analítica Supelcosil™ LC-18-DB (150 × 4,6 mm diâmetro interno, 3  $\mu$ m tamanho de partícula) da Supelco e uma pré-coluna Supelcosil™ LC 18-DB (20 × 2,1 mm diâmetro interno, 5  $\mu$ m tamanho de partícula). Os resultados obtidos pelo sistema das colunas Alltima™ C18 - Vydac 201TP54 C18 e pela coluna Supelcosil™ LC 18-DB foram comparados. Foram testadas as seguintes condições cromatográficas: (a) volume de injeção (30, 50 e 80  $\mu$ L); (b) fluxo (1,2, 1,5 e 2,0 mL/min); (c) temperatura da coluna (20, 30 e 37 °C); (d) temperatura do injectador automático (6, 8, e 10 °C).

#### 3.4.1.6. Doseamento da vitamina B<sub>12</sub>

Para o doseamento de vitamina B<sub>12</sub> foi utilizado um método de eletroquimioluminescência (ECL), tecnologia utilizada na execução dos imuno-ensaios que proporciona uma elevada sensibilidade analítica. O equipamento utilizado foi o Cobas e411 da Roche®. A célula de leitura deste equipamento utiliza a amplificação do sinal para determinação de concentrações muito reduzidas de analito, eliminando assim, o número de repetições e possibilitando resultados de qualidade. O método consiste num teste competitivo que utiliza um factor intrínseco específico para a vitamina B<sub>12</sub>. A vitamina na amostra compete com a vitamina B<sub>12</sub> adicionada marcada com biotina para os sítios de ligação do factor intrínseco marcado com ruténio. O tempo de análise é cerca de 27 min e consiste numa primeira incubação com 15  $\mu$ L de amostra

previamente tratada com três reagentes, ditiotreitól (1,028 g/L), hidróxido de sódio (40,0 g/L) e cianeto de sódio (2,205 g/L). Após adição dos reagentes, a vitamina B<sub>12</sub> ligada é libertada das proteínas de ligação endógenas. De seguida é realizada uma segunda incubação, utilizando a amostra pré-tratada e o factor intrínseco marcado com ruténio, formando-se assim, o complexo de proteína ligada à vitamina B<sub>12</sub>, sendo a quantidade de complexo formada directamente dependente da quantidade de vitamina B<sub>12</sub> na amostra. De seguida adicionam-se micropartículas revestidas de streptavidina e de vitamina B<sub>12</sub> marcada com biotina, para que os sítios não ligados do factor intrínseco da vitamina B<sub>12</sub> marcado com ruténio passem a estar ocupados com a vitamina B<sub>12</sub> marcada e para que o complexo passe a estar ligado a uma fase sólida através da ligação entre a biotina e a streptavidina. Já no equipamento de quimioluminescência, a mistura da reacção é aspirada para uma célula de medição onde as micropartículas são capturadas magneticamente para a superfície de um eléctrodo. A aplicação de uma voltagem ao eléctrodo induz a emissão de quimioluminescência que é medida por um fotomultiplicador. Os resultados são determinados através da interpolação utilizando uma recta de calibração. A calibração deverá ser realizada sempre que se utilize um novo lote de reagente de calibração, para além disso deverá renovar-se a calibração nas seguintes situações: todos os meses caso se utilize consecutivamente o reagente do mesmo lote ou ao fim de 7 dias de utilização do mesmo *kit* de análise.

#### 3.4.1.7. Doseamento do ácido fólico

Para o doseamento de ácido fólico no soro foi também aplicado o método de ECL utilizando o equipamento Cobas e411 da Roche<sup>®</sup>. O método consiste também num teste competitivo utilizando neste caso uma proteína de ligação específica para o ácido fólico. Na amostra, o ácido fólico compete com o que foi adicionado, para os locais de ligação da proteína. O tempo de análise é cerca de 27 min e consiste numa primeira incubação com 25 µL de amostra previamente tratado com dois reagentes, 2-mercaptoetanosulfato de sódio (40 g/L) e hidróxido de sódio (25 g/L). Após a adição dos reagentes, o ácido fólico ligado é libertado das proteínas de ligação endógenas. De seguida é realizada uma segunda incubação, utilizando a amostra pré-tratada e a proteína de ligação do ácido fólico marcada com ruténio. Forma-se um complexo de ligação entre o ácido fólico e a sua proteína de ligação, sendo a quantidade de complexo formada directamente dependente da quantidade de ácido fólico na amostra. De seguida adicionam-se micropartículas revestidas de streptavidina e de ácido fólico marcado com biotina, para que os sítios não ligados da proteína de ligação do folato passem a estar ocupados com ácido fólico marcado e para que o complexo passe a estar ligado a uma fase sólida através da ligação entre a biotina e a streptavidina. No equipamento de quimioluminescência, o doseamento do ácido fólico é realizado da mesma forma que o doseamento da vitamina B<sub>12</sub> (secção 3.1.4.6.).

### 3.4.2. Validação dos métodos bioquímicos

Os dois métodos de ECL desenvolvidos pela Roche® foram previamente validados e os seus resultados de validação serão sumariamente descritos nos resultados.

Os métodos cromatográficos foram validados de acordo com as recomendações dos guias internacionais da *Food and Drug Administration* (FDA) (323,324). Durante a validação dos métodos de doseamento da Hcy, Cys, MAD, carotenóides e vitaminas A, C, E e B<sub>6</sub> foram determinados e validados os seguintes parâmetros: especificidade (ESP), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), gama de trabalho, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e exactidão. A especificidade dos métodos foi confirmada pela ausência de qualquer pico interferente no tempo de retenção do analito de interesse e por comparação dos espectros de absorção UV-Vis do padrão puro e da amostra. O LD foi considerado a menor concentração de analito que permitiu obter uma razão sinal-ruído de pelo menos 3 para 1. O valor obtido foi confirmado experimentalmente pela análise de 5 soluções padrão do analito com a concentração do LD calculado. O LQ foi considerado a menor concentração de analito que permitiu obter uma razão sinal-ruído de pelo menos 10 para 1. O valor obtido foi também confirmado experimentalmente pela análise de 5 soluções padrão do analito com a concentração do LQ calculado. Para avaliar a linearidade, foram preparadas pelo menos 3 rectas de calibração em dias diferentes e cada concentração da recta foi injectada pelo menos cinco vezes. A linearidade das rectas de calibração foi avaliada pela análise de regressão linear. Parâmetros como o coeficiente de determinação, declive e ordenada na origem foram calculados. As gamas de trabalho foram definidas de acordo com os resultados obtidos para a linearidade dos métodos. A repetibilidade foi obtida a partir da injeção em duplicado de pelo menos 5 amostras independentes no mesmo dia. A precisão intermédia foi determinada pela injeção em duplicado de pelo menos 5 amostras independentes em cada dia durante três dias. Para avaliar a repetibilidade e a precisão intermédia dos métodos foi calculada a média, desvio padrão e o coeficiente de variação (CV). Foi definido como critério de aceitação um CV inferior a 10% para a repetibilidade do método e de 15% para a precisão intermédia com base nas recomendações da FDA (325). A exactidão foi avaliada pela análise de pelo menos três amostras independentes com e sem adição de padrão. As taxas de recuperação foram calculadas a três níveis de concentração (baixo, médio e elevado). Depois da adição de padrão a cada nível de concentração, as amostras foram processadas de acordo com os procedimentos descritos acima para cada método. De acordo com os critérios de aceitação definidos nos guias da FDA, foi considerada uma taxa de recuperação satisfatória para valores entre 80 e 120%.

### 3.4.3. Aplicação dos métodos bioquímicos

Algumas características dos métodos analíticos utilizados para dosear os níveis sanguíneos dos parâmetros bioquímicos estão apresentadas na Tabela 4. O doseamento de cada analito (homocisteína, cisteína, ácido fólico, vitaminas B<sub>12</sub>, C, B<sub>6</sub>, A e E, carotenóides e malondialdeído) foi efectuado em 293 amostras de sangue em duplicado. Sempre que a variabilidade dos resultados entre duplicados da mesma amostra eram superiores à repetibilidade do método, o doseamento foi repetido. As amostras hemolisadas foram rejeitadas. Para garantir a fiabilidade dos resultados, o doseamento de vitamina C dos participantes foi realizado em simultâneo com o período de colheita de dados. Semanalmente eram colhidas cerca de 15 amostras que eram analisadas na mesma semana ou na semana seguinte, isto porque, o estudo de estabilidade das amostras previamente realizado só permitiu obter resultados de estabilidade para 2 semanas, no caso da determinação de vitamina C.

**Tabela 4.** Métodos analíticos para a quantificação dos parâmetros bioquímicos em estudo.

Analito	Anticoagulante	Amostra		Procedimento analítico	
		Tipo	Armazenamento	Método	Detecção
Homocisteína	EDTA de sódio	Plasma	-80 °C	HPLC	Fluorescência
Cisteína	EDTA de sódio	Plasma	-80 °C	HPLC	Fluorescência
Ácido fólico	---	Soro	-80 °C	ECL	---
Vitamina B <sub>12</sub>	---	Soro	-80 °C	ECL	---
Vitamina B <sub>6</sub>	EDTA de sódio	Plasma	-80 °C	HPLC	Fluorescência
Vitamina C	Heparinato de lítio	Plasma	-80 °C	HPLC	UV/Vis
Vitaminas A, E e Carotenóides	---	Soro	-80 °C	HPLC	DAD
Malondialdeído	---	Soro	-80 °C	HPLC	UV/Vis

ECL, Eletroquimioluminescência; HPLC, cromatografia líquida de elevada resolução; DAD, detector de díodos.

## 3.5. Análises genéticas

### 3.5.1. Identificação dos polimorfismos genéticos da haptoglobina

A identificação dos polimorfismos genéticos da Hp foi realizada pela Técnica Conceição Gonçalves do Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Para a determinação do fenótipo da Hp foram utilizadas amostras de plasma com EDTA diluídas com uma solução aquosa de hemoglobina (Hb) a 10% (v/v). De seguida as células do sangue foram lavadas cinco vezes com uma solução de tampão fosfato (0,1 M) a pH 7,2 e depois foi provocada a hemólise celular utilizando 9 mL de uma solução de água esterilizada por mL de volume celular. O sobrenadante do hemolisado contendo Hb foi dividido em volumes de 1 mL ou de 0,5 mL e congelado a -20 °C. A Hp foi determinada por electroforese em gel de poliácridamida e por coloração com peroxidase. O presente método foi baseado num método previamente descrito (326) com a introdução de algumas modificações (327). Resumidamente,

uma alíquota de 20  $\mu$ L de plasma hemolisado foi misturada com 10  $\mu$ L de uma solução aquosa de Hb a 10% (v/v) e com 15  $\mu$ L de uma solução aquosa de sacarose a 40% (v/v) deixou-se a amostra à temperatura ambiente durante 5 min para permitir a formação do complexo Hp-Hb. A separação deste complexo foi realizada pelo método de electroforese (OmniPAGE<sup>®</sup> Maxi VS20D, Cleaver Scientific Ltd, Reino Unido) em gel de poliacrilamida utilizando um tampão contendo 50 mM de base tris e 384 mM de glicina. Os géis de coloração e de separação foram respectivamente, 14 mL acrilamida/bis-acrilamida a 40% em 14 mL de uma solução de base Tris (1,5 M) com ácido clorídrico (3 M) a pH 8,9 e 21 mL de água bidestilada. Um total de 350 mL de N,N,N',N'-tetrametil-etileno-diamina (TEMED) a 99% e 1 mL de persulfato de amónio (12 mg/mL) foram adicionados à amostra. A electroforese foi realizada com uma voltagem constante de 250 V durante 4 horas. Posteriormente, o complexo Hp-Hb foi visualizado após submersão do gel em duas soluções de coloração numa bandeja de vidro. A primeira solução de coloração continha ortodianisidina (5 mg/mL) numa solução aquosa de ácido acético glacial a 50% (v/v) e a segunda solução foi preparada com uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio a 2% (v/v). Após 15 min, as bandas do complexo de Hp-Hb eram visíveis e mantiveram-se estáveis durante 48 horas.

### *3.5.2. Identificação do polimorfismo genético C677T da enzima MTHFR*

A identificação do polimorfismo C677T da enzima MTHFR foi realizada pela Mestre Joana Lopes Paixão, no âmbito do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa com o título "Importância dos Polimorfismos do Metabolismo da Homocisteína na Susceptibilidade para a Diabetes *Mellitus* do tipo II".

#### *3.5.2.1. Extração de DNA*

O DNA genómico foi isolado a partir de 200  $\mu$ L de amostra de sangue total e recorrendo ao *Jetquick blood DNA Spin Mini Kit* (Genomed<sup>®</sup> GmbH, Löhne, Alemanha). Inicialmente é provocada uma lise celular pela acção combinada de uma enzima proteolítica, um detergente e um sal caotrópico. De seguida o lisado é colocado directamente numa coluna (disponível no kit) para purificar o DNA e garantir que as proteínas sejam removidas. Ainda na coluna, a amostra é lavada duas vezes para remover contaminantes residuais, como proteínas, metabolitos, detergentes ou corantes. Por fim, o DNA purificado é eluído com um solvente apropriado e está pronto para ser amplificado.

#### *3.5.2.2. Quantificação e determinação da pureza do DNA*

A quantificação e determinação da pureza do DNA genómico foram realizadas utilizando um espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 1000 da Thermo Electron Scientific Instruments LLC e calculando a razão entre as absorvências nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

### 3.5.2.3. Identificação da mutação C677T

Para detecção dos polimorfismos foram realizadas as técnicas de *Polymerase chain reaction* (PCR) e *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP). A amplificação dos genes foi realizada pelo método de PCR que consistiu na desnaturação das cadeias de DNA, seguida de emparelhamento e extensão das cadeias (Tabela 5). Os produtos do PCR foram novamente submetidos a um PCR com RFLP. Durante a aplicação do método foram quebradas as cadeias de DNA em locais específicos utilizando enzimas de restrição que reconhecem sequências específicas e cortam as zonas do DNA a analisar. Os fragmentos obtidos foram separados conforme o tamanho e analisados em gel de electroforese. As reacções de PCR foram realizadas com 200 ng de DNA, 10 pmol de primers específicos e uma solução *MixMaster* de dNTPs (200 µM), dicloreto de magnésio (1,5 mM), uma solução de Tris-HCl (10 mM) a pH 8,8 e Taq DNA polimerase (1 U/µL). O produto de PCR obtido foi posteriormente digerido com a enzima de restrição Hinf I durante 18 h a 37 °C com inactivação de 20 min a 65 °C. As bandas de DNA correspondentes a cada polimorfismo foram visualizadas num gel de agarose a 4% (após corrida de 90 min a 85 V), corado por brometo de etídeo e submetido a um transiluminador ultravioleta. A visualização dos genótipos seguiu o seguinte padrão: 198 pb para o genótipo selvagem (677CC); 198pb e 175 pb para o genótipo heterozigoto (677CT) e 175pb para o genótipo mutante (677TT).

**Tabela 5** - Sequência dos *primers* utilizados e condições de PCR para amplificação do DNA.

Polimorfismo	Sequência dos Primers	Condições do PCR
		<b>30 Ciclos</b>
MTHFR C677T	5' - TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA - 3' 5' - AGGAGGTGCGGTGAGAGTG - 3'	Desnaturação - 30 s a 94 °C
		Anelamento - 30 s a 61 °C
		Extensão - 1 min a 72 °C
		Extensão final - 7 min a 72 °C

PCR, *Polymerase chain reaction*; MTHFR, 5,10-metilenotetra-hidrofolato redutase.

### 3.6. Tratamento de dados e análise estatística

Foi construída uma tabela de operacionalização das variáveis em estudo, onde foi definida a codificação, descrição, valoração e categorização estatística da variável. Na codificação foi atribuída uma sigla que define resumidamente a variável. A descrição da variável consiste na sua definição sucinta e a valoração permite a sua ordenação numérica ou categórica. Todas as variáveis foram classificadas estatisticamente em dois tipos: a) numérica ou b) categórica. Dentro das variáveis categóricas, as variáveis em estudo são distinguidas entre 1) nominal ou 2) ordinal. A referida tabela foi utilizada como ferramenta para a construção de uma base de dados que permitiu a compilação de todos os resultados das variáveis em estudo.

Foi realizado um cálculo prévio do tamanho amostral de cada grupo para garantir a representatividade da amostra, utilizando para isso o software *Power and Sample Size*

*Calculation*, versão 2.1, de 2008. Sendo a Hcy considerado o parâmetro bioquímico mais relevante para o estudo, o cálculo do tamanho amostral de cada grupo foi realizado considerando uma diferença esperada de 5  $\mu$ M de Hcy entre os grupos. Para uma potência de 90% e um valor de alfa de 5%. O número mínimo de participantes por grupo foi 31.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando os *softwares* informáticos para Windows, SPSS<sup>®</sup>, versão 20.0 (SPSS INC, Chicago) e MedCalc<sup>®</sup>, versão 12.3.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgica). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou como número e percentagem. Foi testada a normalidade de todas as variáveis pela aplicação do teste *Kolmogorov-Smirnov*. A comparação dos valores médios de variáveis numéricas com distribuição normal foi realizada pela aplicação dos testes de *t-student* ou da análise de variância (ANOVA), de acordo com o número de grupos comparados. As variáveis numéricas foram correlacionadas utilizando os coeficientes de correlação de *Pearson* ou *Spearman* de acordo com o tipo de distribuição. O teste *Post Hoc* de *Bonferroni* para comparações múltiplas foi utilizado para identificar diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos três grupos. As diversas variáveis numéricas em estudo foram relacionadas pela aplicação de regressões lineares simples ou múltiplas. A presença de possíveis variáveis de confundimento foi corrigida pela aplicação de uma análise de covariância (ANCOVA). As médias das variáveis de interesse foram ajustadas para o efeito de outras covariáveis. As variáveis qualitativas foram comparadas pela aplicação do teste do Qui-quadrado e do teste Z para comparação de proporções. Como medida de associação causal foi utilizada o *Odds ratio* (OR) e o respectivo intervalo de confiança a 95%, considerando os grupos II ou III como referência. Para todos os testes foi considerada significância estatística quando  $p < 0,05$ .



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Características iniciais da população

As características iniciais da população em estudo estão descritas na Tabela 6. Nos grupos I e II, o valor médio da HbA1c obtido foi superior a 7% considerado como o objectivo satisfatório para o controlo metabólico adequado na DMT2 (213). As concentrações médias de CT, C-LDL, hemoglobina e eritrócitos nos grupos em estudo foram muito semelhantes. Os níveis plasmáticos de C-HDL foram superiores no grupo III em relação aos dois grupos de diabéticos. Os valores médios de triglicéridos foram estatisticamente superiores no grupo II ( $1,94 \pm 1,21$  mM) em relação aos outros dois grupos (grupo I:  $2,19 \pm 1,07$  mM vs. grupo III:  $1,19 \pm 0,520$  mM). O tempo de duração da diabetes foi também significativamente superior no grupo I ( $19,4 \pm 9,33$  anos) em relação ao grupo II ( $13,5 \pm 7,95$  anos). O valor médio da PAS foi estatisticamente diferente nos três grupos (grupo I:  $154 \pm 20,3$  mmHg vs. grupo II:  $146 \pm 25,9$  mmHg vs. grupo III:  $136 \pm 19,8$  mmHg).

**Tabela 6.** Características iniciais da população em estudo.

Características	Grupo I (n = 75)	Grupo II (n = 75)	Grupo III (n = 143)
Idade (anos)	$62,9^a \pm 7,17$	$62,8^a \pm 7,01$	$65,6^b \pm 5,75$
Homens/Mulheres	36 <sup>a</sup> /39 <sup>a</sup>	31 <sup>a</sup> /44 <sup>a</sup>	33 <sup>b</sup> /110 <sup>b</sup>
Duração da diabetes (anos)	$19,4^a \pm 9,33$	$13,5^b \pm 7,95$	NA
Hb (g/dL)	$13,4^a \pm 1,72$	$13,7^a \pm 1,42$	$13,8^a \pm 1,17$
HbA1c (%)	$8,70^a \pm 1,42$	$8,27^a \pm 1,39$	NA
Hematocrito (%)	$39,3^a \pm 4,74$	$40,3^a \pm 4,03$	$40,7^a \pm 3,30$
Eritrócitos (M/ $\mu$ L)	$4,58^a \pm 0,588$	$4,64^a \pm 0,437$	$4,52^a \pm 0,426$
CT (mmol/L)	$5,24^a \pm 1,22$	$5,18^a \pm 0,965$	$5,35^a \pm 0,962$
C-HDL (mmol/L)	$1,27^a \pm 0,378$	$1,34^a \pm 0,348$	$1,48^b \pm 0,320$
C-LDL (mmol/L)	$3,34^a \pm 0,964$	$3,27^a \pm 0,847$	$3,59^a \pm 0,902$
Triglicéridos (mmol/L)	$2,19^a \pm 1,07$	$1,94^a \pm 1,21$	$1,19^b \pm 0,520$
PAS (mmHg)	$154^a \pm 20,3$	$146^b \pm 25,9$	$136^c \pm 19,8$
PAD (mmHg)	$79,2^a \pm 13,1$	$82,0^b \pm 12,7$	$76,3^a \pm 11,5$
Pulsações (batimentos/min)	$73,2^a \pm 12,0$	$77,6^a \pm 12,9$	$68,8^b \pm 10,8$

**Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão ou como número de indivíduos.** As médias na mesma linha assinaladas com letras diferentes (a, b, c) são estatisticamente diferentes de acordo com o teste post hoc de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) ou de acordo com o teste t-student para duas amostras independentes. Para comparar as proporções de homens e mulheres entre os grupos foi utilizado o teste Z para comparação de proporções ( $p < 0,05$ ). Hb, hemoglobina; HbA1c, hemoglobina glicosilada; CT, colesterol total; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; C-LDL, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade plasmática; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; NA, não aplicável.

## Resultados

Na Tabela 7 está descrita a prevalência das complicações angiopáticas da diabetes e dos factores clássicos do risco cardiovascular. Cerca de 44% dos diabéticos do grupo I tinham macroangiopatia, 82,6% tinham microangiopatia e 34% tinham macro- e microangiopatia. A prevalência de acidente vascular cerebral, enfarte agudo do miocárdio e doença vascular periférica é respectivamente 10,7%, 10,7% e 22,7%. A retinopatia diabética é a complicação angiopática mais prevalente. Os diabéticos de ambos os grupos tinham hábitos tabágicos semelhantes, mas significativamente diferentes dos hábitos dos indivíduos do grupo III (6,3%,  $p = 0,0066$ ). A prevalência do consumo de álcool é superior no grupo II (57,3%) e semelhante entre os grupos I e III (45,3% vs. 46,2%), no entanto, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os três grupos. Os diabéticos do grupo I eram com maior frequência insulino-dependentes e tinham um pior controlo metabólico da diabetes do que os diabéticos do grupo II. A prevalência dos antecedentes familiares de doença cardiovascular é elevada em todos os grupos, mas especialmente no grupo I (61,3%). Os indivíduos do grupo III são mais activos do que os diabéticos, embora a percentagem de controlos sedentários seja elevada (64,3%). Os três níveis de actividade física foram relacionados com a percentagem de GC. No grupo I, a prevalência de diabéticos sedentários e com uma percentagem de GC elevada foi de 65,7%, no grupo II foi de 60,3% e no grupo III foi de 20,1%. Estes resultados indicam que um estilo de vida sedentário está associado com a prevalência de excesso de GC. A frequência de hipertensão arterial nos diabéticos com angiopatia foi de 77,0%, cerca de duas vezes superior à frequência obtida para os indivíduos controlos (39,2%). A prevalência de dislipidemia foi elevada em todos os grupos em estudo (grupo I: 94,2% vs. grupo II: 93,2% vs. grupo III: 95,6%), algo que se deve essencialmente à presença de níveis plasmáticos elevados de C-LDL. Foi também comprovado, através da aplicação do teste Z para comparação de proporções, que a prevalência de hipertensão foi significativamente superior nos grupos I e II em relação ao grupo III e que a prevalência de hipertrigliceridemia foi significativamente superior no grupo I em relação aos grupos II e II, bem como, no grupo II em relação ao grupo III. Não foram verificadas diferenças estatísticas na prevalência de dislipidemia nos três grupos ( $p = 0,725$ ). A prevalência de baixas concentrações de C-HDL e de elevadas concentrações de C-LDL é estatisticamente superior nos dois grupos de diabéticos em comparação com o grupo III.

**Tabela 7.** Prevalência das complicações angiopáticas e factores clássicos de risco cardiovascular.

Variáveis	Grupo I (n = 75)	Grupo II (n = 75)	Grupo III (n = 143)
Acidente vascular cerebral	8 (10,7)	NA	NA
Enfarte agudo do miocárdio	8 (10,7)	NA	NA
Doença vascular periférica	17 (22,7)	NA	NA
Retinopatia	62 (82,6)	NA	NA
Fumadores	11 <sup>a</sup> (14,7)	11 <sup>a</sup> (14,7)	9 <sup>b</sup> (6,30)
Consumo de álcool	34 <sup>a</sup> (45,3)	43 <sup>a</sup> (57,3)	66 <sup>a</sup> (46,2)
Diabéticos insulino-dependentes	46 <sup>a</sup> (62,2)	33 <sup>b</sup> (44,6)	NA
Controlo metabólico da diabetes satisfatório	9 <sup>a</sup> (12,5)	18 <sup>b</sup> (24,3)	NA
Antecedentes familiares de DCV	46 <sup>a</sup> (61,3)	40 <sup>a</sup> (53,3)	78 <sup>a</sup> (54,6)
Nível elevado de actividade física	2 <sup>a</sup> (2,70)	0 <sup>a,b</sup> (0,00)	0 <sup>b</sup> (0,00)
Nível moderado de actividade física	18 <sup>a</sup> (24,0)	22 <sup>a</sup> (29,3)	51 <sup>a</sup> (35,7)
Nível baixo de actividade física	55 <sup>a</sup> (73,3)	53 <sup>a</sup> (70,7)	92 <sup>a</sup> (64,3)
Hipertensão arterial	57 <sup>a</sup> (77,0)	48 <sup>a</sup> (64,0)	56 <sup>b</sup> (39,2)
Nível baixo de C-HDL	33 <sup>a</sup> (47,8)	26 <sup>a</sup> (35,1)	12 <sup>b</sup> (17,1)
Nível elevado de C-LDL	54 <sup>a</sup> (76,1)	57 <sup>a</sup> (77,0)	62 <sup>b</sup> (89,9)
Hipertrigliceridémia	41 <sup>a</sup> (61,2)	32 <sup>b</sup> (43,8)	13 <sup>c</sup> (18,1)
Dislipidémia	65 <sup>a</sup> (94,2)	69 <sup>a</sup> (93,2)	65 <sup>a</sup> (95,6)

**Os resultados estão expressos como número de indivíduos e como (percentagem).** O número de indivíduos na mesma linha assinalados com letras diferentes (a, b, c) são estatisticamente diferentes de acordo teste Z para comparação de proporções ( $p < 0,05$ ). C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; C-LDL, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade plasmática; DCV, doença cardiovascular; NA, não aplicável.

## 4.2. Avaliação nutricional

### 4.2.1. Antropometria vs. bioimpedância

Os resultados das medições antropométricas e da composição corporal estão descritos na Tabela 8. Existem diferenças significativas entre os valores médios do peso, PA, IMC e da prega cutânea subescapular entre o grupo III e os grupos I e II ( $p < 0,001$ ). No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos I e II. Os participantes diabéticos são mais pesados, têm um maior PA e um maior IMC quando comparados com os indivíduos do grupo controlo. Em todos os grupos, os indivíduos do género masculino demonstraram ser mais pesados, mais altos e apresentaram um maior PA do que os indivíduos do género feminino. Para os grupos I e III, o valor médio do IMC foi inferior nos homens em comparação com as mulheres. Para todos os grupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos valores médios da altura e das pregas cutâneas tricípital, suprailíaca e abdominal. De acordo com a aplicação das equações antropométricas de Lohman, Faulkner, Deurenberg (1991) e Siri, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios da percentagem de GC nos três grupos estudados. No entanto, foram verificadas diferenças significativas entre as médias da

## Resultados

percentagem de GC nos três grupos estudados quando aplicadas as equações antropométricas de Boileau, Deurenberg (1998), Gallagher, Jackson & Pollock e do estudo *Heritage*. Em todos os grupos e para todas as equações aplicadas, as médias da percentagem de GC foram superiores no género feminino comparativamente com o género masculino. Para os três grupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as médias das percentagens da GC, MM e ACT calculadas pelo método BIA. Os valores médios da percentagem da GC calculados pelo método BIA foram para todos os grupos significativamente superiores nas mulheres em comparação com os homens. No entanto, as médias das percentagens de MM e da ACT foram para todos os grupos superiores nos homens em relação às mulheres. Foram comparados entre os grupos, os valores médios da percentagem de GC obtidos pelos métodos das equações antropométricas e do método BIA. Para o grupo I, o valor médio da percentagem da GC obtido pela aplicação da equação de Jackson Pollock ( $38,3 \pm 11,1\%$ ) foi o que mais se aproximou ao valor obtido pelo método de BIA, seguido da equação de Gallagher ( $38,4 \pm 10,2\%$ ). Para o grupo II, a média da percentagem da GC obtida pela aplicação da equação de Gallagher ( $37,6 \pm 7,7\%$ ) foi a mais semelhante ao valor obtido pelo método de BIA e a equação de Jackson Pollock ( $37,3 \pm 8,3\%$ ) a segunda mais próxima. Em relação ao grupo III, foram as equações de Deurenberg (1991) e (1998) que permitiram obter valores médios de percentagem de GC ( $38,4 \pm 6,9\%$  e  $36,0 \pm 7,3\%$ , respectivamente) mais semelhantes aos resultados obtidos pelo método de BIA. Os valores médios da percentagem de GC estimados pelas três equações antropométricas que utilizam directamente a medida das pregas cutâneas foram muito inferiores aos valores calculados pelo método de BIA. A variação dos resultados obtidos para a percentagem de GC foi avaliada pelo valor do DP em cada grupo. No método de BIA, o valor de DP variou de 7,4% (grupo II) até 8,4% (grupo I). Esta variação foi semelhante na aplicação das equações antropométricas de Deurenberg (1991 e 1998), Gallagher (de 7,7% a 10,2%) e do estudo de Heritage (de 7,1% a 9,5%). Tanto para o método de BIA, como para o método da aplicação de equações antropométricas, a menor variabilidade da percentagem de GC calculada foi obtida no grupo II e a maior dispersão de resultados foi observada no grupo I. A avaliação da composição corporal pelo método de BIA permitiu também obter resultados para a MM e ACT. No que diz respeito à MM, foram observadas diferenças estatisticamente significativas na MM em kg entre o grupo III (41,9 kg) e os outros grupos (grupo I: 48,7 kg vs. grupo II: 47,4 kg). Para todos os grupos, o valor médio de MM (medida em percentagem ou peso) foi superior nos homens em comparação com as mulheres. Em relação à ACT medida em volume, verificou-se também diferenças estatísticas entre o grupo III (30,6 L) e os outros grupos (grupo I: 35,6 L vs. grupo II: 34,7 L), no entanto, não foram encontradas diferenças entre os grupos em relação à percentagem de ACT. Para todos os grupos, o valor médio de ACT (medida em percentagem ou volume) foi superior nos homens em comparação com as mulheres. Os resultados de ACT dos participantes foram também avaliados individualmente pela comparação com um intervalo

de confiança (específico para cada participante) obtido de acordo com as variáveis antropométricas (ex. peso, altura, género, idade, actividade física) previamente definidas no equipamento utilizado. Essa avaliação individual permitiu determinar a prevalência de desidratação em cada grupo estudado, bem como, a prevalência nos grupos por género. Assim, no grupo I verificou-se uma prevalência de desidratação de 67,1%, sendo essa prevalência de 70,6% nos homens e de 64,1% nas mulheres. Em relação ao grupo II, a prevalência de desidratação foi também muito elevada mas inferior (61,6%) ao valor obtido para o grupo I. Neste grupo, a prevalência no género masculino foi de 54,8% e no feminino de 66,7%. O grupo III foi o que apresentou a menor prevalência de desidratação, mas ainda assim, a maior parte dos participantes deste grupo estavam desidratados (58,4%). A comparação de géneros neste grupo permitiu verificar que a percentagem de homens desidratados (63,6%) era superior do que a das mulheres (56,7%).

**Tabela 8.** Medições antropométricas e composição corporal por bioimpedância eléctrica na população em estudo.

Variáveis	Grupo I (n = 75)			Grupo II (n = 75)			Grupo III (n = 143)		
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total
Peso (kg)	85,5 ± 13,7	74,1 ± 16,9	79,6 <sup>a</sup> ± 16,4	84,7 ± 13,8	70,7 ± 11,6	76,5 <sup>a</sup> ± 14,3	74,3 ± 9,3	65,3 ± 12,1	67,4 <sup>b</sup> ± 12,1
Altura (m)	1,68 ± 6,6	1,53 ± 6,2	1,60 <sup>a</sup> ± 9,7	1,69 ± 8,9	1,55 ± 7,3	1,60 <sup>a</sup> ± 10,5	1,69 ± 7,2	1,58 ± 6,2	1,61 <sup>a</sup> ± 8,0
PA (cm)	104,6 ± 10,3	102,2 ± 14,4	100,6 <sup>a</sup> ± 10,9	104,1 ± 10,9	96,9 ± 10,7	98,3 <sup>a</sup> ± 10,9	95,4 ± 6,8	92,4 ± 10,5	92,8 <sup>b</sup> ± 9,7
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30,4 ± 4,4	31,5 ± 6,3	31,0 <sup>a</sup> ± 5,5	29,7 ± 3,3	29,4 ± 4,2	29,5 <sup>a</sup> ± 3,9	26,0 ± 2,6	26,2 ± 4,4	26,2 <sup>b</sup> ± 4,0
<i>Pregas cutâneas (mm)</i>									
Tricipital	7,1 ± 2,3	15,2 ± 6,8	11,3 <sup>a</sup> ± 6,5	8,9 ± 5,7	14,4 ± 4,4	12,1 <sup>a</sup> ± 5,7	6,7 ± 2,5	13,6 ± 6,2	12,0 <sup>a</sup> ± 6,3
Subescapular	22,0 ± 5,6	26,0 ± 6,4	24,0 <sup>a</sup> ± 6,3	22,3 ± 5,1	24,7 ± 6,3	23,7 <sup>a</sup> ± 5,9	19,6 ± 4,8	20,3 ± 6,9	20,1 <sup>b</sup> ± 6,4
Suprailíaca	13,0 ± 5,5	19,0 ± 6,7	16,1 <sup>a</sup> ± 6,8	13,5 ± 4,2	18,4 ± 6,5	16,4 <sup>a</sup> ± 6,2	12,9 ± 4,7	18,3 ± 6,9	17,1 <sup>a</sup> ± 6,9
Abdominal	20,6 ± 5,5	26,3 ± 7,0	23,6 <sup>a</sup> ± 6,9	21,0 ± 6,1	24,1 ± 6,8	22,8 <sup>a</sup> ± 6,6	19,2 ± 6,3	24,7 ± 6,7	23,5 <sup>a</sup> ± 7,0
<i>Equações antropométricas GC (%)</i>									
Lohman	18,1 ± 2,8	20,8 ± 3,6	19,5 <sup>a</sup> ± 3,5	18,8 ± 3,1	21,1 ± 3,0	20,2 <sup>a</sup> ± 3,2	18,1 ± 2,9	19,8 ± 4,1	19,4 <sup>a</sup> ± 3,9
Boileau	26,9 ± 6,5	31,5 ± 4,1	29,2 <sup>a</sup> ± 5,9	27,9 ± 7,0	31,3 ± 3,5	29,9 <sup>a</sup> ± 5,5	24,0 ± 6,7	28,2 ± 6,0	27,2 <sup>b</sup> ± 6,4
Faulkner	15,4 ± 2,2	18,7 ± 3,0	17,1 <sup>a</sup> ± 3,1	15,7 ± 2,5	18,3 ± 2,4	17,3 <sup>a</sup> ± 2,7	14,7 ± 2,1	17,5 ± 3,2	16,9 <sup>a</sup> ± 3,2
Deurenberg (1991)	35,2 ± 5,3	46,4 ± 8,1	41,0 <sup>a</sup> ± 8,9	35,0 ± 4,8	44,3 ± 5,2	40,5 <sup>a</sup> ± 6,8	30,6 ± 3,2	40,8 ± 5,9	38,4 <sup>a</sup> ± 6,9
Deurenberg (1998)	32,9 ± 5,7	44,7 ± 8,6	39,0 <sup>a</sup> ± 9,4	32,7 ± 5,1	42,4 ± 5,5	38,4 <sup>a,b</sup> ± 7,2	27,7 ± 3,3	38,6 ± 6,3	36,0 <sup>b</sup> ± 7,3
Gallagher	32,0 ± 6,4	44,3 ± 9,6	38,4 <sup>a</sup> ± 10,2	31,7 ± 5,6	41,7 ± 6,2	37,6 <sup>a</sup> ± 7,7	25,8 ± 3,7	37,1 ± 7,1	34,5 <sup>b</sup> ± 8,0
Jackson & Pollock	31,6 ± 7,1	44,5 ± 10,5	38,3 <sup>a</sup> ± 11,1	31,2 ± 6,1	41,6 ± 4,8	37,3 <sup>a</sup> ± 8,3	24,6 ± 4,1	36,4 ± 7,8	33,7 <sup>b</sup> ± 8,7
Estudo Heritage	33,4 ± 6,1	44,4 ± 9,1	39,1 <sup>a</sup> ± 9,5	33,1 ± 5,2	41,9 ± 5,9	38,2 <sup>a</sup> ± 7,1	27,6 ± 3,6	37,6 ± 6,8	35,3 <sup>b</sup> ± 7,5
Siri	29,4 ± 3,6	33,9 ± 4,1	31,7 <sup>a</sup> ± 4,5	30,0 ± 4,1	33,6 ± 3,5	32,2 <sup>a</sup> ± 4,1	28,4 ± 4,0	32,4 ± 5,0	31,4 <sup>a</sup> ± 5,1
<i>BIA</i>									
GC (%)	32,6 ± 6,0	42,2 ± 7,6	37,7 <sup>a</sup> ± 8,4	33,0 ± 5,4	41,2 ± 6,8	37,7 <sup>a</sup> ± 7,4	29,9 ± 7,0	39,6 ± 7,1	37,2 <sup>a</sup> ± 8,2
GC (kg)	28,3 ± 8,5	31,7 ± 12,4	30,1 <sup>a</sup> ± 10,8	29,1 ± 9,8	29,6 ± 9,0	29,4 <sup>a</sup> ± 9,3	23,0 ± 7,0	26,7 ± 9,5	25,8 <sup>b</sup> ± 9,1
MM (%)	67,4 ± 6,0	57,8 ± 7,6	62,4 <sup>a</sup> ± 8,4	66,9 ± 5,4	58,8 ± 6,8	62,3 <sup>a</sup> ± 7,4	70,0 ± 6,9	60,1 ± 7,4	62,4 <sup>a</sup> ± 8,4
MM (kg)	57,0 ± 7,0	41,3 ± 6,4	48,7 <sup>a</sup> ± 10,3	56,1 ± 7,4	40,9 ± 4,8	47,4 <sup>a</sup> ± 9,6	51,3 ± 4,7	38,9 ± 3,7	41,9 <sup>b</sup> ± 6,6
ACT (%)	49,3 ± 4,4	42,3 ± 5,6	45,6 <sup>a</sup> ± 6,1	49,0 ± 3,9	43,0 ± 4,9	45,6 <sup>a</sup> ± 5,4	51,1 ± 5,1	44,1 ± 5,2	45,8 <sup>a</sup> ± 5,9
ACT (L)	41,7 ± 5,1	30,2 ± 4,7	35,6 <sup>a</sup> ± 7,5	41,1 ± 5,4	30,0 ± 3,7	34,7 <sup>a</sup> ± 7,1	37,5 ± 3,4	28,5 ± 2,7	30,6 <sup>b</sup> ± 4,8

**Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão.** As médias na mesma linha assinaladas com letras diferentes (a, b, c) são estatisticamente diferentes de acordo com o teste post hoc de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). ACT, água corporal total; BIA, bioimpedância eléctrica; IMC, índice de massa corporal; (%), percentagem; GC, gordura corporal; M, média; MM, massa magra, PA, perímetro abdominal.

#### 4.2.2. Prevalência de obesidade e avaliação da gordura corporal

Os resultados da avaliação do IMC, PA e %GC nos três grupos em estudos estão descritos na Tabela 9. A prevalência de sobrepeso e obesidade avaliada pelo critério do IMC foi calculada e comparada entre os grupos. A percentagem de participantes com excesso de peso no grupo I foi significativamente inferior (26,7%) à verificada para os grupos II (42,6%) e III (40,5%). No entanto, a prevalência de obesidade no grupo I foi superior (57,3%) às obtidas nos grupos II (45,4%) e III (16,8%). De acordo com a classificação de obesidade por classes, a classe I foi a mais prevalente em todos os grupos mas 6,7% dos indivíduos com obesidade no grupo I tinham um IMC  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>. A percentagem de indivíduos com obesidade abdominal foi elevada em todos os grupos (mais de 50%), mas nos diabéticos essa prevalência foi cerca de 20% superior quando comparado com o grupo controlo. A percentagem de GC calculada pela aplicação das equações antropométricas e obtida pelo método BIA foi avaliada. De todas as equações utilizadas, apenas algumas foram consideradas para a avaliação da percentagem de gordura calculada. Os critérios definidos para essa escolha foram: tipo de equação antropométrica e as equações que permitiram obter um valor médio de GC mais próximo do que foi obtido pelo método de BIA. Os resultados obtidos com aplicação da equação de Boileau indicam uma menor prevalência de indivíduos com percentagem de GC elevada do que os resultados obtidos com os outros métodos. Para o grupo I, o resultado de prevalência da percentagem de GC elevada (88,0%) obtido com a aplicação da equação de Deurenberg (1998) foi o mais semelhante ao do método BIA. No grupo II, o resultado de prevalência mais próximo do alcançado pelo método BIA (83,6%) foi obtido pela aplicação da equação de Gallagher (86,7%). No grupo III, foi novamente a aplicação da equação de Deurenberg (1998) que permitiu obter o resultado de prevalência mais similar ao obtido pelo método BIA. Considerando apenas os resultados de prevalência obtidos pela aplicação do método de BIA, verificou-se que a prevalência de indivíduos com uma percentagem de GC elevada foi muito significativa em todos os grupos (grupo I: 87,1% vs. grupo II: 83,6% vs. grupo III: 76,1%). Nos dois grupos de diabéticos, os resultados obtidos com o método BIA indicam que uma percentagem de GC elevada é mais prevalente nos homens do que nas mulheres, no entanto no grupo controlo (III) verificou-se exactamente o contrário.

**Tabela 9.** Avaliação do índice de massa corporal, perímetro abdominal e percentagem de gordura corporal na população em estudo.

Métodos	Grupo I (n = 75)			Grupo II (n = 75)			Grupo III (n = 143)		
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total
<b>IMC</b>									
Peso normal (18,5 <IMC <25)	6 (16,7)	6 (15,4)	12 <sup>a</sup> (16,0)	3 (9,7)	6 (13,6)	9 <sup>a</sup> (12,0)	12 (36,4)	47 (42,7)	59 <sup>b</sup> (41,3)
Excesso de peso (25 <IMC <30)	9 (25,0)	11 (28,2)	20 <sup>a</sup> (26,7)	13 (41,9)	19 (43,2)	32 <sup>b</sup> (42,6)	18 (54,5)	40 (36,4)	58 <sup>b</sup> (40,5)
Obesidade (IMC ≥30):	21 (58,3)	22 (56,4)	43 <sup>a</sup> (57,3)	15 (48,4)	19 (43,2)	34 <sup>a</sup> (45,4)	3 (9,1)	21 (19,0)	24 <sup>b</sup> (16,8)
Classe I (30 <IMC <35)	18 (50,0)	14 (35,8)	32 <sup>a</sup> (42,6)	14 (45,2)	15 (34,1)	29 <sup>a</sup> (38,7)	3 (9,1)	17 (15,4)	20 <sup>b</sup> (14,0)
Classe II (35 <IMC <40)	2 (5,6)	4 (10,3)	6 <sup>a</sup> (8,0)	1 (3,2)	4 (9,1)	5 <sup>a,b</sup> (6,7)	0 (0,0)	3 (2,7)	3 <sup>b</sup> (2,1)
Classe III (IMC ≥40)	1 (2,7)	4 (10,3)	5 <sup>a</sup> (6,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 <sup>b</sup> (0,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	1 <sup>b</sup> (0,7)
<b>Obesidade abdominal<sup>1</sup></b>	22 (61,1)	31 (79,5)	53 <sup>a</sup> (70,7)	19 (61,3)	34 (77,3)	53 <sup>a</sup> (70,7)	6 (18,2)	67 (61,0)	73 <sup>b</sup> (51,0)
<b>Indivíduos com GC normal<sup>2</sup></b>									
Boileau	11 (33,3)	27 (79,4)	38 <sup>a</sup> (56,7)	10 (35,7)	37 (90,2)	47 <sup>a</sup> (68,1)	19 (57,6)	97 (89,8)	116 <sup>b</sup> (82,3)
Deurenberg (1998)	3 (8,30)	6 (15,4)	9 <sup>a</sup> (12,0)	3 (9,70)	1 (2,30)	4 <sup>a</sup> (5,30)	7 (21,2)	34 (30,9)	41 <sup>b</sup> (28,7)
Gallagher	7 (19,4)	6 (15,4)	13 <sup>a</sup> (17,3)	3 (9,70)	7 (15,9)	10 <sup>a</sup> (13,3)	15 (45,5)	47 (42,7)	62 <sup>b</sup> (43,4)
Siri	4 (13,8)	18 (60,0)	22 <sup>a</sup> (37,3)	1 (4,00)	22 (57,9)	23 <sup>a</sup> (36,5)	5 (15,2)	69 (64,5)	74 <sup>b</sup> (52,9)
BIA	4 (12,1)	5 (13,5)	9 <sup>a</sup> (12,9)	3 (9,70)	9 (21,4)	12 <sup>a</sup> (16,4)	9 (27,3)	24 (22,9)	33 <sup>a</sup> (23,9)
<b>Indivíduos com GC elevada<sup>3</sup></b>									
Boileau	22 (66,7)	7 (20,6)	29 <sup>a</sup> (43,3)	18 (64,3)	4 (9,80)	22 <sup>a</sup> (31,9)	14 (42,4)	11 (10,2)	25 <sup>b</sup> (17,7)
Deurenberg (1998)	33 (91,7)	33 (84,6)	66 <sup>a</sup> (88,0)	28 (90,3)	43 (97,7)	71 <sup>a</sup> (94,7)	26 (78,8)	76 (69,1)	102 <sup>b</sup> (71,3)
Gallagher	29 (80,6)	33 (84,6)	62 <sup>a</sup> (82,7)	28 (90,3)	37 (84,1)	65 <sup>a</sup> (86,7)	18 (54,5)	63 (57,3)	81 <sup>b</sup> (56,6)
Siri	25 (86,2)	12 (40,0)	37 <sup>a</sup> (62,7)	24 (96,0)	16 (42,1)	40 <sup>a</sup> (63,5)	28 (84,8)	38 (35,5)	66 <sup>b</sup> (47,1)
BIA	29 (87,9)	32 (86,5)	61 <sup>a</sup> (87,1)	28 (90,3)	33 (78,6)	61 <sup>a</sup> (83,6)	24 (72,7)	81 (77,1)	105 <sup>a</sup> (76,1)

**Os resultados estão expressos como número de indivíduos e (percentagem por coluna).** As proporções na mesma linha assinaladas com letras diferentes (a, b) são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Z para comparação de proporções ( $p < 0,05$ ). GC, gordura corporal; BIA, bioimpedância eléctrica.

<sup>1</sup> A obesidade abdominal foi definida para um perímetro abdominal >102 cm nos homens e >88 cm nas mulheres.

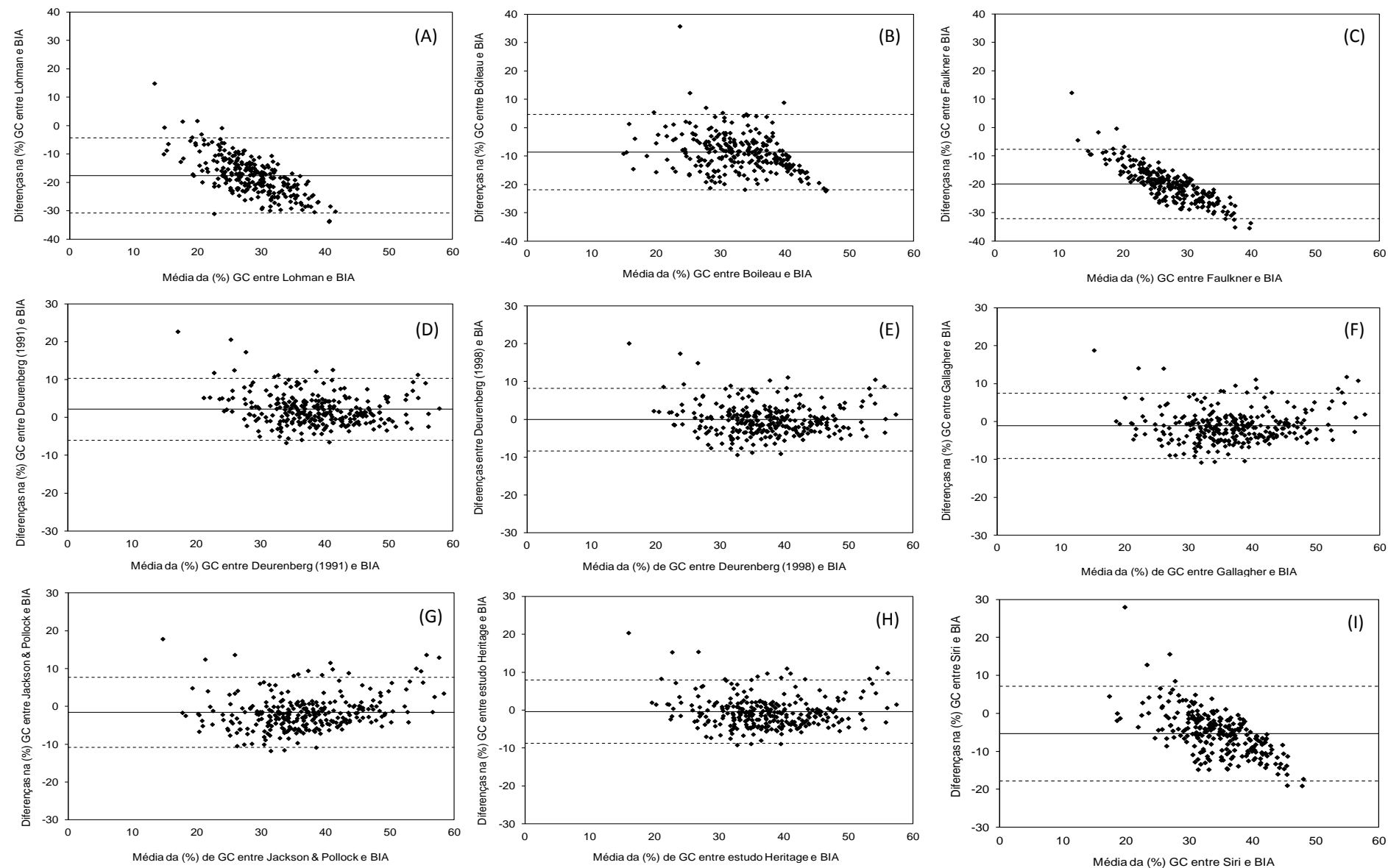
<sup>2</sup> GC ≤25% nos homens e ≤35% nas mulheres.

<sup>3</sup> GC >25% nos homens e >35% nas mulheres.

#### 4.2.3. Comparação entre o método de BIA e as equações antropométricas

A percentagem de GC estimada pela aplicação de equações antropométricas foi comparada com o método de BIA através da análise Blant-Altman (Fig. 6) que permite comparar as diferenças das médias obtidas pelos métodos (erro absoluto) com a média global dos dois métodos. Este tipo de análise é representado por um gráfico de pontos, onde são também representados os limites de aceitação calculados pela média das diferenças entre os dois métodos  $\pm 1,96*DP$  a um nível de confiança de 95% (328). A representação dos limites de aceitação permite um julgamento visual da possível concordância entre dois métodos comparados. De acordo com a análise de Bland-Altman, todas as equações antropométricas (excepto a equação de Jackson & Pollock) demonstraram estar em concordância com método de BIA, no que se refere à percentagem de GC, isto porque, 95% das diferenças entre os métodos comparados estão dentro dos limites de aceitação. No entanto, as melhores concordâncias com o método BIA verificaram-se para as equações de Siri (97,6%), Boileau (97,4%) e Lohman (96,6%). De acordo com as sugestões de Lohman (329) para confirmar a validade das equações antropométricas, a semelhança entre os valores médios e os DP das várias equações utilizadas para estimar a percentagem GC foram comparadas com o método de BIA. Seguindo o critério de Lohman foi calculado o coeficiente de correlação de *Pearson* para verificar a tendência e a força de possíveis correlações entre os métodos comparados. Foi também calculado o Erro Total (ET) porque reflecte a diferença total entre o valor considerado verdadeiro e o valor estimado. Os coeficientes de correlação de *Pearson* e os ET obtidos estão representados na Tabela 10. Para todas as equações antropométricas foram obtidas correlações significativas com o método de BIA, sendo o valor mais baixo do coeficiente de *Pearson* obtido para a equação de Lohman ( $r = 0,531$ ) e o mais elevado para a equação de Deurenberg 1998 ( $r = 0,831$ ). As correlações entre os métodos antropométricos e o método BIA foram também efectuadas para ambos os géneros. Para todas as equações foram obtidas correlações mais fracas para o género masculino do que para o género feminino. Os valores de ET em módulo variaram de 19,9% (para a equação de Faulkner) até 0,04% (para a equação de Deurenberg (1998)). O valor absoluto de ET foi maior no género masculino do que no feminino para as equações de Deurenberg (1991), Deurenberg (1998) e Siri, verificando-se o inverso para todas as outras.

## Resultados



**Figura 6. Análise Bland-Altman para comparar a percentagem de GC estimada pela aplicação de equações antropométricas e pelo método de BIA.** Os gráficos Bland-Altman mostram o resultado da comparação do método BIA com as equações antropométricas de Lohman (A), Boileau (B), Faulkner (C), Deurenberg, 1991 (D), Deurenberg, 1998 (E), Gallagher (F), Jackson & Pollock (G), estudo Heritage (H) e Siri (I). As linhas centrais representam a diferença média entre os métodos. As linhas a tracejado correspondem aos limites superior e inferior de concordância a 95% calculados pela média do erro total  $\pm 1,96 \times DP$  do ET.

**Tabela 10.** Comparação entre a aplicação das equações antropométricas e do método de BIA para avaliar a percentagem de gordura corporal na população em estudo.

Métodos	CCP			ET		
	H	M	T	H	M	T
Lohman x BIA	r = 0,294*	r = 0,569*	r = 0,531*	-17,2	-17,8	-17,6
Boileau x BIA	r = 0,332*	r = 0,640*	r = 0,547*	-8,43	-8,83	-8,69
Faulkner x BIA	r = 0,396*	r = 0,701*	r = 0,683*	-19,7	-20,0	-19,9
Deurenberg (1991) x BIA	r = 0,643*	r = 0,850*	r = 0,829*	2,53	1,94	2,14
Deurenberg (1998) x BIA	r = 0,648*	r = 0,855*	r = 0,831*	0,41	-0,28	-0,04
Gallagher x BIA	r = 0,657*	r = 0,858*	r = 0,829*	-0,52	-1,48	-1,15
Jackson & Pollock x BIA	r = 0,659*	r = 0,857*	r = 0,826*	-0,86	-2,02	-1,62
Estudo Heritage x BIA	r = 0,659*	r = 0,855*	r = 0,825*	0,22	-0,77	-0,43
Siri x BIA	r = 0,404*	r = 0,700*	r = 0,658*	-5,66	-5,23	-5,37

BIA, bioimpedância eléctrica; CCP, coeficiente de correlação de *Pearson*; ET, erro total, H, homens; M, mulheres; T, total.

\*Correlação significativa para  $p < 0,001$ .

#### 4.3. Caracterização dos hábitos alimentares

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados da ingestão média diária de energia, macronutrientes e os seus constituintes na população em estudo. O consumo energético diário foi estatisticamente diferente entre os grupos I e III, sendo que a média de ingestão calórica no grupo I foi superior em cerca de 200 kcal. Diferenças estatísticas entre estes dois grupos foram também obtidas para a ingestão média diária de gordura total, gordura monoinsaturada, ácido eicosapentaenóico (EPA) e cistina. Para todos estes compostos o valor médio de ingestão foi sempre superior no grupo I em relação ao grupo III. Foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre o grupo III e os outros dois grupos para a ingestão média diária de água, proteína, gordura saturada, colesterol, ácido linolénico, ácidos gordos *trans*, ácidos gordos ómega-3, ácido docosahexaenóico (DHA), lisina, serina, glicina e metionina. Para todos estes compostos, foi no grupo I que se verificou o maior o valor médio de ingestão e no grupo III o mais baixo. É importante referir que o valor médio de ingestão diária de água foi muito baixo para todos os grupos (grupo I: 1,244 L vs. grupo II: 1,235 L vs. grupo III: 1,024 L), algo que está em concordância com a elevada prevalência de desidratação verificada na população em estudo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as médias de ingestão de hidratos de carbono, etanol, gordura polinsaturada, ácido oleico, ácido linoleico, ácidos gordos ómega-6, fibra alimentar, fibra solúvel e insolúvel, hidratos de carbono complexos e açúcares simples.

O contributo médio percentual da proteína para a ingestão de energia diária foi idêntico nos grupos I e II (19%) e superior ao grupo III (17%). No que se refere ao contributo dos hidratos de carbono, a percentagem foi superior no grupo III (49%) comparativamente aos outros dois grupos (grupo I: 47% vs. grupo II: 46%). Em relação ao contributo da gordura total o valor foi semelhante nos três grupos (grupo I: 32% vs. grupo II: 32% vs. grupo III: 31%) mas o grupo III foi o que apresentou menor valor. A ingestão de etanol foi baixa nos três grupos (I: 2% vs. II: 3% vs. III: 3%).

**Tabela 11.** Ingestão diária de energia, macronutrientes e seus constituintes na população em estudo.

Energia e nutrientes	Grupo I (n = 75)	Grupo II (n = 75)	Grupo III (n = 143)	<i>p</i>
Energia (kcal)	1704 <sup>a</sup> (1572-1836)	1607 <sup>a,b</sup> (1515-1700)	1492 <sup>b</sup> (1433-1552)	<0,01
Proteína (g)	81,1 <sup>a</sup> (74,9-87,5)	76,4 <sup>a</sup> (71,8-81,0)	65,9 <sup>b</sup> (63,1-68,6)	<0,01
Hidratos de carbono (g)	204 <sup>a</sup> (188-220)	192 <sup>a</sup> (180-203)	190 <sup>a</sup> (182-198)	0,192
Gordura total (g)	62,4 <sup>a</sup> (56,3-68,5)	58,1 <sup>a,b</sup> (53,9-62,2)	52,4 <sup>b</sup> (49,8-55,0)	<0,01
Etanol (g)	5,72 <sup>a</sup> (0-58)	7,13 <sup>a</sup> (0-31)	5,56 <sup>a</sup> (0-39)	0,547
Água total (L)	1,244 <sup>a</sup> (1,142-1,346)	1,235 <sup>a</sup> (1,171-1,300)	1,024 <sup>b</sup> (0,987-1,062)	<0,01
Gordura saturada (g)	19,4 <sup>a</sup> (17,1-21,7)	17,5 <sup>a</sup> (16,0-18,9)	14,9 <sup>b</sup> (14,1-15,6)	<0,05
Gordura monoinsaturada (g)	28,2 <sup>a</sup> (25,4-31,1)	26,6 <sup>a,b</sup> (24,6-28,5)	24,4 <sup>b</sup> (23-25,7)	<0,05
Gordura polinsaturada (g)	9,4 <sup>a</sup> (8,4-10,3)	8,9 <sup>a</sup> (8,2-9,7)	8,7 <sup>a</sup> (8,2-9,3)	0,432
Colesterol (mg)	244 <sup>a</sup> (222-266)	220 <sup>a</sup> (200-241)	177 <sup>b</sup> (166-187)	<0,01
Ácido oleico (g)	24,4 <sup>a</sup> (21,9-27,0)	23,3 <sup>a</sup> (21,6-25,0)	21,5 <sup>a</sup> (20,1-22,7)	0,050
Ácido linoleico (g)	6,81 <sup>a</sup> (5,99-7,64)	6,60 <sup>a</sup> (5,96-7,23)	6,7 <sup>a</sup> (6,20-7,20)	0,913
Ácido linolénico (g)	0,900 <sup>a</sup> (0,821-0,980)	0,821 <sup>a</sup> (0,756-886)	0,618 <sup>b</sup> (0,590-0,647)	<0,01
Ácidos gordos <i>trans</i> (g)	0,896 <sup>a</sup> (0,774-1,02)	0,814 <sup>a</sup> (0,722-0,906)	0,618 <sup>b</sup> (0,590-0,647)	<0,01
Ácidos gordos Ómega-3 (g)	1,14 <sup>a</sup> (1,06-1,22)	1,08 <sup>a</sup> (1,00-1,15)	0,907 <sup>b</sup> (0,868-0,946)	<0,01
Ácidos gordos Ómega-6 (g)	7,03 <sup>a</sup> (6,21-7,86)	6,79 <sup>a</sup> (6,16-7,43)	6,79 <sup>a</sup> (6,28-7,28)	0,841
EPA (mg)	260 <sup>a</sup> (226-294)	260 <sup>a,b</sup> (228-291)	216 <sup>b</sup> (200-232)	<0,05
DHA (mg)	115 <sup>a</sup> (99-130)	114 <sup>a</sup> (100-128)	96 <sup>b</sup> (89-103)	<0,05
Fibra alimentar (g)	23,3 <sup>a</sup> (21,2-25,3)	22,4 <sup>a</sup> (20,9-24,0)	22,1 <sup>a</sup> (21,1-23,2)	0,562
Fibra insolúvel (g)	15,1 <sup>a</sup> (13,7-16,5)	14,6 <sup>a</sup> (13,4-15,7)	14,4 <sup>a</sup> (13,6-15,2)	0,611
Fibra solúvel (g)	6,63 <sup>a</sup> (6,02-7,24)	6,51 <sup>a</sup> (6,01-7,00)	6,15 <sup>a</sup> (5,86-6,44)	0,222
HCC (g)	71,2 <sup>a</sup> (64,1-78,3)	67,9 <sup>a</sup> (62,7-73,1)	70,8 <sup>a</sup> (66,5-75,1)	0,687
Açúcares simples (g)	85,7 <sup>a</sup> (76,9-94,5)	80,9 <sup>a</sup> (74,6-87,2)	83,8 <sup>a</sup> (79,8-87,8)	0,587
Lisina (g)	5,48 <sup>a</sup> (5,02-5,94)	5,19 <sup>a</sup> (4,86-5,52)	4,27 <sup>b</sup> (4,08-4,46)	<0,01
Serina (g)	3,42 <sup>a</sup> (3,12-3,72)	3,22 <sup>a</sup> (3,01-3,42)	2,83 <sup>b</sup> (2,71-2,96)	<0,05
Cistina (g)	0,926 <sup>a</sup> (0,849-1,00)	0,874 <sup>a,b</sup> (0,817-0,931)	0,790 <sup>b</sup> (0,755-0,826)	<0,01
Glicina (g)	2,92 <sup>a</sup> (2,67-3,16)	2,77 <sup>a</sup> (2,58-2,96)	2,41 <sup>b</sup> (2,30-2,52)	<0,01
Metionina (g)	1,76 <sup>a</sup> (1,61-1,90)	1,67 <sup>a</sup> (1,56-1,77)	1,40 <sup>b</sup> (1,33-1,46)	<0,01

**Os resultados estão expressos como média (intervalo de confiança a 95%).** As médias na mesma linha assinaladas com letras diferentes (a, b) são estatisticamente diferentes de acordo com o teste post hoc de Bonferroni ( $p < 0,05$  ou  $p < 0,01$ ). EPA, ácido eicosapentaenóico; DHA, ácido docosahexaenóico.

Os resultados da ingestão média diária de micronutrientes na população em estudo estão descritos na Tabela 12. Foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre o grupo III e os outros dois grupos para a ingestão média diária de vitaminas B<sub>12</sub> e K, ácido pantoténico, biotina, cálcio, potássio, sódio (intrínseco dos alimentos e adicionado como tempero) e cloro.

Para todos estes compostos, foi no grupo I que se verificou o maior valor médio de ingestão e no grupo III o valor mais baixo. A ingestão diária de boro foi significativamente superior no

grupo I (6,63 mg) quando comparada com os outros dois grupos (grupo II: 4,35 mg vs. grupo III 3,60 mg). Foram também encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo I e o grupo III para a ingestão diária de tiamina, riboflavina, vitamina D, fósforo, zinco, iodo e molibdênio. Para todos estes compostos, foi no grupo I que se verificou o maior valor médio de ingestão e no grupo III o mais baixo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as médias de ingestão de retinol, carotenóides, niacina e todos os seus equivalentes, vitaminas B<sub>6</sub>, C e E, folatos, cobre, ferro, magnésio, manganésio e selênio.

**Tabela 12.** Ingestão média diária de micronutrientes na população em estudo.

Micronutriente	Grupo I (n = 75)	Grupo II (n = 75)	Grupo III (n = 143)	p
Retinol (µg)	526 <sup>a</sup> (432-621)	399 <sup>a</sup> (327-472)	418 <sup>a</sup> (342-494)	0,115
Carotenóides (µg)	983 <sup>a</sup> (849-1117)	1129 <sup>a</sup> (992-1266)	976 <sup>a</sup> (907-1046)	0,092
Tiamina (mg)	1,44 <sup>a</sup> (1,32-1,56)	1,32 <sup>a,b</sup> (1,24-1,41)	1,26 <sup>b</sup> (1,20-1,33)	<0,05
Riboflavina (mg)	1,92 <sup>a</sup> (1,73-2,10)	1,73 <sup>a,b</sup> (1,62-1,84)	1,59 <sup>b</sup> (1,51-1,68)	<0,01
Equivalentes de Niacina (mg)	17,7 <sup>a</sup> (16,3-19,2)	16,8 <sup>a</sup> (15,7-17,8)	16,5 <sup>a</sup> (15,6-17,3)	0,249
Vitamina B <sub>6</sub> (mg)	1,84 <sup>a</sup> (1,70-1,98)	1,69 <sup>a</sup> (1,59-1,78)	1,67 <sup>a</sup> (1,59-1,76)	0,054
Vitamina B <sub>12</sub> (µg)	8,16 <sup>a</sup> (7,29-9,02)	7,50 <sup>a</sup> (6,70-8,29)	6,26 <sup>b</sup> (5,76-6,76)	<0,01
Folatos (µg)	277 <sup>a</sup> (249-305)	259 <sup>a</sup> (239-278)	265 <sup>a</sup> (250-281)	0,507
Ácido pantoténico (mg)	4,14 <sup>a</sup> (3,80-4,48)	3,77 <sup>a</sup> (3,55-4,00)	3,37 <sup>b</sup> (3,21-3,52)	<0,01
Vitamina C (mg)	129 <sup>a</sup> (115-143)	129 <sup>a</sup> (117-141)	112 <sup>a</sup> (105-119)	0,058
Vitamina D (µg)	3,31 <sup>a</sup> (2,97-3,65)	3,12 <sup>a,b</sup> (2,81-3,42)	2,79 <sup>b</sup> (2,63-2,96)	<0,01
Vitamina E (mg)	8,07 <sup>a</sup> (7,36-8,78)	7,80 <sup>a</sup> (7,23-8,36)	7,38 <sup>a</sup> (6,99-7,78)	0,162
Vitamina K (µg)	18,0 <sup>a</sup> (15,2-20,8)	15,0 <sup>a</sup> (13,1-16,9)	11,7 <sup>b</sup> (10,4-13,0)	<0,01
Biotina (µg)	10,8 <sup>a</sup> (9,27-12,3)	9,47 <sup>a</sup> (8,48-10,5)	7,64 <sup>b</sup> (6,90-8,39)	<0,05
Cálcio (mg)	994 <sup>a</sup> (883-1105)	927 <sup>a</sup> (857-997)	794 <sup>b</sup> (746-841)	<0,05
Cobre (mg)	1,51 <sup>a</sup> (1,37-1,65)	1,40 <sup>a</sup> (1,31-1,45)	1,38 <sup>a</sup> (1,30-1,46)	0,146
Ferro (mg)	12,4 <sup>a</sup> (11,3-13,5)	11,6 <sup>a</sup> (10,8-12,4)	11,5 <sup>a</sup> (10,9-12,1)	0,258
Magnésio (mg)	310 <sup>a</sup> (283-337)	294 <sup>a</sup> (276-313)	295 <sup>a</sup> (280-310)	0,481
Manganésio (µg)	3,51 <sup>a</sup> (3,13-3,87)	3,42 <sup>a</sup> (3,16-3,69)	3,57 <sup>a</sup> (3,35-3,80)	0,730
Fósforo (mg)	1298 <sup>a</sup> (1181-1414)	1215 <sup>a,b</sup> (1140-1290)	1120 <sup>b</sup> (1068-1171)	<0,01
Potássio (mg)	3253 <sup>a</sup> (3015-3491)	3020 <sup>a</sup> (2863-3177)	2711 <sup>b</sup> (2600-2822)	<0,05
Selênio (µg)	113 <sup>a</sup> (103-123)	107 <sup>a</sup> (98,6-116)	101 <sup>a</sup> (95,8-107)	0,079
Sódio (mg)	3157 <sup>a</sup> (2879-3433)	2978 <sup>a</sup> (2808-3148)	2540 <sup>b</sup> (2445-2634)	<0,01
Zinco (mg)	10,3 <sup>a</sup> (9,36-11,3)	9,54 <sup>a,b</sup> (8,90-10,2)	8,61 <sup>b</sup> (8,20-9,02)	<0,01
Boro (mg)	6,63 <sup>a</sup> (4,33-6,92)	4,35 <sup>a,b</sup> (3,64-5,06)	3,60 <sup>b</sup> (3,12-4,08)	<0,01
Cloro (mg)	762 <sup>a</sup> (652-871)	701 <sup>a</sup> (628-775)	567 <sup>b</sup> (521-612)	<0,05
Iodo (µg)	101 <sup>a</sup> (84,0-117)	86,0 <sup>a,b</sup> (74,9-97,1)	69,1 <sup>b</sup> (61,0-77,1)	<0,01
Molibdênio (µg)	8,48 <sup>a</sup> (7,15-9,81)	6,84 <sup>a,b</sup> (5,91-7,78)	5,54 <sup>b</sup> (4,87-6,20)	<0,01

**Os resultados estão expressos como média (intervalo de confiança a 95%).** As médias na mesma linha assinaladas com letras diferentes (a, b, c) são estatisticamente diferentes de acordo com o teste post hoc de Bonferroni (p <0,05 ou p <0,01).

Na Tabela 13 são apresentados os resultados de prevalência da inadequação de ingestão de macronutrientes e seus constituintes obtidos para a população em estudo. Os valores de

prevalência foram calculados por comparação com os vários tipos de DRI: *Recommended Dietary Allowance* (RDA), *Adequate Intake* (AI), *Estimate Average Requirement* (EAR) e *Acceptable Macronutrient Distribution Range* (AMDR). Os referidos DRI utilizados foram definidos pelo *National Institute of Medicine* (190), sendo que, a RDA foi considerada a ingestão alimentar média que é suficiente para satisfazer as necessidades de um nutriente em aproximadamente (97-98%) todos os indivíduos saudáveis do mesmo género e estágio de vida. O AI corresponde à ingestão diária recomendável de um nutriente, baseado num conhecimento científico prévio. Este tipo de DRI é estimado como possivelmente superior ao valor da RDA, mas sobre o qual ainda existe considerável incerteza, sendo utilizado quando o valor do RDA não está disponível. O EAR corresponde ao nível de ingestão diário de um nutriente estimado para satisfazer as necessidades de metade dos indivíduos saudáveis de um grupo, tendo em consideração a idade e o género. É considerado o DRI mais apropriado para calcular a prevalência de inadequação de ingestão de um grupo, no entanto não foi possível utilizar o EAR nesse cálculo porque seriam necessários pelo menos dois dias de recolha de informação por participante para assim estimar a variabilidade intraindividual. O AMDR é a gama de ingestão de uma fonte particular de energia que está associada com a redução do risco de doenças crónicas e simultaneamente permite obter a ingestão adequada de nutrientes essenciais. Se um indivíduo consome um valor superior ou inferior ao intervalo definido na AMDR para um determinado nutriente, existe um aumento potencial do risco de desenvolver doenças crónicas.

De acordo com os resultados obtidos, todos os participantes no estudo têm uma ingestão adequada de proteína, isto é, dentro da gama definida pela AMDR (10-35% da ingestão energética total). Em relação aos hidratos de carbono, a maior prevalência da inadequação de ingestão foi observada no grupo I (34,7%), seguido do grupo II (29,3%). O grupo III foi o que obteve o menor valor de prevalência (17,5%), sendo estatisticamente diferente dos dois grupos de diabéticos. Em relação ao consumo de fibra verificou-se que mais de 50% dos participantes de cada grupo (grupo I: 61,3% vs. grupo II: 65,3% vs. grupo III: 56,6%) apresentava uma ingestão inadequada de fibra alimentar. No entanto não foram encontradas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos. A prevalência da inadequação de ingestão de gordura total foi também avaliada e comparada entre os três grupos. Os resultados obtidos indicaram que o grupo I foi o mais prevalente em relação à inadequação deste macronutriente, já que, 36% dos indivíduos deste grupo apresentaram uma ingestão de gordura acima da gama definida pela AMDR para a gordura total. No grupo III a percentagem de indivíduos com inadequação da ingestão de gordura total foi de 25,9%, no entanto, desses 36 indivíduos que apresentaram inadequação, um deles tinham um consumo de gordura total inferior ao valor estabelecido pela AMDR. O grupo II foi o que apresentou a menor prevalência da inadequação de ingestão de gordura total (22,7%), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. A prevalência da inadequação de ingestão de ácidos gordos ómega-6 e ómega-3 foi muito

elevada para todos os grupos (>70%). Em relação aos ácidos gordos ômega-6, verificou-se uma prevalência idêntica entre os grupos I e II (94,7%) e ligeiramente superior à prevalência obtida no grupo III (94,4%). No que diz respeito à inadequação de ingestão de ácidos gordos ômega-3, observou-se uma prevalência superior e estatisticamente significativa no grupo III (87,4%) quando comparado com o grupo II (73,3%), mas não com o grupo I (77,3%).

De acordo com as recomendações da *American Dietetic Association*, da *French Food Safety Agency* e da *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids* (330), a soma da ingestão diária de EPA e DHA deverá ser pelo menos de 500 mg para prevenir o aparecimento de doenças cardiovasculares. Existem também recomendações da *French Food Safety Agency* para o valor mínimo de ingestão de DHA que deverá ser de pelo menos 120 mg/dia. Actualmente não estão disponíveis quaisquer valores de DRI para a ingestão de EPA e DHA, sendo as recomendações descritas acima consideradas para avaliar a inadequação da ingestão destes nutrientes. De acordo com os resultados obtidos, a prevalência de ingestão inferior ao valor diário recomendado de 500 mg (somatório de EPA e DHA) é de 74,7% no grupo I, 78,7% no grupo II e 93,0% no grupo III. Estas percentagens indicam que a inadequação da ingestão destes ácidos gordos foi elevada para todos os grupos e que essa prevalência foi significativamente superior no grupo III quando comparado com os outros dois grupos. Quando se calculou apenas a prevalência da inadequação de ingestão de DHA verificou-se que essa percentagem não era superior a 15% para todos os grupos e que mais uma vez foi no grupo III que se obteve a maior prevalência embora não diferisse significativamente dos outros grupos. De acordo com os resultados obtidos para a prevalência da inadequação da ingestão diária de EPA e DHA (330), todos os grupos populacionais têm um risco significativo de aparecimento e/ou progressão de DCV.

**Tabela 13.** Prevalência da inadequação de ingestão de macronutrientes e seus constituintes na população em estudo.

Nutriente	Gênero e grupo etário	DRI	Grupo I (n = 75)	Grupo II (n = 75)	Grupo III (n = 143)
Proteína (% de ingestão energética total)	Adultos (>18 anos)	10-35**	0 <sup>a</sup> (0,0)	0 <sup>a</sup> (0,0)	0 <sup>a</sup> (0,0)
Hidratos de carbono (% de ingestão energética total)	Adultos (>18 anos)	45-65**	26 <sup>a</sup> (34,7)	22 <sup>a</sup> (29,3)	25 <sup>b</sup> (17,5)
Fibra total (g/dia)	Homens		46 <sup>a</sup> (61,3)	49 <sup>a</sup> (65,3)	81 <sup>a</sup> (56,6)
	31-50 anos	38*			
	>50 anos	30*			
	Mulheres				
	31-50 anos	25*			
	>50 anos	21*			
Gordura total (% de ingestão energética total)	Adultos (>18 anos)	20-35**	27 <sup>a</sup> (36,0)	17 <sup>a</sup> (22,7)	37 <sup>a</sup> (25,9)
Ácidos gordos ômega-6 (g/dia)	Homens		71 <sup>a</sup> (94,7)	71 <sup>a</sup> (94,7)	135 <sup>a</sup> (94,4)
	31-50 anos	17*			
	>50 anos	14*			
	Mulheres				
	31-50 anos	12*			
	>50 anos	11*			
Ácidos gordos ômega-3 (g/dia)	Homens (>18 anos)	1,6*	58 <sup>a,b</sup> (77,3)	55 <sup>b</sup> (73,3)	125 <sup>a</sup> (87,4)
	Mulheres (>18 anos)	1,1*			
EPA + DHA (mg/dia)	Adultos (>18 anos)	500***	56 <sup>a</sup> (74,7)	59 <sup>a</sup> (78,7)	133 <sup>b</sup> (93,0)
DHA (mg/dia)	Adultos (>18 anos)	120***	11 <sup>a</sup> (14,7)	10 <sup>a</sup> (13,3)	18 <sup>a</sup> (12,6)

**Os resultados estão expressos como número de indivíduos e (percentagem por coluna).** As proporções na mesma linha assinaladas com letras diferentes (a, b) são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Z para comparação de proporções ( $p < 0,05$ ). AI, *Adequate Intake*; AMRD, *Acceptable Macronutrient Distribution Range*; DHA, ácido docosahexaenóico; DRI, *Dietary Reference Intake*; EPA, ácido eicosapentaenóico.

\*AI (190).

\*\*AMRD (190).

\*\*\*Valores de referência para avaliar a inadequação da ingestão de EPA e DHA (330).

Os resultados de prevalência da inadequação de ingestão de micronutrientes obtidos para a população em estudo estão descritos na Tabela 14. Os referidos resultados foram obtidos por comparação com valores de referência da RDA e AI. De acordo com os resultados obtidos, a prevalência da inadequação de ingestão de vitamina A foi inferior a 20% em todos os grupos, sendo o grupo I o que obteve a maior prevalência e o grupo II a menor. No entanto, não foram verificadas diferenças estatísticas entre as proporções de prevalência nos grupos. Em relação à tiamina a prevalência da ingestão inferior ao valor recomendado variou entre 29,3% (grupo I) e 38,5% (grupo III), não tendo sido verificado diferenças significativas entre os grupos. Para a riboflavina os valores obtidos foram: grupo I (14,7%), grupo II (10,7%) e grupo III (21,0%). Não foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos populacionais. A prevalência

da inadequação de ingestão de niacina e seus equivalentes foi superior a 35% nos três grupos e sem diferenças estatísticas entre eles. O grupo I (44,0%) foi o que obteve a maior prevalência e o grupo II a menor (36,0%). Em relação à vitamina B<sub>6</sub>, a prevalência foi cerca de 40% em todos os grupos, não tendo sido verificado diferenças significativas entre eles. A frequência de ingestão de folatos abaixo do valor da RDA foi superior a 85% em todos os grupos, sendo que, o grupo que obteve maior prevalência de inadequação foi o II e o que obteve menor foi o I. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Em relação ao ácido pantoténico verificou-se uma prevalência na inadequação de ingestão superior a 75% em todos os grupos. O grupo III foi o que obteve maior prevalência (95,1) e o grupo I o que obteve a menor (78,7%). Foram observadas diferenças estatísticas entre as proporções do grupo I com as dos grupos II e III. A ingestão de vitamina C inferior ao valor RDI recomendado foi de 21,3% para o grupo I, 13,3% para o grupo II e 22,4% para o grupo III. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Em relação à ingestão de vitamina D e K, todos os participantes no estudo apresentaram valores de ingestão inferiores aos valores estabelecidos pela RDA ou pela AI, respectivamente. A prevalência da inadequação de ingestão de vitamina E e de biotina foi também extremamente elevado em todos os grupos estudados. Para a vitamina E, o grupo I obteve uma percentagem de prevalência de 96,0%, o grupo II de 100% e o grupo III de 98,6%. No caso da biotina a prevalência foi de 98,7% no grupo I, de 100% nos grupos II e III. De todas as vitaminas avaliadas, a B<sub>12</sub> foi a única em que a prevalência da inadequação de ingestão foi insignificante ou inexistente.

Em relação a todos os minerais avaliados os que apresentaram maior prevalência de inadequação da ingestão foram o potássio, o cloro e o molibdénio. Em relação ao potássio foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos I e III, sendo que, o grupo I foi o que obteve a menor prevalência (93,3%) e o grupo III o que obteve a maior (100%). No que se refere à ingestão de cloro observou-se maior prevalência de inadequação nos grupos II e III (100%) do que no grupo I (96,0%), sendo essa diferença significativa. Para o molibdénio foi verificado que toda a população tinha uma ingestão inadequada, isto é, abaixo do valor da RDA. A prevalência da inadequação de ingestão de cálcio foi significativamente superior no grupo III (78,3%) em relação aos grupos I (58,7%) e II (61,3%). A prevalência de ingestão de cobre, manganésio e fósforo inferior ao valor da DRA ou da AI, foi inferior a 20% em todos os grupos. No entanto, para o cobre e fósforo não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos, mas em relação à ingestão de manganésio verificou-se que essa prevalência foi significativamente superior no grupo I (17,3%) em relação ao grupo III (7,7%). A prevalência da inadequação de ingestão de ferro foi semelhante e relativamente baixa em todos os grupos (grupo I: 13,3% vs. grupo II: 21,3% vs. grupo: 14,7%). Para o magnésio e iodo, a prevalência de ingestão inadequada foi também muito elevada, sendo superior a 70% em todos os grupos. No caso do magnésio não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, mas para o iodo verificou-se que a prevalência da inadequação era significativamente

## *Resultados*

superior no grupo III (89,5%) em relação ao grupo I (78,7%). Em relação à ingestão de zinco, a prevalência de inadequação foi superior a 45% em todos os grupos, mas sem diferenças estatísticas entre eles. De todos os minerais avaliados em relação à inadequação de ingestão, o selênio e o sódio (alimentos e adicionado) foram os únicos em que não foram observados participantes com ingestões inferiores ao valor estabelecido pela RDA. Sendo o sódio preponderante no desenvolvimento da hipertensão arterial, e sendo esta, um factor de risco clássico da DCV, considerou-se importante avaliar a prevalência de ingestão de sódio acima dos valores recomendados pela FDA (221) e pela OMS (331). Assim, a prevalência de ingestão acima do valor máximo recomendado pela FDA (2,3 g/dia) foi de 84% para o grupo I, 81,3% para o grupo II e 65% para o grupo III. Comparando as proporções de cada grupo pela aplicação do teste Z ( $p < 0,05$ ), verificou-se que existiam diferenças estatisticamente significativas entre o grupo III e os outros dois grupos. Quando os valores de ingestão de sódio foram comparados com o valor máximo recomendado pela OMS (2,0 g/dia) a prevalência de participantes com ingestão de sódio acima do valor recomendado foi superior a 80% em todos os grupos, sendo de 93,3% para os grupos I e II e de 83,2% para o grupo III. Foram também verificadas diferenças estatísticas significativas entre o grupo III e os outros dois grupos.

**Tabela 14.** Prevalência da inadequação de ingestão de micronutrientes na população em estudo.

Nutriente	Gênero e grupo etário	DRI	Grupo I (n = 75)	Grupo II (n = 75)	Grupo III (n = 143)
Vitamina A (µg/dia)	Homens (>30 anos)	900*	11 <sup>a</sup> (14,7)	6 <sup>a</sup> (8,0)	17 <sup>a</sup> (11,9)
	Mulheres (>30 anos)	700*			
Tiamina (mg/dia)	Homens (>30 anos)	1,1*	22 <sup>a</sup> (29,3)	26 <sup>a</sup> (34,7)	55 <sup>a</sup> (38,5)
	Mulheres (>30 anos)	1,2*			
Riboflavina (mg/dia)	Homens (>30 anos)	1,3*	11 <sup>a</sup> (14,7)	8 <sup>a</sup> (10,7)	30 <sup>a</sup> (21,0)
	Mulheres (>30 anos)	1,1*			
Equivalentes de Niacina (mg/dia)	Homens (>30 anos)	16*	33 <sup>a</sup> (44,0)	27 <sup>a</sup> (36,0)	54 <sup>a</sup> (37,8)
	Mulheres (>30 anos)	14*			
Vitamina B <sub>6</sub> (mg/dia)	Homens (31-50 anos)	1,3*	31 <sup>a</sup> (41,3)	30 <sup>a</sup> (40,0)	57 <sup>a</sup> (39,9)
	Homens (>50 anos)	1,7*			
	Mulheres (31-50 anos)	1,3*			
	Mulheres (>50 anos)	1,5*			
Vitamina B <sub>12</sub> (µg/dia)	Adultos (>30 anos)	2,4*	1 <sup>a</sup> (1,3)	0 <sup>a</sup> (0,0)	5 <sup>a</sup> (3,5)
Folatos (µg/dia)	Adultos (>30 anos)	400*	65 <sup>a</sup> (86,7)	69 <sup>a</sup> (92,0)	127 <sup>a</sup> (88,8)
Ácido pantoténico (mg/dia)	Adultos (>30 anos)	5**	59 <sup>a</sup> (78,7)	68 <sup>b</sup> (90,7)	136 <sup>b</sup> (95,1)
Vitamina C (mg/dia)	Homens (>30 anos)	90*	16 <sup>a</sup> (21,3)	10 <sup>a</sup> (13,3)	32 <sup>a</sup> (22,4)
	Mulheres (>30 anos)	75*			
Vitamina D (µg/dia)	Adultos (31-70 anos)	15*	75 <sup>a</sup> (100)	75 <sup>a</sup> (100)	143 <sup>a</sup> (100)
	Adultos (>70 anos)	20*			
Vitamina E (mg/dia)	Adultos (>30 anos)	15	72 <sup>a</sup> (96,0)	75 <sup>a</sup> (100)	142 <sup>a</sup> (98,6)
Vitamina K (µg/dia)	Homens (>30 anos)	120**	75 <sup>a</sup> (100)	75 <sup>a</sup> (100)	143 <sup>a</sup> (100)
	Mulheres (>30 anos)	90**			
Biotina (µg/dia)	Adultos (>30 anos)	30**	74 <sup>a</sup> (98,7)	75 <sup>a</sup> (100)	143 <sup>a</sup> (100)
Cálcio (mg/dia)	Adultos (31-50 anos)	1000*	44 <sup>a</sup> (58,7)	46 <sup>a</sup> (61,3)	112 <sup>b</sup> (78,3)
	Homens (51-70 anos)	1000*			
	Homens (>70 anos)	1200*			
	Mulheres (>50 anos)	1200*			
Cobre (µg/dia)	Adultos (>30 anos)	900*	5 <sup>a</sup> (6,7)	6 <sup>a</sup> (8,0)	14 <sup>a</sup> (9,8)
Ferro (mg/dia)	Homens (>30 anos)	8*	10 <sup>a</sup> (13,3)	16 <sup>a</sup> (21,3)	21 <sup>a</sup> (14,7)
	Mulheres (31-50 anos)	18*			
	Mulheres (>50 anos)	8*			
Magnésio (mg/dia)	Homens (>30 anos)	420*	60 <sup>a</sup> (80,0)	61 <sup>a</sup> (81,3)	107 <sup>a</sup> (74,8)
	Mulheres (>30anos)	320*			
Manganésio (mg/dia)	Homens (>30 anos)	2,3**	13 <sup>a</sup> (17,3)	6 <sup>a,b</sup> (8,0)	11 <sup>b</sup> (7,7)
	Mulheres (>30 anos)	1,8**			
Fósforo (mg/dia)	Adultos (>30 anos)	700*	4 <sup>a</sup> (5,3)	3 <sup>a</sup> (4,0)	11 <sup>a</sup> (7,7)
Potássio (g/dia)	Adultos (>30 anos)	4,7**	70 <sup>a</sup> (93,3)	74 <sup>a,b</sup> (98,7)	143 <sup>b</sup> (100)
Selénio (µg/dia)	Adultos (>30 anos)	55*	0 <sup>a</sup> (0,0)	0 <sup>a</sup> (0,0)	0 <sup>a</sup> (0,0)
Sódio (g/dia)	Adultos (30-50 anos)	1,5*	0 <sup>a</sup> (0,0)	0 <sup>a</sup> (0,0)	0 <sup>a</sup> (0,0)
	Adultos (51-70 anos)	1,3*			
	Adultos (>70 anos)	1,2*			

**Tabela 14.** Prevalência da inadequação de ingestão de micronutrientes na população em estudo (continuação).

Nutriente	Género e grupo etário	DRI	Grupo I (n = 75)	Grupo II (n = 75)	Grupo III (n = 143)
Zinco (mg/dia)	Homens (>30 anos) Mulheres (>30 anos)	11* 8*	34 <sup>a</sup> (45,3)	39 <sup>a</sup> (52,0)	80 <sup>a</sup> (55,9)
Cloro (g/dia)	Adultos (31-50 anos ) Adultos (51-70 anos) Adultos (>70 anos)	2,3** 2,0** 1,8**	72 <sup>a</sup> (96,0)	75 <sup>b</sup> (100)	143 <sup>b</sup> (100)
Iodo (µg/dia)	Adultos (>30 anos)	150*	59 <sup>a</sup> (78,7)	66 <sup>a,b</sup> (88,0)	128 <sup>b</sup> (89,5)
Molibdénio (µg/dia)	Adultos (>30 anos)	45*	75 <sup>a</sup> (100)	75 <sup>a</sup> (100)	143 <sup>a</sup> (100)

**Os resultados estão expressos como número de indivíduos e (percentagem por coluna).** As proporções na mesma linha assinaladas com letras diferentes (a, b) são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Z para proporções ( $p < 0,05$ ). H, homens; M, mulheres; DRI, *Dietary Reference Intake*; RDA, *Recommended Dietary Allowance*; AI, *Adequate Intake*.

\*RDA (190).

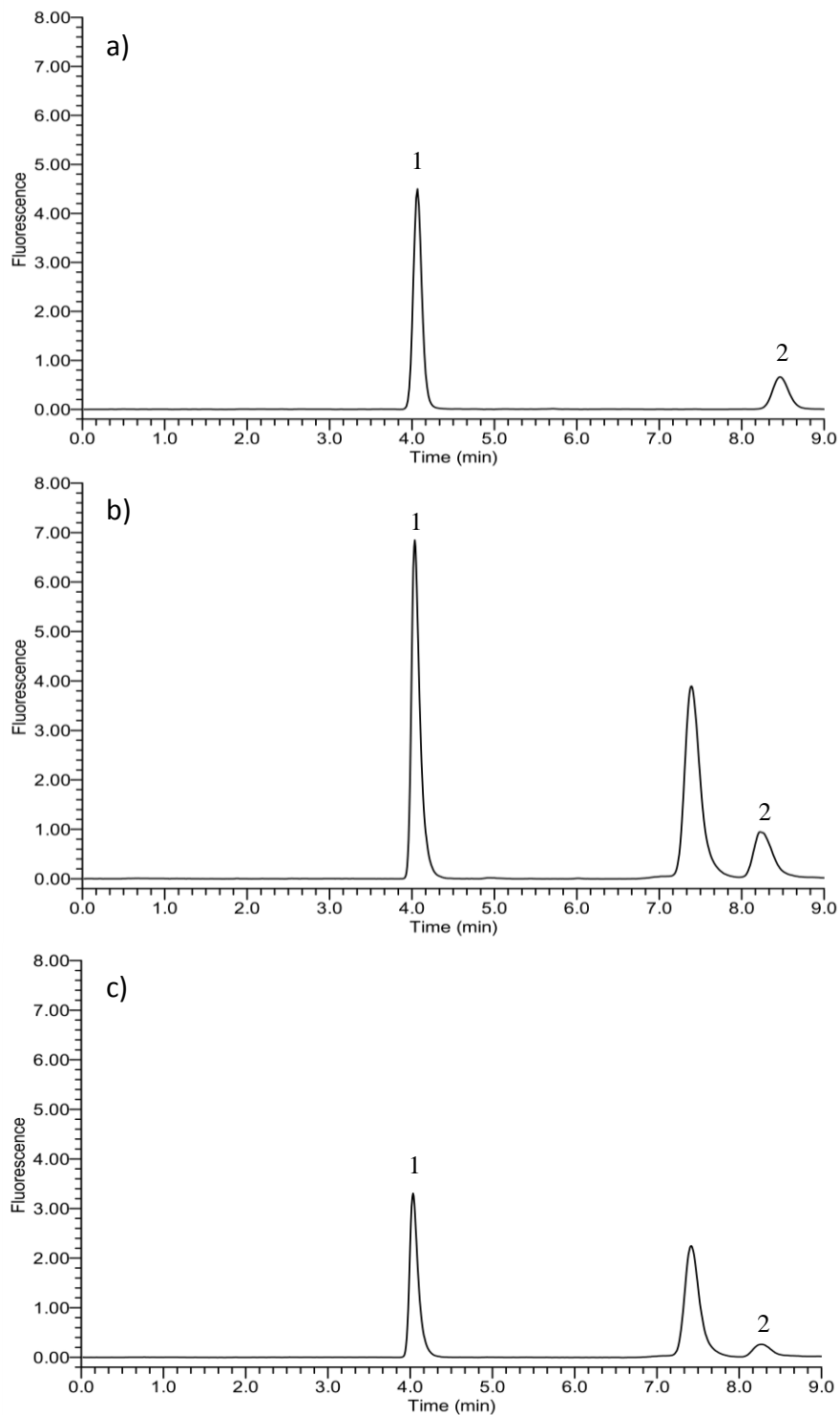
\*\*AI (190).

#### 4.4. Optimização e validação de métodos

##### 4.4.1 Doseamento da homocisteína e cisteína

Durante a optimização do método foram testadas diversas condições de análise e cromatográficas. O TCEP foi o agente escolhido para reduzir a Hcy porque é um composto não volátil, estável, solúvel em água e possibilita a redução da Hcy em aproximadamente 6 min. O agente de derivatização seleccionado foi o SBD-F, já que, não sendo fluorescente e não formando subprodutos de hidrólise, permite induzir a fluorescência dos derivados tióis formados pela reacção com a Hcy e Cys. De acordo com os resultados obtidos, não existem diferenças significativas entre as áreas dos picos da Hcy e Cys após a reacção de derivatização a 60 °C com o reagente SBD-F durante 40 min e 60 min. O tempo de reacção de 10 min foi também testado, mas os resultados obtidos são contrários aos descritos por Garcia *et al.* (332), já que foram obtidas áreas de picos de Hcy e Cys significativamente inferiores às conseguidas com os tempos de reacção de 40 min e 60 min. Este facto significa que 10 min não são suficientes para a reacção de derivatização estar completa. O tempo escolhido para a reacção de derivatização com SBF-F foi 40 min (333,334). Para além do tempo, o pH é também um factor preponderante para a derivatização dos aminotióis. As quantidades de derivados tióis fluorescentes aumentam gradualmente com a diminuição do pH (335). Uma elevada intensidade de fluorescência foi obtida para a Hcy numa gama de pH de 2 a 12, mas para o complexo formado entre o SBD-F e a Cys é necessário um meio extremamente ácido (pH 2,0 - 2,15) (336). Assim, o pH considerado óptimo e utilizado para induzir a reacção de derivatização em ambos os compostos foi de 2,1. Foram testadas diferentes composições da fase móvel para optimizar a eluição da Hcy e Cys. O melhor rácio entre a fase aquosa e a fase orgânica foi de 96:4 (dihidrogenofosfato de potássio (30 mM) com valor de pH 2,1/acetoneitrilo,

v/v). Com esta composição de fase móvel, os tempos de retenção obtidos para a Hcy e Cys foram adequados e a separação dos compostos foi óptima (factor de resolução = 7,82). A concentração do tampão fosfato da fase móvel foi também avaliada. Não foram verificadas alterações no cromatograma para as diferentes concentrações testadas (100 mM, 50 mM e 30 mM). Assim, a concentração de 30 mM foi a escolhida, pois permitiu manter o valor de pH da fase móvel, aumentar o tempo de utilização da coluna cromatográfica e proteger o equipamento de condições cromatográficas mais adversas. Estas características tornam o método adequado a estudos epidemiológicos. Durante o procedimento de preparação da amostra, a diluição do plasma e o volume de injeção utilizados foram mínimos. O equipamento com a melhor performance de resultados foi o sistema de UPLC<sup>®</sup> Acquity, já que, para a mesma solução padrão (Hcy e Cys) e condições cromatográficas, o equipamento de UPLC<sup>®</sup> demonstrou ter uma sensibilidade três vezes superior em relação ao HPLC 2695<sup>®</sup>. As condições cromatográficas óptimas foram: a) volume de injeção - 10 µL; b) fluxo - 1 mL/min; c) temperatura do injetor automático - 6 °C e d) temperatura da coluna - 20 °C. Na Fig. 7 estão representados os cromatogramas de uma mistura padrão de Hcy e Cys e de amostras de plasma contendo os dois aminotióis. O tempo da corrida cromatográfica foi estabelecido em 10 min, sendo o tempo de retenção da Cys 4,0 min e da Hcy de 8,4 min. Não foram observados interferentes nos cromatogramas da mistura padrão, mesmo após uma corrida teste de 60 min. Nos cromatogramas das amostras existe um pico que surge sempre bem separado da Hcy. Ambos os compostos foram identificados na amostra por comparação dos tempos de retenção obtidos no cromatograma da mistura padrão e por sobrecarga da amostra com padrão.

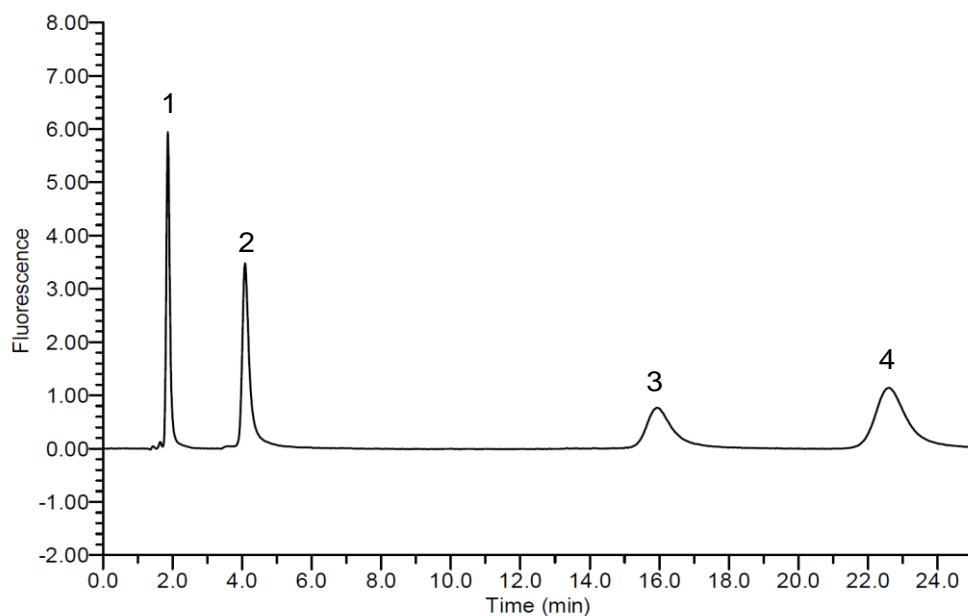


**Figura 7. Cromatogramas obtidos no método de doseamento de Hcy e Cys:** a) mistura padrão com (1) 175  $\mu\text{M}$  de Cys e (2) 10  $\mu\text{M}$  de Hcy; b) amostra de plasma de um diabético de tipo 2 com (1) 342,7  $\mu\text{M}$  de Cys e (2) 23,7  $\mu\text{M}$  de Hcy; c) amostra de plasma de um controle com (1) 165,3  $\mu\text{M}$  de Cys e (2) 7,2  $\mu\text{M}$  de Hcy.

Os resultados da validação do método de doseamento da Hcy e Cys no plasma estão descritos na Tabela 15. Os LD e LQ obtidos foram confirmados experimentalmente. A gama de trabalho foi estabelecida após a realização do estudo da linearidade pela aplicação de uma análise de regressão linear. A equação de regressão média da Hcy foi  $y = 8600,11x + 2580,58$  e da Cys foi  $y = 1773,25x + 8431,00$ . A média dos coeficientes de determinação das cinco rectas de calibração utilizadas foi de 0,998 para a Hcy e de 0,993 para a Cys. A variação do declive entre as rectas de calibração foi inferior a 15%. A aplicação do teste da ANOVA de factor único provou a existência de homogeneidade de variâncias dentro das gamas de trabalho dos dois compostos. Os resultados da linearidade indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,05$ ) entre as várias rectas de calibração preparadas para os dois analitos em estudo. A repetibilidade do método ( $n = 6$ ) para a Hcy variou de 2,14% ( $8,38 \pm 0,179 \mu\text{M}$ ) a 4,06% ( $8,81 \pm 0,357 \mu\text{M}$ ) e para a Cys foi de 2,35% ( $265 \pm 6,22 \mu\text{M}$ ) até 2,66% ( $255 \pm 6,79 \mu\text{M}$ ). A precisão intermédia ( $n = 18$ ) foi 4,27% ( $8,18 \pm 0,350 \mu\text{M}$ ) para a Hcy e 3,07% ( $255 \pm 7,84 \mu\text{M}$ ) para a Cys. A exactidão do método foi avaliada pela adição de padrão de Hcy ( $n = 5$ ) nas concentrações de 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  e de Cys ( $n = 5$ ) com 175, 250 e 300  $\mu\text{M}$ . Os resultados da recuperação para Hcy variaram de 92,0% ( $27,6 \pm 2,15 \mu\text{M}$ ) a 95,2% ( $57,1 \pm 1,35 \mu\text{M}$ ) e para a Cys de 90,0% ( $270 \pm 6,10 \mu\text{M}$ ) a 92,8% ( $231 \pm 0,773 \mu\text{M}$ ).

#### 4.4.2. Doseamento da vitamina B<sub>6</sub>

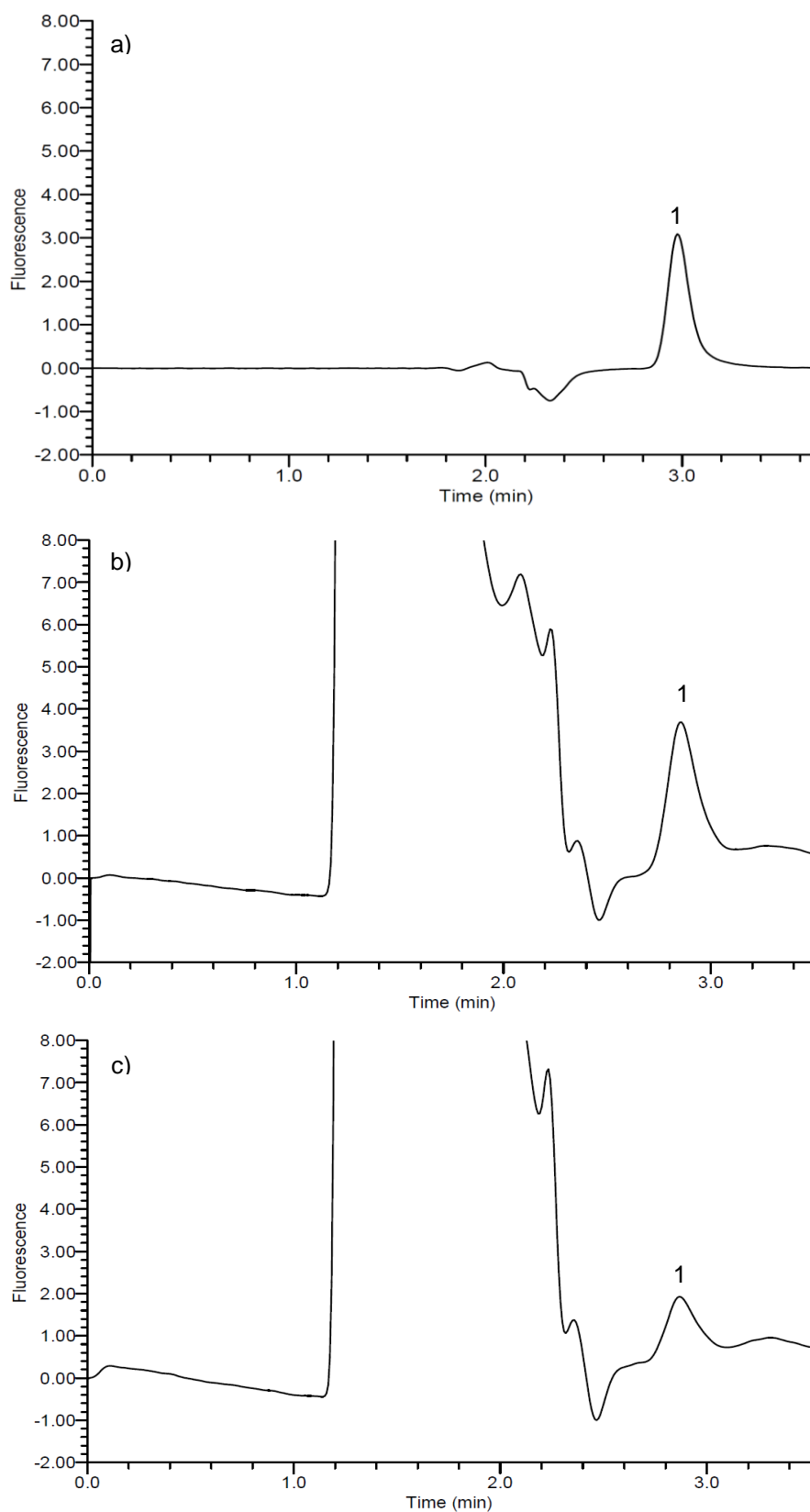
Durante a optimização do método foram testadas diversas condições de análise e cromatográficas. O método permitiu quantificar quatro formas interconvertíveis da vitamina B<sub>6</sub>: PLF, PXM, PL e PXN. Os comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão de cada um dos vitâmeros foram determinados por um espectro obtido no detector de fluorescência Alliance<sup>®</sup> 2475 da Waters. Inicialmente foi determinado o comprimento de onda excitação máximo numa gama de 200 a 300 nm e posteriormente o comprimento de onda máximo de emissão numa gama de 310 a 500 nm. No entanto, os valores obtidos foram muito semelhantes e deste modo foi definido um único comprimento de onda de excitação (290 nm) e de emissão (400 nm). Foram preparadas diversas misturas padrão com os quatro vitâmeros. Na Fig. 8, é apresentado um cromatograma de uma mistura padrão da vitamina B<sub>6</sub>. O PLF é a principal forma activa de vitamina B<sub>6</sub> no plasma e por isso o seu doseamento é crucial para avaliar os níveis plasmáticos de vitamina B<sub>6</sub>. Durante o desenvolvimento do método foi também verificado este facto, já que, a concentração dos outros vitâmeros nos cromatogramas das amostras foi sempre inferior ao LD. Assim, foi apenas determinada a concentração de PLF.



**Figura 8. Cromatograma de uma mistura padrão das várias formas da vitamina B<sub>6</sub>: (1) PLF, (2) PXM, (3) PXL e (4) PXN.**

Na Fig. 9, estão representados os cromatogramas de um padrão de PLF e de amostras de plasma. O tempo da corrida cromatográfica foi definido em 3,5 min, sendo o tempo de retenção do padrão de PLF superior ao observado (2,9 min) na mistura padrão (2,0 min) dos diversos vitâmeros da B<sub>6</sub>. Foram observadas substâncias interferentes nos cromatogramas das amostras após várias corridas de teste de 40 min. Para que não fosse necessário aumentar significativamente o tempo de corrida de cada amostra, optou-se por lavar a coluna entre cada injeção com uma solução de água ultrapura/acetoneitrilo (70:30, v/v). O PLF foi identificado por comparação do tempo de retenção do composto no padrão e na amostra, bem como, pela sobrecarga da amostra com padrão. No desenvolvimento da fase móvel foi testado o efeito do pH com os seguintes valores: 3,0; 3,5 e 4,0 e da concentração de dihidrogenofosfato de potássio. O valor de pH 3,0 e a concentração de 100 mM de dihidrogenofosfato de potássio foram as condições que permitiram obter uma melhor retenção do PLF na coluna cromatográfica e consequente aumento do tempo de retenção e melhor separação da frente do solvente. De todas as colunas testadas durante a otimização do método apenas com Synergi™Hydro-RP (150 × 4,6 mm diâmetro interno, 4,0 µm tamanho de partícula) da Phenomenex (Torrance, California, EUA) foi possível obter cromatogramas com uma boa separação entre a frente do solvente e o PLF. No entanto é de referir que utilizando a coluna Aquasil™ C18 (150 x × 4,6 mm diâmetro interno, 5,0 µm tamanho de partícula) da Thermo Hypersil-Keystone LLC (Bellefonte, EUA) conseguiu-se obter cromatogramas com uma

separação aceitável entre a frente do solvente e o PLF mas apenas para concentrações mais elevadas de padrão.

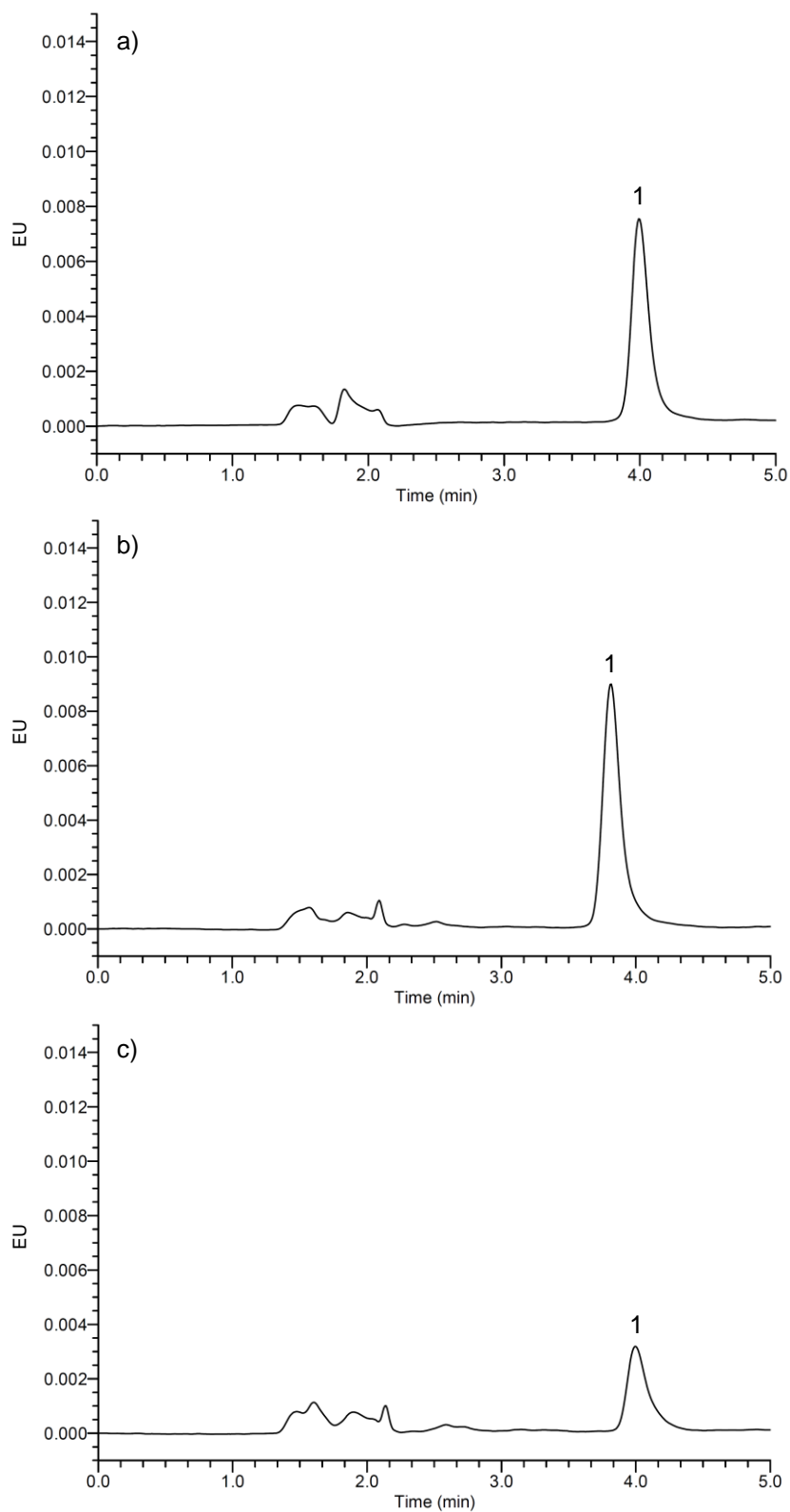


**Figura 9. Cromatogramas obtidos no método de doseamento de PLF:** a) padrão de PLF com (1) 70 nM; b) amostra de plasma de um diabético de tipo 2 com (1) 50,1 nM de PLF; c) amostra de plasma de um controlo com (1) 14,8 nM de PLF.

Os resultados da validação do método de doseamento do PLF no plasma estão apresentados na Tabela 15. Para o PLF foram obtidos um LD de 2,59 nM e um LQ de 7,84 nM. A gama de trabalho (10 - 210 nM) foi estabelecida após a realização do estudo da linearidade pela aplicação de uma análise de regressão linear. A equação de regressão média do PLF foi  $y = 15797,63x - 1351,34$ . A média dos coeficientes de determinação das cinco rectas de calibração utilizadas foi de 0,9993. A variação do declive entre as rectas de calibração foi inferior a 15%. A aplicação do teste da ANOVA de factor único confirmou a existência de homogeneidade de variâncias dentro da gama de trabalho. Os resultados da linearidade indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,05$ ) entre as várias rectas de calibração. A repetibilidade do método ( $n = 5$ ) variou de 2,15% ( $55,4 \pm 1,19$  nM) a 3,28% ( $52,6 \pm 1,72$  nM). A precisão intermédia ( $n = 15$ ) foi de 4,10% ( $55,1 \pm 2,26$  nM). A exactidão do método foi avaliada pela adição de padrão de PLF ( $n = 3$ ) nas concentrações de 10, 130 e 210 nM. A recuperação do PLF variou de 91,4% ( $9,14 \pm 0,658$  nM) a 99,2% ( $129 \pm 0,661$ nM).

### 4.4.3. Doseamento da vitamina C

Durante a optimização do método foram testadas diversas condições de análise e cromatográficas. Os resultados do estudo de estabilidade do AA nas amostras de plasma heparinizado indicaram que após congelação a  $-80$  °C as amostras com adição prévia da solução de estabilização (ácido perclórico e ácido metafosfórico) mantiveram-se estáveis por todos os períodos de tempo estudados (24 h, 48 h, 1 semana e 2 semanas) apresentando perdas de concentração sempre inferiores a 3%, enquanto nas amostras congeladas sem solução de estabilização, a concentração de AA nas amostras diminuiu sempre mais do que 8%. No que se refere à fase móvel, o valor de pH de 3,5 foi o que permitiu obter melhores resultados cromatográficos para padrões e amostras. A concentração de tampão fosfato de 20 mM foi considerado suficiente para manter o valor de pH da fase móvel. Os cromatogramas de um padrão de AA e de amostras de plasma estão representados na Fig. 10. O tempo da corrida cromatográfica foi de 5 min, sendo o tempo de retenção do AA de 4,1 min. Não foram observadas substâncias interferentes nos cromatogramas das amostras após várias corridas de teste de 40 min. O AA foi identificado por comparação do tempo de retenção do composto no padrão e na amostra, bem como, pela comparação dos espectros do padrão e da amostra. As condições cromatográficas óptimas foram: a) volume de injeção: 30  $\mu$ L; b) fluxo: 0,8 mL/min; c) temperatura do injectador automático: 4 °C; d) temperatura da coluna: 20 °C.

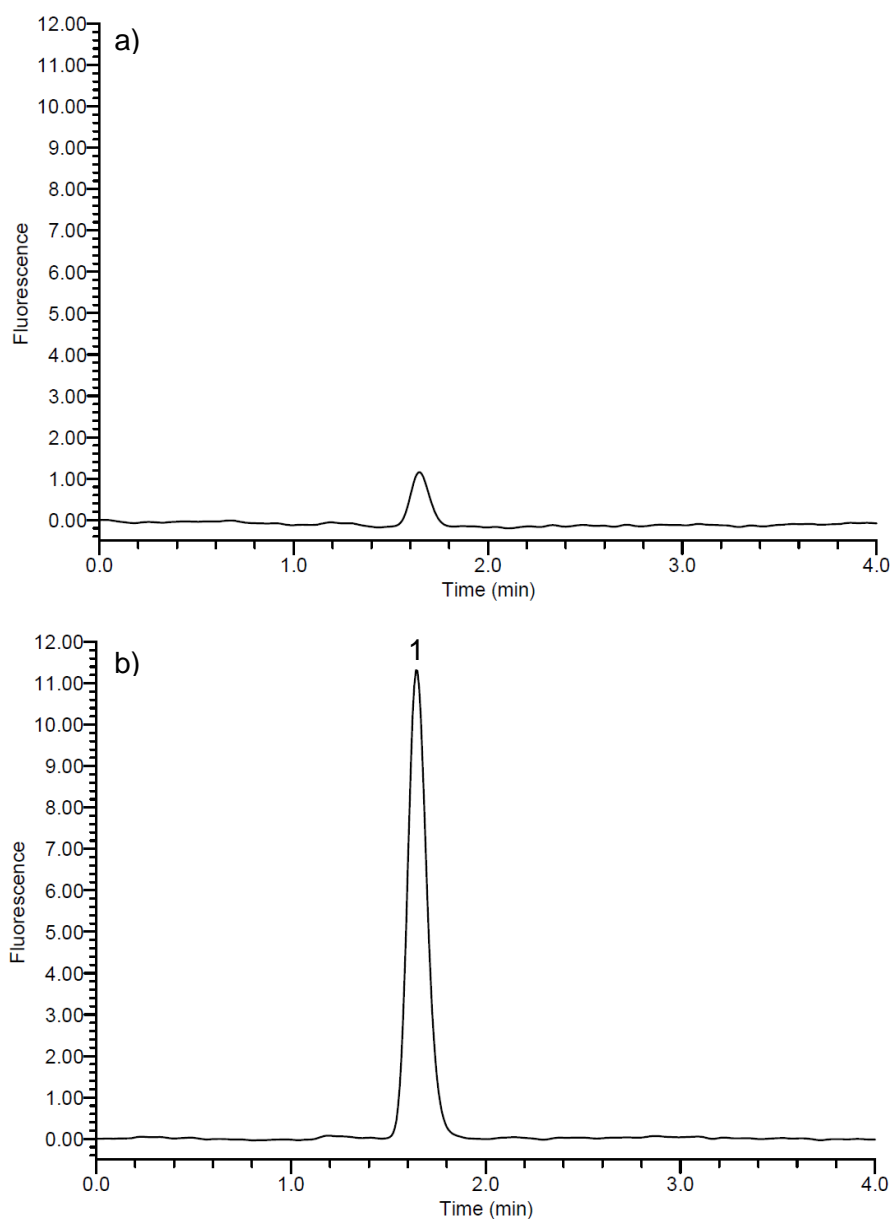


**Figura 10. Cromatogramas obtidos no método de doseamento de AA:** a) solução padrão com (1) 5 µg/mL de AA; b) amostra de plasma de um não diabético com (1) 6,4 µg/mL de AA; c) amostra de plasma de um diabético de tipo 2 com (1) 2,7 µg/mL de AA.

Os resultados da validação do método de doseamento do AA no plasma estão descritos na Tabela 15. Os LD e LQ obtidos foram confirmados experimentalmente. A gama de trabalho (1-30 µg/mL) foi definida após a realização do estudo da linearidade pela aplicação de uma análise de regressão linear. A equação de regressão média do AA foi  $y = 26517,22x - 5563,73$ . A média dos coeficientes de determinação das seis rectas de calibração utilizadas foi de 0,9997. A variação do declive entre as rectas de calibração foi inferior a 15%. A aplicação do teste da ANOVA de factor único confirmou a existência de homogeneidade de variâncias dentro da gama de trabalho. Os resultados da linearidade indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,05$ ) entre as várias rectas de calibração. A repetibilidade do método ( $n = 6$ ) variou de 2,05% ( $13,7 \pm 0,281$  µg/mL) a 3,98% ( $13,8 \pm 0,548$  µg/mL). A precisão intermédia ( $n = 18$ ) foi de 3,01% ( $13,7 \pm 0,412$  µg/mL). A exactidão do método foi avaliada pela adição de padrão de AA ( $n = 6$ ) nas concentrações de 5, 15 e 25 µM. Os resultados da recuperação variaram de 91,0% ( $4,55 \pm 0,275$  µg/mL) a 98,8% ( $24,7 \pm 0,963$  µg/mL).

#### 4.4.4. Doseamento do MAD

Inicialmente foi implementado um método de HPLC com detecção por fluorescência baseado na formação do complexo fluorescente MAD-TBA. O referido método não tinha a sensibilidade e especificidade requeridas, algo que foi comprovado pela presença de picos interferentes nas soluções de branco injectadas no HPLC e no tempo de retenção do MAD. Foi posteriormente implementado e otimizado um método de HPLC com detecção por UV. A coluna Synergi™Hydro-RP (150 × 4,6 mm diâmetro interno, 4,0 µm tamanho de partícula) da Phenomenex (Torrance, California, EUA) foi a única que permitiu obter uma boa separação entre a frente do solvente e o MAD. Os cromatogramas de uma solução de branco e de uma mistura padrão preparada durante o desenvolvimento do método de HPLC com detecção por fluorescência estão representados na Fig. 11. O tempo de retenção do MAD foi de 1,64 min e o tempo da corrida cromatográfica foi de 4,0 min. Comparando os dois cromatogramas podemos verificar que existe na solução de branco injectada um composto interferente que coeluiu com o MAD. Para além disso, o composto interferente não tinha uma área constante que pudesse ser subtraída à área do padrão. As condições cromatográficas óptimas foram: a) volume de injeção: 20 µL; b) fluxo: 1 mL/min; c) temperatura do injector automático: 6 °C; d) temperatura da coluna: 25 °C.

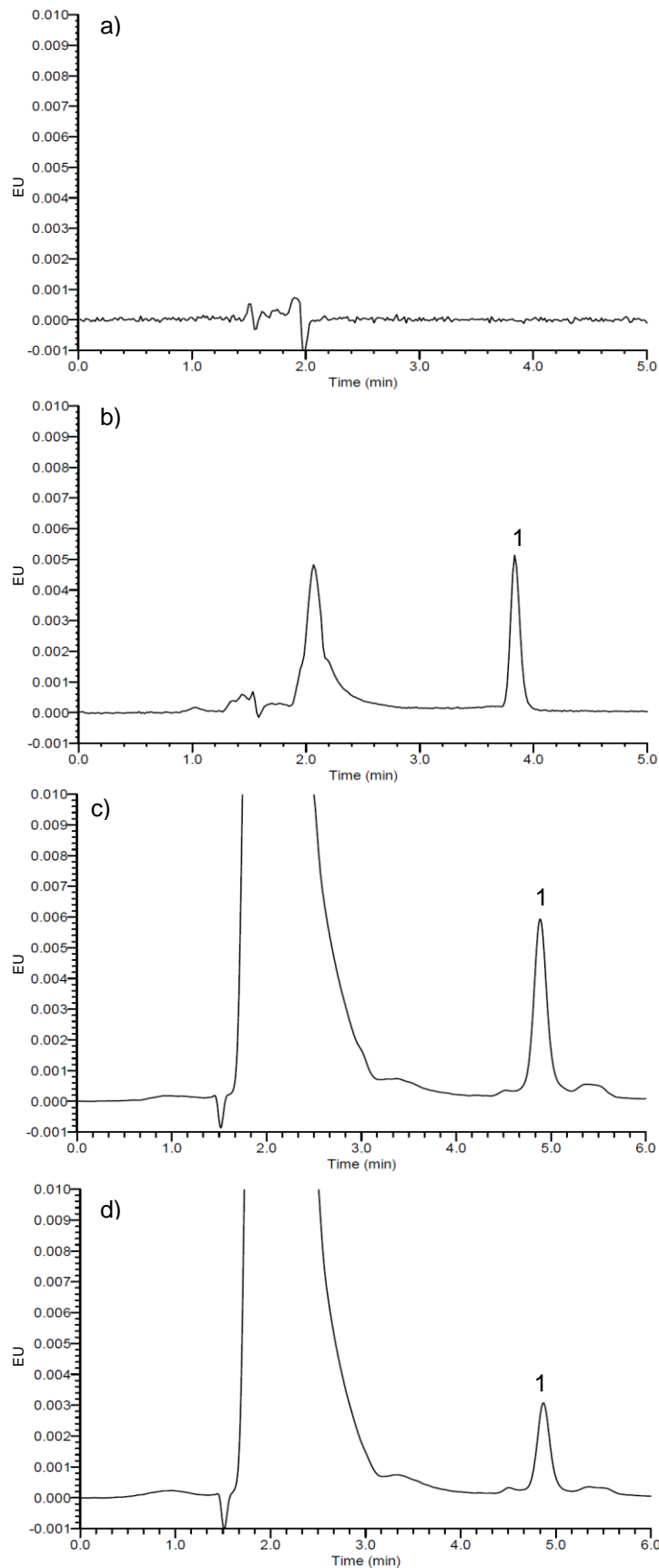


**Figura 11. Cromatogramas obtidos no método de doseamento de MAD com detecção por fluorescência:** a) solução de branco; b) solução padrão com (1) 1,4  $\mu\text{M}$  de MAD.

Na Fig. 12, estão apresentados os cromatogramas característicos de uma solução de branco, de padrão e de amostras obtidos após otimização do método de HPLC com detecção por UV. Neste método não foi observada a presença de substâncias interferentes nos cromatogramas das soluções de branco e nas amostras de soro após várias corridas de teste de 40 min. O MAD foi identificado por comparação do seu tempo de retenção no padrão (3,9 min) e na amostra, embora em algumas amostras tenha existido um aumento do tempo de retenção do

## Resultados

MAD comparativamente ao padrão, mas a identificação do MAD foi sempre confirmada pela comparação dos espectros do padrão e da amostra.



**Figura 12. Cromatogramas obtidos no método de doseamento de MAD com detecção por UV:** a) solução de branco; b) solução padrão com (1) 1,3 µM de MAD; c) amostra de soro de um diabético do tipo 2 com (1) 2,4 µM de MAD; d) amostra de soro de um controlo com (1) 1,1 µM de MAD.

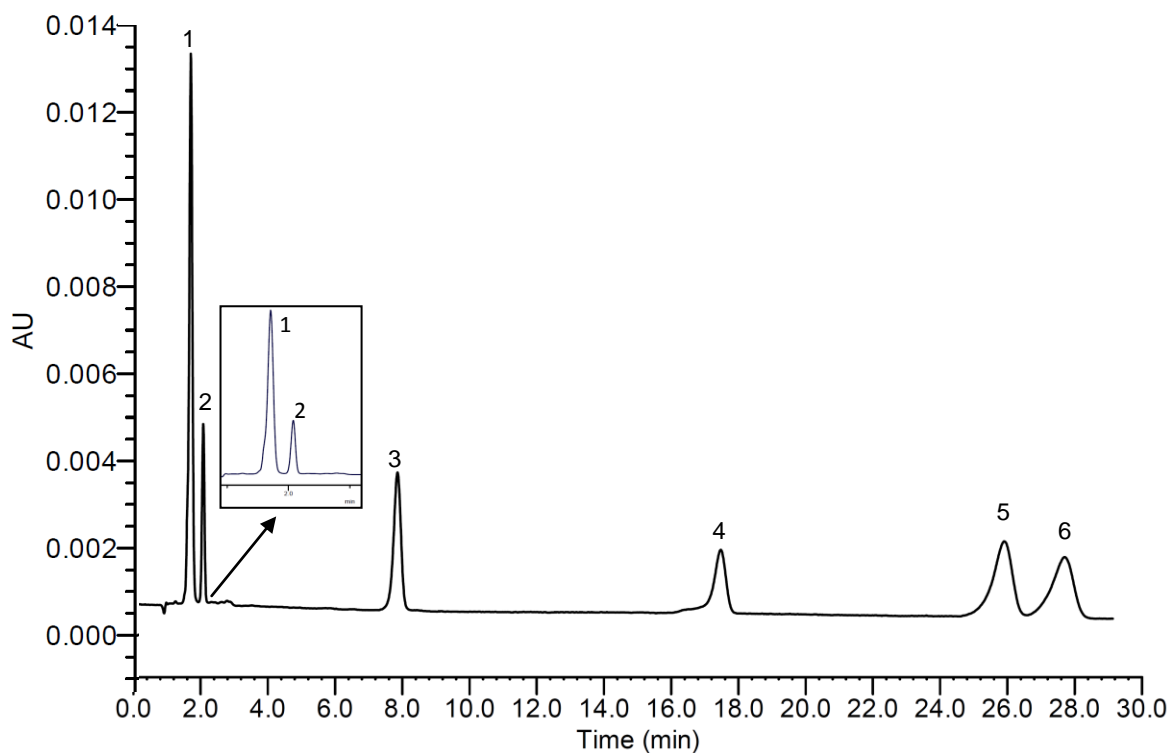
Os resultados da validação do método de doseamento do MAD no soro estão descritos na Tabela 15. Os LD e LQ obtidos foram confirmados experimentalmente. A gama de trabalho (0,3 - 3,3 µM) foi definida após a realização do estudo da linearidade pela aplicação de uma análise de regressão linear. A equação de regressão média do MAD foi  $y = 30900,00x - 1051,33$ . A média dos coeficientes de determinação das 3 rectas de calibração utilizadas foi de 0,997. A variação do declive entre as rectas de calibração foi inferior a 15%. A aplicação do teste da ANOVA de factor único confirmou a existência de homogeneidade de variâncias dentro da gama de trabalho. Os resultados da linearidade indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,05$ ) entre as várias rectas de calibração. A repetibilidade do método ( $n = 6$ ) variou de 0,53% ( $1,14 \pm 0,006 \mu\text{M}$ ) a 3,07% ( $1,08 \pm 0,033 \mu\text{M}$ ). A precisão intermédia ( $n = 18$ ) foi de 8,52% ( $1,05 \pm 0,089 \mu\text{M}$ ). A exactidão do método foi avaliada pela adição de padrão de MAD ( $n = 3$ ) nas concentrações de 0,8, 1,8 e 2,8 µM. Os resultados da recuperação variaram de 92,8% ( $1,67 \pm 0,119 \mu\text{M}$ ) a 103% ( $0,822 \pm 0,025 \mu\text{M}$ ).

#### 4.4.5. Doseamento das vitaminas A e E e carotenóides

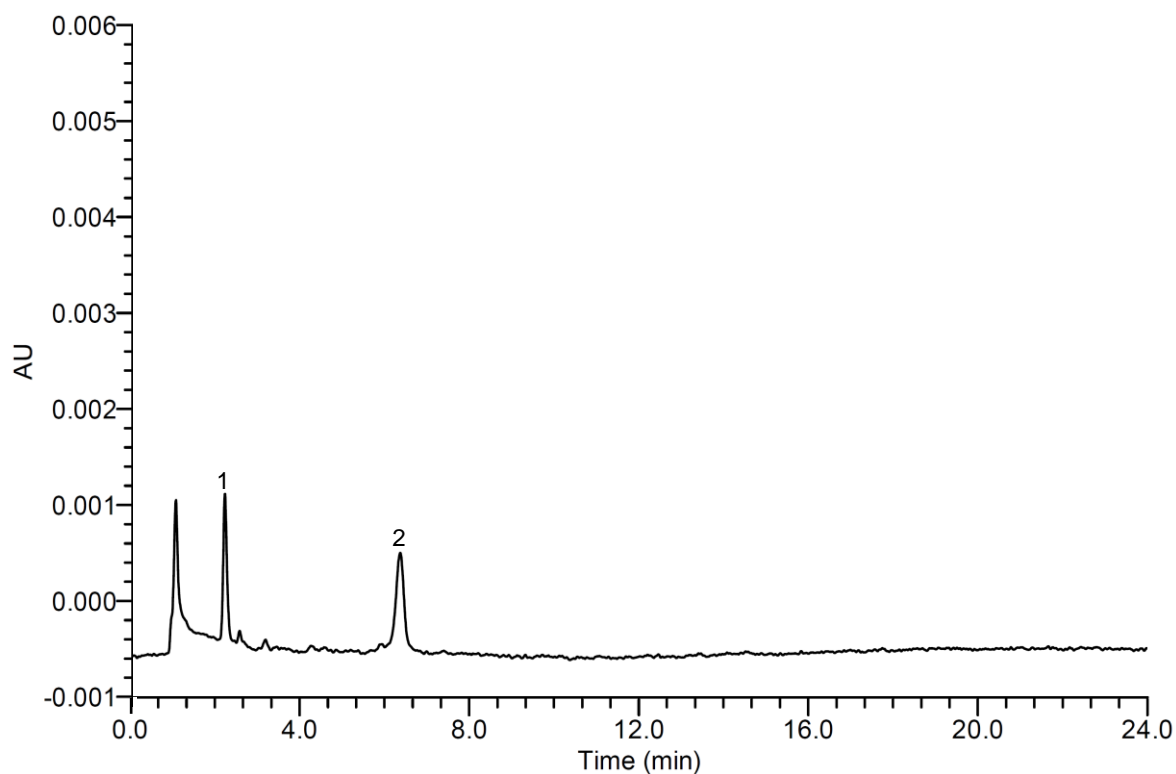
Durante a optimização do método foram testadas diversas condições de análise e cromatográficas. Os comprimentos de onda máximos de cada analito foram confirmados e estão descritos na Tabela 3. Das diferentes proporções entre os volumes de soro e etanol absoluto testadas, a proporção de 1:1 foi a que permitiu obter melhores resultados. Para garantir a eficácia da extracção foi suficiente um volume de 1 mL de n-hexano e uma única extracção. De todas as soluções de reconstituição testadas, a que permitiu obter melhores recuperações foi a solução de acetonitrilo/metanol/diclorometano/água ultrapura (64:18:12:6, v/v/v/v), sendo a solução 1 a que originou o pior desempenho. O sistema de colunas cromatográficas testado permitiu obter uma boa sensibilidade e resolução entre todos os analitos, mas o tempo de retenção dos carotenóides mais apolares (licopeno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno) foi elevado, sendo necessário um tempo de corrida de 45 min para cada injeção a um fluxo de 2 mL/min e com a fase móvel acetonitrilo/metanol/diclorometano/água ultrapura (64:18:12:6, v/v/v/v). No entanto, com a utilização da coluna analítica Supelcosil™ LC-18-DB foi possível obter uma sensibilidade e resolução idênticas às alcançadas com o sistema de duas colunas, especialmente entre os isómeros luteína e zeaxantina, mas o tempo de retenção do  $\beta$ -caroteno passou a ser 23 min e consequentemente o tempo de corrida necessário para uma injeção foi de 25 min. O tempo de corrida do método cromatográfico foi significativamente reduzido sem que o desempenho do mesmo ficasse comprometido. Deste modo, foi possível efectuar um maior número de análises num menor período de tempo, aumentando a

## Resultados

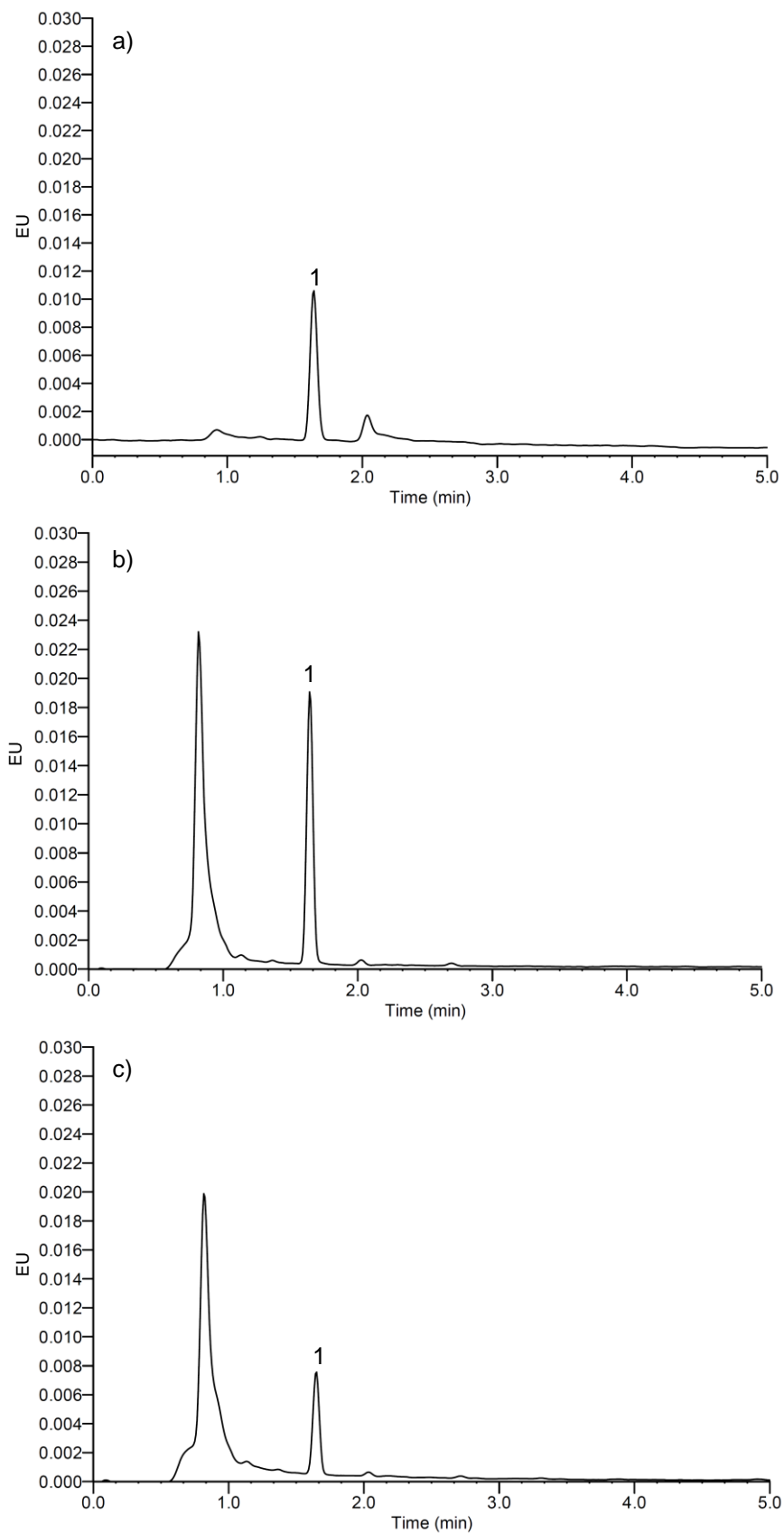
rentabilidade do método cromatográfico. As condições cromatográficas ótimas foram: a) volume de injeção: 50  $\mu$ L; b) fluxo: 2 mL/min; c) temperatura do injector automático: 6  $^{\circ}$ C; d) temperatura da coluna: 30  $^{\circ}$ C. A temperatura da coluna a 30  $^{\circ}$ C foi a que permitiu obter melhor resolução entre a luteína e zeaxantina e simultaneamente obter um tempo de corrida razoável. Com a temperatura de 37  $^{\circ}$ C, houve redução do tempo de retenção de todos os compostos, mas foi identificada degradação de alguns carotenóides e conseqüente redução das suas áreas. A Fig. 13 representa um cromatograma (obtido a 450 nm) de uma mistura padrão de carotenóides, onde é evidenciada a boa separação entre todos os carotenóides, especialmente entre os isómeros luteína e zeaxantina. Na Fig. 14 é apresentado o cromatograma (obtido a 450 nm) de uma amostra de soro de um participante diabético com a presença de luteína, zeaxantina e  $\beta$ -criptoxantina. Os tempos de retenção dos carotenóides foram os seguintes: luteína 2,1 min; zeaxantina 2,2 min e  $\beta$ -criptoxantina 7,0 min. Na Fig. 15, são apresentados os cromatogramas (obtidos a 325 nm) do padrão de retinol e de amostras de soro com retinol. O tempo de retenção do retinol foi de 1,6 min. Os cromatogramas característicos (obtidos a 292 nm) do padrão de  $\alpha$ -tocoferol e de amostras de soro contendo  $\alpha$ -tocoferol estão representados na Fig. 16. O tempo de retenção do  $\alpha$ -tocoferol foi de 6,7 min. Não foram observados interferentes nos cromatogramas das amostras, mesmo após uma corrida teste de 60 min. Todos os compostos foram identificados na amostra por comparação dos tempos de retenção obtidos no cromatograma da mistura padrão e por comparação com os espectros de absorção dos padrões respectivos.



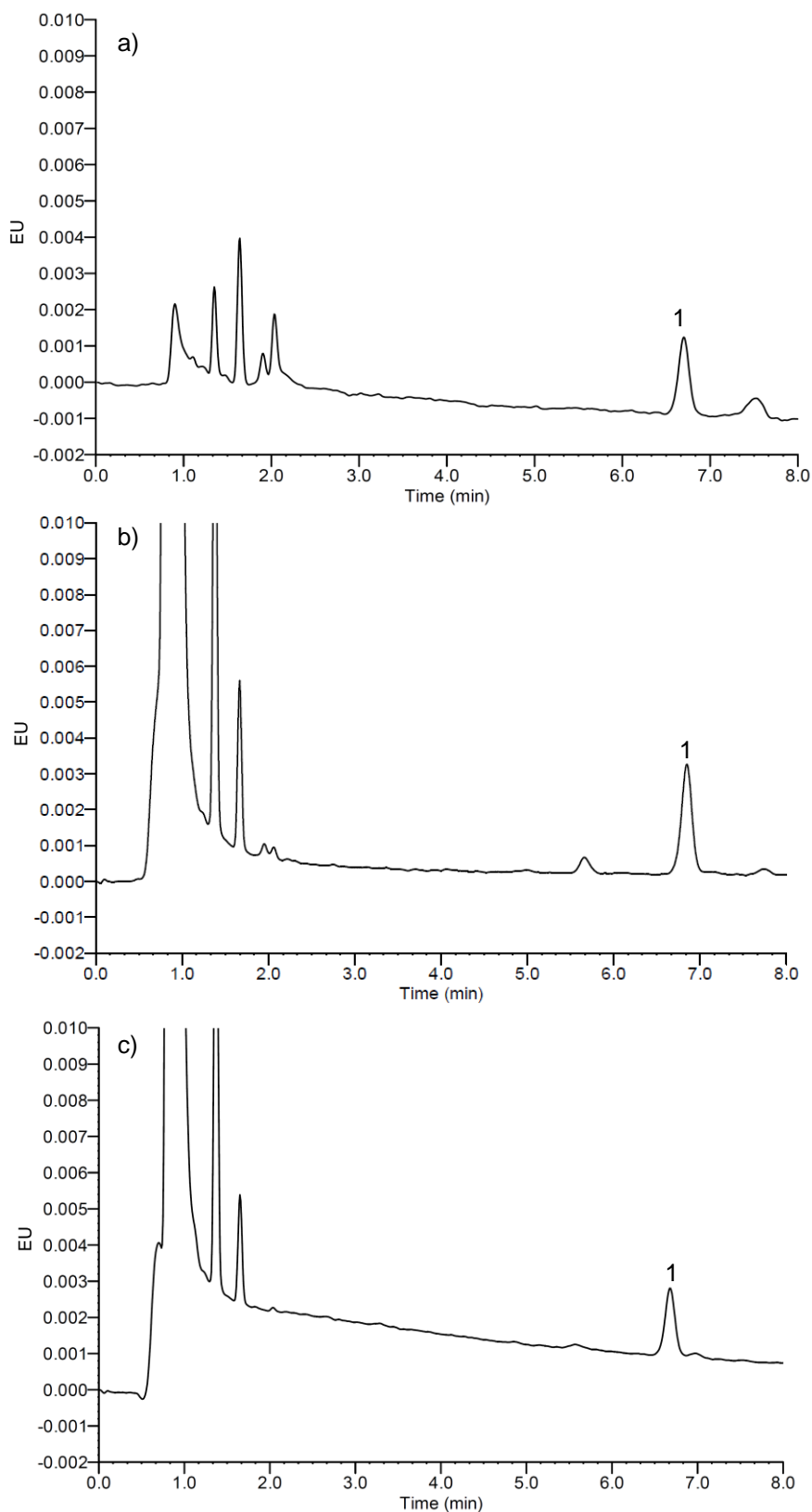
**Figura 13. Cromatograma de uma mistura padrão de carotenóides:** (1) 1,8  $\mu\text{M}$  de Luteína, (2) 0,8  $\mu\text{M}$  de Zeaxantina, (3) 1,8  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -Criptoxantina, (4) 1,8  $\mu\text{M}$  de Licopeno, (5) 0,8  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -Caroteno, (6) 1,8  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -Caroteno.



**Figura 14. Cromatograma de uma amostra de soro de diabético do tipo 2 obtido no método de doseamento de carotenóides:** (1) 0,474  $\mu\text{M}$  de luteína (2) 0,134  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -criptoxantina.



**Figura 15. Cromatogramas obtidos no método de doseamento de retinol:** a) solução padrão com (1) 1,00  $\mu\text{M}$  de retinol; b) amostra de soro de um controle com (1) 1,48  $\mu\text{M}$  de retinol; c) amostra de soro de um diabético com (1) 0,68  $\mu\text{M}$  de retinol.



**Figura 16. Cromatogramas obtidos no método de doseamento de  $\alpha$ -tocoferol:** a) solução padrão com (1) 5  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol; b) amostra de soro de um controlo com (1) 7,05  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol; c) amostra de soro de um diabético com (1) 4,30  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol.

## Resultados

Os resultados da validação do método de doseamento do retinol,  $\alpha$ -tocoferol e carotenóides no soro estão descritos na Tabela 15. Os LD e LQ obtidos foram confirmados experimentalmente. As gamas de trabalho foram definidas após a realização do estudo da linearidade pela aplicação de uma análise de regressão linear.

A equação de regressão média do retinol foi  $y = 47026,20x - 8241,1162$ , sendo a média dos coeficientes de determinação das 5 rectas de calibração de 0,9974. A variação do declive entre as rectas de calibração foi inferior a 15%. A aplicação do teste da ANOVA de factor único confirmou a existência de homogeneidade de variâncias dentro da gama de trabalho. Os resultados da linearidade indicaram que não existiam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre as várias rectas de calibração. A repetibilidade do método ( $n = 5$ ) variou de 3,97% ( $1,20 \pm 0,048 \mu\text{M}$ ) a 5,69% ( $1,25 \pm 0,071 \mu\text{M}$ ). A precisão intermédia ( $n = 15$ ) foi de 4,69% ( $1,23 \pm 0,058 \mu\text{M}$ ). A exactidão do método foi avaliada pela adição de padrão de retinol ( $n = 3$ ) nas concentrações de 1,0; 2,6 e 5,0  $\mu\text{M}$ . As recuperações obtidas variaram de 93,8% ( $0,938 \pm 0,041 \mu\text{M}$ ) a 98,1% ( $2,55 \pm 0,027 \mu\text{M}$ ).

Em relação ao  $\alpha$ -tocoferol obteve-se uma equação média de  $y = 3574,794x + 12511,85$  e um coeficiente de determinação médio ( $n = 5$ ) de 0,9956. O declive médio das 5 rectas de calibração variou dentro do limite máximo estabelecido ( $CV < 15\%$ ). Foi comprovada a homogeneidade de variâncias na gama de trabalho pela aplicação de uma ANOVA de factor único. A repetibilidade do método ( $n = 5$ ) variou de 2,33% ( $32,3 \pm 0,753 \mu\text{M}$ ) a 3,05% ( $32,4 \pm 0,988 \mu\text{M}$ ). A precisão intermédia ( $n = 15$ ) foi de 2,61% ( $32,5 \pm 0,848 \mu\text{M}$ ). A exactidão do método foi avaliada pela adição de padrão de  $\alpha$ -tocoferol ( $n = 3$ ) nas concentrações de 5, 35 e 80  $\mu\text{M}$ . Os resultados da recuperação variaram de 97,6% ( $4,88 \pm 0,067 \mu\text{M}$ ) a 98,3% ( $34,4 \pm 0,441 \mu\text{M}$ ).

Para a luteína a equação de regressão média foi  $y = 664901,0x - 94721,01$ , com um coeficiente de determinação médio ( $n = 5$ ) e uma variação do declive inferior a 15%. A homogeneidade de variâncias na gama de trabalho foi confirmada com uma análise de variância e uma significância de 95%. A repetibilidade do método ( $n = 5$ ) variou de 3,61% ( $0,743 \pm 0,027 \mu\text{M}$ ) a 5,20% ( $0,689 \pm 0,036 \mu\text{M}$ ). A precisão intermédia ( $n = 15$ ) foi de 5,44% ( $0,709 \pm 0,039 \mu\text{M}$ ). A exactidão do método foi avaliada pela adição de padrão de luteína ( $n = 3$ ) nas concentrações de 0,3; 0,9 e 1,8  $\mu\text{M}$ . A recuperação do método variou de 89,7% ( $0,269 \pm 0,024 \mu\text{M}$ ) a 92,4% ( $0,832 \pm 0,033 \mu\text{M}$ ).

A equação de regressão média da zeaxantina foi  $y = 196476,3x - 8712,249$ , sendo a média dos coeficientes de determinação das 5 rectas de calibração de 0,9953. A variação do declive entre as rectas de calibração foi inferior a 15%. A aplicação do teste da ANOVA de factor único confirmou a existência de homogeneidade de variâncias dentro da gama de trabalho. Os resultados da linearidade indicaram que não existiam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as 5 rectas de calibração. A repetibilidade do método ( $n = 5$ ) variou de 5,47% ( $0,033 \pm 0,002 \mu\text{M}$ ) a 7,27% ( $0,034 \pm 0,002 \mu\text{M}$ ). A precisão intermédia ( $n = 15$ ) foi de 6,98% ( $0,034 \pm 0,002$

$\mu\text{M}$ ). A exactidão do método foi avaliada pela adição de padrão de zeaxantina ( $n = 3$ ) nas concentrações de 0,03; 0,09 e 0,18  $\mu\text{M}$ . Os resultados obtidos variaram de 86,7% ( $0,026 \pm 0,003 \mu\text{M}$ ) a 92,2% ( $0,083 \pm 0,003 \mu\text{M}$ ).

A equação de regressão média da  $\beta$ -criptoxantina foi  $y = 127421,1x + 1979,232$  e um coeficiente de determinação médio ( $n = 5$ ) de 0,9993. Os resultados da linearidade indicaram que não existiam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre as 5 rectas de calibração. A repetibilidade do método ( $n = 5$ ) variou de 6,36% ( $0,379 \pm 0,024 \mu\text{M}$ ) a 8,62% ( $0,402 \pm 0,035 \mu\text{M}$ ). A precisão intermédia ( $n = 15$ ) foi de 8,61% ( $0,380 \pm 0,033 \mu\text{M}$ ). A exactidão do método foi avaliada pela adição de padrão de  $\beta$ -criptoxantina ( $n = 3$ ) nas concentrações de 0,10; 0,78 e 1,80  $\mu\text{M}$ . Os resultados da recuperação variaram de 91,0% ( $0,091 \pm 0,002 \mu\text{M}$ ) a 95,7% ( $0,708 \pm 0,025 \mu\text{M}$ ).

Para o licopeno foi obtida a seguinte recta de calibração média:  $y = 48741,10x - 17371,29$  e um coeficiente de determinação médio de 0,9951. A linearidade da gama de trabalho foi comprovada pela aplicação de uma ANOVA de factor único e para uma significância de 95%. A repetibilidade do método ( $n = 5$ ) variou de 7,10% ( $0,391 \pm 0,028 \mu\text{M}$ ) a 8,38% ( $0,406 \pm 0,034 \mu\text{M}$ ). A precisão intermédia ( $n = 15$ ) foi de 7,69% ( $0,403 \pm 0,031 \mu\text{M}$ ). A exactidão do método foi avaliada pela adição de padrão de licopeno ( $n = 3$ ) nas concentrações de 0,3; 0,9 e 1,8  $\mu\text{M}$ . Os resultados da recuperação variaram de 86,0% ( $0,258 \pm 0,011 \mu\text{M}$ ) a 94,4% ( $0,850 \pm 0,029 \mu\text{M}$ ).

Em relação ao  $\alpha$ -caroteno, o valor médio de cinco rectas de calibração permitiu obter a equação de recta  $y = 131269,1x - 5889,794$ , bem como, o respectivo coeficiente de determinação médio (0,9965). A variação do declive entre as rectas de calibração foi aceitável (<15%). A homogeneidade de variâncias comprovada para a gama de trabalho indicou que não existiam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as 5 rectas de calibração. A repetibilidade do método ( $n = 5$ ) variou de 6,01% ( $0,054 \pm 0,003 \mu\text{M}$ ) a 7,38% ( $0,047 \pm 0,003 \mu\text{M}$ ). A precisão intermédia ( $n = 15$ ) foi de 10,8% ( $0,053 \pm 0,006 \mu\text{M}$ ). A exactidão do método foi avaliada pela adição de padrão de  $\alpha$ -caroteno ( $n = 3$ ) nas concentrações de 0,03; 0,09 e 0,18  $\mu\text{M}$ . A recuperação variou de 90,0% ( $0,027 \pm 0,001 \mu\text{M}$ ) a 93,3% ( $0,084 \pm 0,002 \mu\text{M}$ ).

A equação de regressão média do  $\beta$ -caroteno foi  $y = 77546,06x + 1530,279$  e a média dos coeficientes de determinação das 5 rectas de calibração foi 0,9971. O declive variou de forma aceitável entre as rectas. A homogeneidade de variâncias foi comprovada para a gama de trabalho. A repetibilidade do método ( $n = 5$ ) variou de 7,48% ( $0,458 \pm 0,034 \mu\text{M}$ ) a 9,23% ( $0,435 \pm 0,040 \mu\text{M}$ ). A precisão intermédia ( $n = 15$ ) foi de 7,80% ( $0,448 \pm 0,035 \mu\text{M}$ ). A exactidão do método foi avaliada pela adição de padrão de  $\beta$ -caroteno ( $n = 3$ ) nas concentrações de 0,3; 0,9 e 1,8  $\mu\text{M}$ . Os resultados da recuperação do método variaram de 91,3% ( $0,274 \pm 0,015 \mu\text{M}$ ) a 96,4% ( $0,868 \pm 0,013 \mu\text{M}$ ).

Tabela 15. Parâmetros de validação dos métodos cromatográficos.

Analito	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO								
	LD	LQ	Gama de trabalho	Linearidade	Precisão		Exactidão		
					Repetibilidade média ± DP (CV%)	Precisão Intermédia média ± DP (CV%)	Adição de Padrão	Concentração média ± DP	Recuperação (%)
Hcy (µM)	0,046	0,152	1 - 60	$r^2 = 0,9980$ (n = 5)	Dia 1 (n = 6): 8,02 ± 0,178 (2,22) Dia 2 (n = 6): 8,81 ± 0,357 (4,06) Dia 3 (n = 6): 8,38 ± 0,179 (2,14)	8,18 ± 0,350 (4,27) (n = 18)	10 (n = 5) 30 (n = 5) 60 (n = 5)	9,36 ± 0,838 27,6 ± 2,15 57,1 ± 1,35	93,6 92,0 95,2
Cys (µM)	0,240	0,800	150 - 300	$r^2 = 0,9928$ (n = 5)	Dia 1 (n = 6): 255 ± 6,79 (2,66) Dia 2 (n = 6): 265 ± 6,22 (2,35) Dia 3 (n = 6): 241 ± 5,94 (2,46)	255 ± 7,84 (3,07) (n = 18)	175 (n = 5) 250 (n = 5) 300 (n = 5)	160 ± 1,59 231 ± 0,773 270 ± 6,10	91,4 92,8 90,0
MAD (µM)	0,016	0,050	0,3 - 3,3	$r^2 = 0,9969$ (n = 3)	Dia 1 (n = 6): 0,938 ± 0,011 (1,19) Dia 2 (n = 6): 1,14 ± 0,006 (0,527) Dia 3 (n = 6): 1,08 ± 0,033 (3,07)	1,05 ± 0,089 (8,52) (n = 18)	0,8 (n = 3) 1,8 (n = 3) 2,8 (n = 3)	0,822 ± 0,025 1,67 ± 0,119 2,64 ± 2,30	103 92,8 94,3
Luteína (µM)	0,090	0,260	0,3 - 1,8	$r^2 = 0,9978$ (n = 5)	Dia 1 (n = 5): 0,743 ± 0,027 (3,61) Dia 2 (n = 5): 0,696 ± 0,032 (4,59) Dia 3 (n = 5): 0,689 ± 0,036 (5,20)	0,709 ± 0,039 (5,44) (n = 15)	0,3 (n = 3) 0,9 (n = 3) 1,8 (n = 3)	0,269 ± 0,024 0,832 ± 0,033 1,64 ± 0,039	89,7 92,4 91,1
Zeaxantina (µM)	0,009	0,028	0,03 - 0,18	$r^2 = 0,9953$ (n = 5)	Dia 1 (n = 5): 0,036 ± 0,002 (6,79) Dia 2 (n = 5): 0,033 ± 0,002 (5,47) Dia 3 (n = 5): 0,034 ± 0,002 (7,27)	0,034 ± 0,002 (6,98) (n = 15)	0,03 (n = 3) 0,09 (n = 3) 0,18 (n = 3)	0,026 ± 0,003 0,083 ± 0,003 0,164 ± 0,003	86,7 92,2 91,1
β-criptoxantina (µM)	0,005	0,015	0,1 - 1,8	$r^2 = 0,9993$ (n = 5)	Dia 1 (n = 5): 0,402 ± 0,035 (8,62) Dia 2 (n = 5): 0,379 ± 0,024 (6,36) Dia 3 (n = 5): 0,360 ± 0,029 (8,20)	0,380 ± 0,033 (8,61) (n = 15)	0,10 (n = 3) 0,74 (n = 3) 1,80 (n = 3)	0,091 ± 0,002 0,708 ± 0,025 1,70 ± 0,016	91,0 95,7 94,4
Licopeno (µM)	0,11	0,32	0,3 - 1,8	$r^2 = 0,9951$ (n = 5)	Dia 1 (n = 5): 0,413 ± 0,034 (8,12) Dia 2 (n = 5): 0,406 ± 0,034 (8,38) Dia 3 (n = 5): 0,391 ± 0,028 (7,10)	0,403 ± 0,031 (7,69) (n = 15)	0,3 (n = 3) 0,9 (n = 3) 1,8 (n = 3)	0,258 ± 0,011 0,850 ± 0,029 1,66 ± 0,047	86,0 94,4 92,2
α-caroteno (µM)	0,01	0,03	0,03 - 0,18	$r^2 = 0,9965$ (n = 5)	Dia 1 (n = 5): 0,054 ± 0,003 (6,01) Dia 2 (n = 5): 0,058 ± 0,004 (6,12) Dia 3 (n = 5): 0,047 ± 0,003 (7,38)	0,053 ± 0,006 (10,8) (n = 15)	0,03 (n = 3) 0,09 (n = 3) 0,18 (n = 3)	0,027 ± 0,001 0,084 ± 0,002 0,165 ± 0,004	90,0 93,3 91,7
β-caroteno (µM)	0,100	0,303	0,3 - 1,8	$r^2 = 0,9971$ (n = 5)	Dia 1 (n = 5): 0,458 ± 0,034 (7,48) Dia 2 (n = 5): 0,450 ± 0,034 (7,58) Dia 3 (n = 5): 0,435 ± 0,040 (9,23)	0,448 ± 0,035 (7,80) (n = 15)	0,3 (n = 3) 0,9 (n = 3) 1,8 (n = 3)	0,274 ± 0,015 0,868 ± 0,013 1,69 ± 0,037	91,3 96,4 93,9

**Tabela 15.** Parâmetros de validação dos métodos cromatográficos (continuação).

Analito	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO								
	LD	LQ	Gama de trabalho	Linearidade	Precisão		Exactidão		
					Repetibilidade média ± DP (CV%)	Precisão Intermédia média ± DP (CV%)	Adição de Padrão	Concentração média ± DP	Recuperação (%)
Retinol (µM)	0,251	0,760	1 - 5 µM	$r^2 = 0,9974$ (n = 5)	Dia 1 (n = 5): 1,25 ± 0,071 (5,69) Dia 2 (n = 5): 1,24 ± 0,060 (4,82) Dia 3 (n = 5): 1,20 ± 0,048 (3,97)	1,23 ± 0,058 (4,69) (n = 15)	1,0 (n = 3) 2,6 (n = 3) 5,0 (n = 3)	0,938 ± 0,041 2,55 ± 0,027 4,84 ± 0,079	93,8 98,1 96,8
AA (µg/mL)	0,035	0,090	1 - 30	$r^2 = 0,9997$ (n = 6)	Dia 1 (n = 6): 13,5 ± 0,401 (2,97) Dia 2 (n = 6): 13,8 ± 0,548 (3,98) Dia 3 (n = 6): 13,7 ± 0,281 (2,05)	13,7 ± 0,412 (3,01) (n = 18)	5,0 (n = 6) 15 (n = 6) 25 (n = 6)	4,55 ± 0,275 14,1 ± 0,853 24,7 ± 0,963	91,0 94,0 98,8
α-tocoferol (µM)	0,613	1,86	5 - 80	$r^2 = 0,9956$ (n = 5)	Dia 1 (n = 5): 32,8 ± 0,907 (2,77) Dia 2 (n = 5): 32,4 ± 0,988 (3,05) Dia 3 (n = 5): 32,3 ± 0,753 (2,33)	32,5 ± 0,848 (2,61) (n = 15)	5,0 (n = 3) 35 (n = 3) 80 (n = 3)	4,88 ± 0,067 34,4 ± 0,441 78,3 ± 0,666	97,6 98,3 97,9
PLF (nM)	2,59	7,84	10 - 210	$r^2 = 0,9993$ (n = 5)	Dia 1 (n = 5): 55,4 ± 1,19 (2,15) Dia 2 (n = 5): 54,3 ± 1,32 (2,43) Dia 3 (n = 5): 52,6 ± 1,72 (3,28)	55,1 ± 2,26 (4,10) (n = 15)	10 (n = 5) 130 (n = 5) 210 (n = 5)	9,14 ± 0,658 129 ± 0,661 205 ± 1,63	91,4 99,2 97,6

Hcy, homocisteína; Cys, cisteína; MAD, malondialdeído; AA, ácido ascórbico; PLF, piridoxal-5-fosfato; DP, desvio padrão; LD, limite de detecção; LQ, limite de quantificação;  $r^2$ , coeficiente de determinação.

#### 4.4.6. Doseamento da vitamina B<sub>12</sub>

Para o doseamento de vitamina B<sub>12</sub> foi utilizado um método de ECL, tecnologia utilizada na execução dos imunoensaios que proporciona uma elevada sensibilidade analítica. O referido método foi previamente validado pela empresa Roche® que comercializa os *kits* do teste *Elecsys B<sub>12</sub>* para o aparelho Cobas e411. O LD do método é 22 pM ou 30 pg/mL. A gama de trabalho foi de 30 a 2000 pg/mL, sendo os valores médios esperados de 357 pg/mL com um intervalo de confiança de 95% (191 - 663 pg/mL). A repetibilidade do método em soro humano varia de 3,0 - 8,7% e a precisão intermédia é de 9,5%.

#### 4.4.7. Doseamento do ácido fólico

Para o doseamento de ácido fólico no soro foi também aplicado o método de ECL utilizando o equipamento Cobas e411 da Roche®. Este método foi previamente validado pela empresa Roche® que comercializa os *kits* do ácido fólico para o aparelho Cobas e411. O LD do método é 1,45 nM ou 0,640 ng/mL. A gama de trabalho é de 0,640 ng/mL a 10,0 ng/mL, sendo os valores médios esperados de 9,57 ng/mL com um intervalo de confiança de 95% (4,6 - 18,7 ng/mL). A repetibilidade do método em soro humano varia de 3,0 - 7,0% e a precisão intermédia é de 13,3%.

#### 4.5. Avaliação das concentrações dos compostos bioquímicos em estudo

Os valores médios das concentrações plasmáticas ou séricas dos compostos bioquímicos avaliados na população estudada estão descritos na Tabela 16. Para todos os compostos foram apresentados valores médios ajustados e não ajustados. Os valores médios dos parâmetros bioquímicos foram ajustados para as variáveis idade, género, IMC e ingestão diária de energia (modelo 1). Os modelos numerados de 2 a 10 foram aplicados às médias dos parâmetros bioquímicos avaliados com o objectivo de realizar ajustamentos adicionais para variáveis de confundimento específicas de cada parâmetro. Cada um desses modelos inclui as variáveis do modelo 1 e pelo menos mais uma variável que poderá afectar a concentração média dos compostos bioquímicos.

Os valores médios não ajustados da Hcy foram significativamente superiores nos diabéticos (grupo I: 10,6 µM vs. grupo II: 9,4 µM) comparativamente com o grupo controlo (grupo III: 4,10 µM). Após a aplicação dos modelos de ajustamento 1 e 2, observou-se que apenas as variáveis consideradas no modelo 1 podem ser consideradas factores de confusão para as concentrações plasmáticas de Hcy. O modelo 2 não alterou as médias ajustadas obtidas no modelo 1 para cada grupo. No entanto, o ajuste obtido pelo modelo 1 foi estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ). Em relação à concentração média da Cys verificou-se a presença de diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos (grupo I: 247 µM vs. grupo II: 229 µM vs. grupo III: 93,6 µM). Ambos os modelos de ajuste aplicados alteraram significativamente as médias, no entanto, as diferenças estatísticas entre os grupos mantiveram-se. Em todos os

participantes a presença de um elevado grau de *stress* oxidante foi evidente, com todos os grupos a apresentarem níveis médios de MAD superiores a 2  $\mu\text{M}$ . Para este composto foram observadas diferenças estatísticas entre as médias não ajustadas dos três grupos, sendo o grupo I o que apresentou o valor médio mais elevado e o grupo III o menor. Com a aplicação do modelo 1 os valores médios dos grupos I e II diminuíram e o do grupo III aumentou, no entanto as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos mantiveram-se. A significância do modelo 1 aplicado foi confirmada ( $p < 0,001$ ). O modelo 3 não alterou as médias ajustadas obtidas pela aplicação do modelo 1, o que significa que, a ingestão de gordura não afectou as concentrações séricas de MAD nos grupos estudados.

A concentração média não ajustada de retinol foi estatisticamente superior no grupo I (4,76  $\mu\text{M}$ ) em relação aos outros dois grupos (grupo II: 4,08  $\mu\text{M}$  vs. grupo III: 4,28  $\mu\text{M}$ ). Com a aplicação do modelo 1 foi obtido um ajuste significativo ( $p < 0,001$ ) dos valores médios dos grupos, sendo que, as concentrações médias de retinol diminuíram nos grupos I e II e aumentaram no grupo III. Verificou-se também, que os valores médios de retinol ajustados passaram a ser estatisticamente diferentes apenas entre os grupos I e II. O modelo 4 permitiu obter um ajustamento das médias muito semelhante ao modelo 1, no entanto o efeito da variável ingestão diária de gordura total foi significativo ( $p = 0,02$ ) permitindo melhorar o ajustamento. Os valores médios de  $\alpha$ -tocoferol foram significativamente diferentes entre o grupo III (22,2  $\mu\text{M}$ ) e os grupos I e II (grupo I: 29,4  $\mu\text{M}$  vs. 31,1  $\mu\text{M}$ ). Com a aplicação dos modelos 1 e 5, as diferenças estatísticas entre as médias ajustadas dos três grupos mantiveram-se, no entanto, o ajuste obtido com a aplicação do modelo 5 não melhorou o ajuste significativo obtido com o modelo 1.

A concentração média não ajustada de luteína foi significativamente superior no grupo III (0,790  $\mu\text{M}$ ) em comparação com os grupos I (0,713  $\mu\text{M}$ ) e II (0,720  $\mu\text{M}$ ). Após a aplicação do modelo 1 verificou-se que essas diferenças se mantiveram e que o ajuste foi significativo ( $p < 0,001$ ). A aplicação do modelo 6 praticamente não alterou o ajuste obtido com o modelo 1, o que indica que as variáveis ingestão diária de gordura e de carotenóides não são factores de confusão para os níveis séricos de luteína.

A média não ajustada dos níveis séricos de  $\beta$ -criptoxantina no grupo III foi cerca de 3 vezes superior aos valores médios obtidos nos grupos I e II. Com a aplicação dos modelos 1 e 6, as diferenças estatísticas entre a média ajustada do grupo III e as dos grupos I e II mantiveram-se, no entanto, o ajuste obtido pela aplicação do modelo 6 não melhorou o ajuste significativo ( $p < 0,001$ ) obtido com o modelo 1.

A concentração média plasmática não ajustada de AA foi significativamente superior no grupo III (5,61  $\mu\text{M}$ ) em relação aos outros dois grupos (grupo I: 3,84  $\mu\text{M}$  vs. grupo II: 4,04  $\mu\text{M}$ ). Após a aplicação do modelo 1 com um ajuste significativo das médias, continuaram a verificar-se essas diferenças estatísticas. O modelo 7 permitiu obter médias ajustadas semelhantes às obtidas pelo modelo 1, no entanto a variável ingestão diária de vitamina C contribui para uma

## Resultados

pequena alteração no valor da média ajustada de cada grupo. O seu contributo isolado para o modelo 7 teve uma significância ( $p = 0,051$ ) superior mas próxima do valor considerado significativo para o ajuste ( $p < 0,050$ ).

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios não ajustados de vitamina B<sub>6</sub> entre os três grupos. Após a aplicação do modelo 1, as médias ajustadas obtidas para os grupos I e II foram superiores às não ajustadas e a obtida para o grupo III foi inferior à não ajustada. O mesmo se verificou após a aplicação do modelo 8. No entanto nenhum dos modelos utilizados permitiu obter um ajuste significativo dos valores médios plasmáticos de vitamina B<sub>6</sub> nos três grupos.

As concentrações médias não ajustadas de ácido fólico não foram significativamente diferentes entre os três grupos. No entanto, após o ajustamento efectuado com a aplicação do modelo 1, verificou-se que, a concentração média ajustada de ácido fólico no grupo I (10,7 ng/mL) era significativamente superior à obtida no grupo III (9,32 ng/mL). Este modelo permitiu obter um ajuste significativo ( $p = 0,001$ ) dos valores médios de ácido fólico nos três grupos. O ajuste obtido com aplicação do modelo 9 não foi significativo ( $p = 0,059$ ).

Para a vitamina B<sub>12</sub> sérica, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios não ajustados obtidos nos três grupos. Com a aplicação do modelo 1 foi possível obter um ajuste significativo ( $p = 0,036$ ) das médias da vitamina B<sub>12</sub>, passando a verificar-se a existência de diferenças significativas entre o grupo I (623 pg/mL) e os outros dois grupos (grupo II: 531 pg/mL vs. grupo III: 536 pg/mL). A aplicação do modelo 10 permitiu obter um ajuste mais significativo ( $p = 0,020$ ) do que o obtido com o modelo 1.

**Tabela 16.** Concentração dos compostos bioquímicos no sangue da população estudada.

Parâmetros	Grupo I (n = 75)	Grupo II (n = 75)	Grupo III (n = 143)	p
Hcy (µM)	10,6 <sup>a</sup> (9,53-11,7)	9,40 <sup>a</sup> (8,36-10,4)	4,10 <sup>b</sup> (3,75-4,46)	<0,01*
Modelo 1	10,4 <sup>a</sup> (9,50-11,2)	9,32 <sup>a</sup> (8,51-10,1)	4,28 <sup>b</sup> (3,66-4,90)	<0,001*
Modelo 2	10,4 <sup>a</sup> (9,51-11,2)	9,32 <sup>a</sup> (8,50-10,1)	4,28 <sup>b</sup> (3,64-4,91)	<0,001*
Cys (µM)	247 <sup>a</sup> (234-260)	229 <sup>b</sup> (218-240)	93,6 <sup>c</sup> (89,9-97,1)	0,025*
Modelo 1	242 <sup>a</sup> (234-251)	228 <sup>b</sup> (219-237)	96,6 <sup>c</sup> (90,0-103)	<0,001*
Modelo 2	241 <sup>a</sup> (232-250)	227 <sup>b</sup> (218-236)	97,7 <sup>c</sup> (91,1-104)	<0,001*
MAD (µM)	2,87 <sup>a</sup> (2,70-3,05)	2,56 <sup>b</sup> (2,39-2,72)	2,16 <sup>c</sup> (2,06-2,26)	<0,05*
Modelo 1	2,70 <sup>a</sup> (2,56-2,84)	2,49 <sup>b</sup> (2,35-2,63)	2,29 <sup>c</sup> (2,19-2,39)	<0,001*
Modelo 3	2,70 <sup>a</sup> (2,56-2,84)	2,49 <sup>b</sup> (2,35-2,63)	2,29 <sup>c</sup> (2,18-2,39)	<0,001*
Vitamina A: retinol (µM)	4,76 <sup>a</sup> (4,32-5,20)	4,08 <sup>b</sup> (3,82-4,35)	4,28 <sup>b</sup> (4,11-4,44)	0,005*
Modelo 1	4,63 <sup>a</sup> (4,32-4,94)	4,00 <sup>b</sup> (3,71-4,31)	4,38 <sup>a,b</sup> (4,15-4,61)	<0,001*
Modelo 4	4,61 <sup>a</sup> (4,30-4,93)	4,00 <sup>b</sup> (3,70-4,30)	4,40 <sup>a,b</sup> (4,17-4,62)	<0,001*
Vitamina E: α-tocoferol (µM)	29,4 <sup>a</sup> (27,6-31,3)	31,1 <sup>a</sup> (29,1-33,1)	22,2 <sup>b</sup> (20,8-23,5)	<0,01*
Modelo 1	29,3 <sup>a</sup> (27,3-31,3)	30,9 <sup>a</sup> (29,0-32,8)	22,4 <sup>b</sup> (20,9-23,8)	<0,001*
Modelo 5	29,3 <sup>a</sup> (27,4-31,3)	30,8 <sup>a</sup> (29,0-32,8)	22,3 <sup>b</sup> (20,9-23,8)	<0,001*
Luteína (µM)	0,713 <sup>a</sup> (0,702-0,724)	0,720 <sup>a</sup> (0,710-0,731)	0,790 <sup>b</sup> (0,76-0,803)	<0,01*
Modelo 1	0,721 <sup>a</sup> (0,705-0,737)	0,724 <sup>a</sup> (0,709-0,740)	0,784 <sup>b</sup> (0,772-0,796)	<0,001*
Modelo 6	0,721 <sup>a</sup> (0,705-0,737)	0,725 <sup>a</sup> (0,709-0,740)	0,784 <sup>b</sup> (0,772-0,795)	<0,001*
β-criptoxantina (µM)	0,152 <sup>a</sup> (0,119-0,185)	0,141 <sup>a</sup> (0,106-0,177)	0,397 <sup>b</sup> (0,325-0,468)	<0,01*
Modelo 1	0,171 <sup>a</sup> (0,088-0,254)	0,153 <sup>a</sup> (0,071-0,236)	0,382 <sup>b</sup> (0,324-0,441)	<0,001*
Modelo 6	0,171 <sup>a</sup> (0,087-0,255)	0,154 <sup>a</sup> (0,070-0,238)	0,382 <sup>b</sup> (0,323-0,440)	<0,001*
Vitamina C: AA (µg/mL)	3,84 <sup>a</sup> (3,44-4,23)	4,04 <sup>a</sup> (3,70-4,38)	5,61 <sup>b</sup> (5,28-5,95)	<0,01*
Modelo 1	4,01 <sup>a</sup> (3,59-4,44)	4,16 <sup>a</sup> (3,76-4,56)	5,54 <sup>b</sup> (5,14-5,77)	<0,001*
Modelo 7	4,00 <sup>a</sup> (3,58-4,42)	4,13 <sup>a</sup> (3,73-4,53)	5,48 <sup>b</sup> (5,17-5,79)	<0,001*
Vitamina B <sub>6</sub> : PLF (nM)	41,4 <sup>a</sup> (36,3-46,5)	51,5 <sup>a</sup> (39,0-63,3)	53,4 <sup>a</sup> (44,9-61,9)	0,177
Modelo 1	42,2 <sup>a</sup> (31,2-53,3)	52,1 <sup>a</sup> (41,6-62,7)	52,4 <sup>a</sup> (44,1-60,7)	0,437
Modelo 8	42,3 <sup>a</sup> (31,1-53,4)	53,5 <sup>a</sup> (42,8-64,2)	51,6 <sup>a</sup> (43,2-60,1)	0,343
Ácido fólico (ng/mL)	10,4 <sup>a</sup> (9,62-11,1)	10,3 <sup>a</sup> (9,60-11,1)	9,56 <sup>a</sup> (8,99-10,2)	0,147
Modelo 1	10,7 <sup>a</sup> (9,87-11,5)	10,5 <sup>a,b</sup> (9,75-11,3)	9,32 <sup>b</sup> (8,72-9,91)	0,001**
Modelo 9	10,8 <sup>a</sup> (9,97-11,6)	10,6 <sup>a</sup> (9,84-11,4)	9,21 <sup>b</sup> (8,60-9,81)	0,059
Vitamina B <sub>12</sub> (pg/mL)	616 <sup>a</sup> (548-683)	531 <sup>a</sup> (481-582)	540 <sup>a</sup> (501-578)	0,057
Modelo 1	623 <sup>a</sup> (563-682)	531 <sup>b</sup> (474-587)	536 <sup>b</sup> (493-580)	0,036**
Modelo 10	620 <sup>a</sup> (560-680)	529 <sup>b</sup> (471-586)	539 <sup>b</sup> (495-583)	0,020**

**Os resultados estão expressos como médias ajustadas (Intervalo de confiança a 95%).** As médias na mesma linha assinaladas com letras diferentes (a, b, c) são estatisticamente diferentes de acordo com o teste post hoc de Bonferroni \*(p <0,05 ou p <0,01). Os vários modelos descritos resultam da aplicação de uma análise de covariância para avaliar a presença de possíveis variáveis de confundimento. Para cada modelo são apresentadas as médias ajustadas (e respectivo intervalo de confiança a 95%) para o efeito de outras covariáveis. O modelo 1 foi ajustado para idade, género, índice de massa corporal e ingestão diária de energia; o modelo 2 foi adicionalmente ajustado para a ingestão diária de proteína e de metionina; o modelo 3 foi ajustado para as variáveis do modelo 1 e adicionalmente ajustado para a ingestão diária de gordura total; modelo 4 foi ajustado para a variáveis do modelo 1 e adicionalmente ajustado para a ingestão diária de gordura total e de retinol; o modelo 5 foi ajustado para a variáveis do modelo 1 e adicionalmente ajustado para a ingestão diária de gordura total e de α-tocoferol; o modelo 6 foi ajustado para as variáveis do modelo 1 e adicionalmente ajustado para a ingestão diária de gordura total e de carotenóides; o modelo 7 foi ajustado para as variáveis do modelo 1 e adicionalmente ajustado para ingestão de vitamina C; o modelo 8 foi ajustado para as variáveis do modelo 1 e adicionalmente ajustado para a ingestão diária de metionina, vitamina B<sub>6</sub> e ácido fólico; o modelo 9 foi ajustado para as variáveis do modelo 1 e adicionalmente ajustado para a ingestão diária de metionina e de ácido fólico; o modelo 10 foi ajustado para as variáveis do modelo 9 e adicionalmente para a ingestão diária de vitamina B<sub>12</sub>. Hcy, homocisteína; Cys, cisteína; MAD, malondialdeído; AA, ácido ascórbico; PLF, piridoxal-5-fosfato.

\*\*Significância estatística do modelo corrigido (p <0,05).

## Resultados

A avaliação clínica dos níveis plasmáticos ou séricos dos parâmetros bioquímicos em estudo está descrita na Tabela 17. Para cada parâmetro bioquímico foi estabelecido um valor sanguíneo de referência (VSR), sendo este definido com base em bibliografia científica. O referido VSR foi utilizado para avaliar o número e percentagem de participantes com níveis sanguíneos inadequados em cada grupo. Para a  $\beta$ -criptoxantina não foi definido nenhum VSR porque não foi ainda estabelecido ou recomendado qualquer valor de referência para este parâmetro. Foi avaliada a prevalência de hiperhomocisteinémia e hipercisteinémia, bem como, o nível de *stress* oxidante e o défice bioquímico de vitaminas. As percentagens obtidas foram comparadas entre os três grupos. A prevalência de hiperhomocisteinémia foi de 20% no grupo I, 8,7% no grupo II e de apenas 0,71% no grupo III. Isto significa que a prevalência de hiperhomocisteinémia é significativamente mais elevada nos dois grupos de diabéticos (I e II), do que no grupo de não diabéticos (III) e que a frequência da elevação dos níveis de Hcy no grupo I é mais de duas vezes superior à frequência do grupo II. Em relação a hipercisteinémia, a maior prevalência foi obtida para o grupo I (17%), tendo sido cerca de duas vezes superior à do grupo II (8%). No grupo III não foi registado nenhum indivíduo que tivesse os níveis de Cys elevados. A percentagem de indivíduos com a concentração sérica de MAD acima do VSR foi elevada para todos os grupos, sendo que, para os grupos I (95%) e II (93%) foi significativamente superior ao valor obtido para o grupo III (77%). Nenhum dos participantes no estudo apresentou deficiência sérica em vitamina A ou em ácido fólico e apenas para 6 participantes foram encontrados valores séricos de vitaminas B<sub>12</sub> inferiores ao VSR. Para a luteína e de acordo com a bibliografia descrita, é recomendado ter pelo menos níveis séricos de luteína iguais ou superiores a 0,6  $\mu$ M para promover a saúde e prevenir o aparecimento e/ou progressão de doenças crónicas. Foi verificado que apenas um dos participantes pertencente ao grupo III tinha níveis séricos de luteína inferiores à concentração recomendada. Para a vitamina E, a prevalência do seu défice foi insignificante nos grupos I e II mas estatisticamente distinta da obtida no grupo III (9,1%). O número de participantes com défice de vitamina C foi significativo para todos os grupos, sendo o grupo I, o que apresentou maior percentagem de indivíduos com níveis plasmáticos de vitamina C inferiores ao VSR. Para esta vitamina, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos I (55%) e II (47%) mas foram verificadas entre estes dois grupos e o grupo III (22%). A prevalência do défice de vitamina B<sub>6</sub> na população em estudo foi superior a 30% em todos os grupos, sendo verificado no grupo III a maior prevalência (38%). Estatisticamente, não foram encontradas diferenças significativas entre a prevalência do défice desta vitamina no plasma.

**Tabela 17.** Avaliação dos níveis plasmáticos ou séricos dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	VSR	Referência	Prevalência da inadequação		
			Grupo I (n = 75)	Grupo II (n = 75)	Grupo III (n = 143)
Hcy ( $\mu\text{M}$ )	$\geq 15$	(337)	15 (20) <sup>a**</sup>	6 (8,7) <sup>b**</sup>	1 (0,71) <sup>c**</sup>
Cys ( $\mu\text{M}$ )	>300	(203)	13 (17) <sup>a**</sup>	6 (8,0) <sup>b**</sup>	0 (0,0) <sup>c**</sup>
MAD ( $\mu\text{M}$ )	>1,71	(338)	71 (95) <sup>a**</sup>	70 (93) <sup>a**</sup>	110 (77) <sup>b**</sup>
Vitamina A: retinol ( $\mu\text{M}$ )	<0,7	(339)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Vitamina E: $\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{M}$ )	<12	(339)	1 (1,3) <sup>a*</sup>	1 (1,4) <sup>a*</sup>	13 (9,1) <sup>b*</sup>
Luteína ( $\mu\text{M}$ )	<0,6	(340)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,70)
Vitamina C: AA ( $\mu\text{g/mL}$ )	<4,0	(341)	41 (55) <sup>a**</sup>	35 (47) <sup>b**</sup>	31 (22) <sup>c**</sup>
Vitamina B <sub>6</sub> : PLF (nM)	$\leq 30$	(342)	25 (33) <sup>a**</sup>	24 (32) <sup>a**</sup>	51 (38) <sup>a**</sup>
Ácido fólico (ng/mL)	<2,2	(339)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Vitamina B <sub>12</sub> (pg/mL)	<200	(343)	1 (1,4) <sup>a</sup>	2 (2,7) <sup>a</sup>	3 (2,1) <sup>a</sup>

**Os resultados estão expressos como número de indivíduos e como (percentagem).** O número de indivíduos na mesma linha assinalados com letras diferentes (a, b, c) são estatisticamente diferentes de acordo com o teste do Qui-quadrado e o teste Z para comparação de proporções (\*p < 0,05, \*\*p < 0,001). VSR, valor sanguíneo recomendado; Hcy, homocisteína; Cys, cisteína; MAD, malondialdeído; AA, ácido ascórbico; PLF, piridoxal-5-fosfato.

Os resultados apresentados na Tabela 18 permitiram avaliar o efeito isolado da presença de DMT2 na variação de alguns dos parâmetros bioquímicos estudados. Para isso o grupo III foi considerado o grupo de referência. O primeiro factor bioquímico a considerar foi a elevação dos níveis plasmáticos da Hcy ( $\geq 15 \mu\text{M}$ ). A probabilidade de ocorrência de hiperhomocisteinémia foi 12,3 vezes superior ( $p = 0,02$ ) no grupo II em relação ao grupo III. A elevação dos níveis plasmáticos da Cys acima dos 300  $\mu\text{M}$  é considerado um factor de risco cardiovascular, mas a sua probabilidade de ocorrência nos grupos I e II não pode ser comparada com o grupo III, porque neste grupo não foi observado a presença de hipercisteinémia em nenhum participante. A probabilidade de ocorrência de concentrações elevadas de MAD sérico (1,71  $\mu\text{M}$ ) foi 4,20 vezes superior ( $p = 0,004$ ) do que a observada no grupo de referência. Foi ainda verificado que os diabéticos do tipo 2 sem angiopatia tiveram 3,10 vezes mais hipovitaminose C (<4,0  $\mu\text{g/mL}$ ) do que os não diabéticos, sendo que a este resultado está associado um intervalo de confiança de 1,70 - 5,68 e um valor de  $p = 0,0002$ . Em relação à probabilidade de ocorrência de hipovitaminose B<sub>6</sub> (<30 nM) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

**Tabela 18.** Efeito da presença de DMT2 na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetro bioquímico	Grupo II (n = 75)		Grupo III (n = 143)		OR	IC (95%)	p
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	6/69	1/141	12,3	1,45 - 104	0,02*		
Cys $> 300 \mu\text{M}$	6/69	0/143	NA	NA	NA		
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	70/5	110/33	4,20	1,57 - 11,3	0,004**		
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	35/40	31/110	3,10	1,70 - 5,68	0,0002**		
PLF $< 30 \text{ nM}$	24/51	51/85	0,784	0,432 - 1,42	0,425		

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; MAD, malondialdeído; NA, não aplicável; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*. Estatisticamente significativo (\*p < 0,05, \*\*p < 0,001).

Na Tabela 19 estão descritos os resultados da avaliação da presença de angiopatia diabética na variação dos parâmetros bioquímicos. Neste caso o grupo II foi considerado o grupo de referência porque ambos os grupos eram compostos por diabéticos do tipo 2 mas os participantes do grupo II não tinham angiopatia. Para a Hcy verificou-se que os diabéticos do grupo I tinham um OR 2,88 vezes superior (p = 0,04) em comparação com os diabéticos do grupo II. No entanto, os OR obtidos para a elevação das concentrações plasmáticas de Cys e séricas de MAD não foram estatisticamente significativos. O mesmo se verificou para as probabilidades de ocorrência de hipovitaminoses C e B<sub>6</sub> no grupo I em relação ao grupo II, já que os OR obtidos não foram estatisticamente significativos (p > 0,05).

**Tabela 19.** Efeito da presença de angiopatia diabética na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I (n = 75)		Grupo II (n = 75)		OR	IC (95%)	p
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	15/60	6/69	2,88	1,05 - 7,88	0,04*		
Cys $> 300 \mu\text{M}$	13/62	6/69	2,41	0,864 - 6,73	0,09		
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	71/4	70/5	1,27	0,327 - 4,92	0,73		
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	41/34	35/40	1,38	0,725 - 2,62	0,33		
PLF $< 30 \text{ nM}$	25/50	24/51	1,06	0,537 - 2,10	0,86		

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; MAD, malondialdeído; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*. \*Estatisticamente significativo (p < 0,05).

Na Tabela 20 são apresentados os resultados da avaliação do efeito combinado da presença de DMT2 e de complicações angiopáticas. Para a referida avaliação foi considerado como grupo de referência, o grupo III por ser constituído por indivíduos não diabéticos. Assim, verificou-se que os diabéticos do tipo 2 com angiopatia tinham uma probabilidade de ter hiperhomocisteinémia cerca de 35 vezes superior do que os não diabéticos e simultaneamente um risco cerca de 5 vezes superior de ter concentrações elevadas de MAD no soro. Observou-se também uma probabilidade de 3,3 vezes superior dos diabéticos do tipo 2 com angiopatia terem hipovitaminose C. O risco de ocorrência de hipovitaminose B<sub>6</sub> não foi significativamente diferente entre os dois grupos.

**Tabela 20.** Efeito combinado da presença de DMT2 e da angiopatia na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I (n = 75)	Grupo III (n = 143)	OR	IC (95%)	p
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	15/60	1/141	35,3	4,55 - 273	0,0006**
Cys $> 300 \mu\text{M}$	13/62	0/143	NA	NA	NA
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	71/4	110/33	5,33	1,81 - 15,7	0,002**
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	41/34	31/110	3,31	1,85 - 5,92	0,0001**
PLF $< 30 \text{ nM}$	25/50	51/85	0,833	0,461 - 1,51	0,546

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; MAD, malondialdeído; NA, não aplicável; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*. Estatisticamente significativo (\*p < 0,05, \*\*p < 0,001).

#### 4.6. Associação dos níveis plasmáticos da Hcy e Cys com os outros compostos bioquímicos

Na Tabela 21 estão descritos os resultados da aplicação de regressões lineares simples da Hcy e Cys com as outras variáveis bioquímicas na população diabética estudada. A força das correlações observadas foi classificada de acordo com o critério de Franzblau (344). Verificou-se que a Hcy estava associada positiva e significativamente com os níveis séricos de Cys ( $r = 0,776$ ;  $p < 0,01$ ), MAD ( $r = 0,465$ ;  $p < 0,01$ ), retinol ( $r = 0,262$ ;  $p < 0,05$ ) e  $\alpha$ -tocoferol ( $r = 0,252$ ;  $p < 0,01$ ). No entanto a correlação positiva verificada entre a Hcy e as duas vitaminas lipossolúveis (retinol e  $\alpha$ -tocoferol) foi fraca ( $r < 0,40$ ). O coeficiente de determinação obtido pela aplicação da regressão linear entre a Hcy e o retinol indica que apenas 6,8% da variância da Hcy é explicada pela variância da concentração de retinol sérico. Em relação ao  $\alpha$ -tocoferol, 6,4% da variância dos níveis plasmáticos da Hcy é explicada pela variância dessa vitamina. No que se refere à correlação observada entre os valores plasmáticos da Hcy e Cys, identificou-se uma correlação forte entre as variáveis ( $r > 0,60$ ) e de acordo com o valor do coeficiente de determinação, 60,3% da variância da Hcy é explicada pela variância da Cys. De acordo com o modelo de regressão linear obtido, o declive da recta é de 13,729 e a ordenada na origem corresponde a 69,883. A associação positiva verificada entre a Hcy e o MAD, pode-se dizer que tem uma força moderada ( $0,40 < r < 0,60$ ) e que 21,6% da variância da Hcy plasmática é devido à variância do MAD sérico. Foi posteriormente aplicado um modelo de regressão linear múltipla considerando uma associação entre a Hcy e simultaneamente a Cys, MAD, AA e luteína. Verificou-se que apenas a Cys ( $\beta = 0,709$ ;  $t = 15,4$ ;  $p = 0,0001$ ) e o MAD ( $\beta = 0,134$ ;  $t = 3,25$ ;  $p = 0,001$ ) contribuíram de forma significativa para o modelo da regressão linear ( $p < 0,05$ ) e que a força de associação determinada pelo coeficiente de correlação de *Pearson* melhorou de forma pouco significativa ( $r = 0,789$ ) quando comparado com o efeito do modelo de regressão linear simples calculado entre a Hcy e a Cys. O coeficiente de determinação foi também muito semelhante entre a regressão linear simples ( $r^2 = 0,603$ ) da Hcy com a Cys e o modelo de regressão linear múltiplo ( $r^2 = 0,622$ ), o que significa que praticamente não existiu melhoria explicativa do modelo múltiplo em relação ao modelo simples e que cerca de 38% da variância de Hcy plasmática não é explicada por este modelo.

## Resultados

Em relação às outras associações observou-se que a Hcy estava inversa e significativamente correlacionada com os níveis plasmáticos de AA ( $r = -0,344$ ;  $p < 0,01$ ), bem como, com os níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> ( $r = -0,122$ ;  $p < 0,05$ ), luteína ( $r = -0,331$ ;  $p < 0,01$ ) e  $\beta$ -criptoxantina ( $r = -0,295$ ;  $p < 0,01$ ). A força da correlação verificada para estas quatro correlações foi fraca ( $r < 0,40$ ). A variância da Hcy explicada pelo modelo de regressão linear com o AA foi de 11,8%, com a vitamina B<sub>12</sub> foi de 1,5%, luteína de 10,9% e  $\beta$ -criptoxantina de 8,7%. Qualquer um dos 4 modelos aplicados apresenta uma baixa capacidade predictiva com coeficientes de determinação inferiores a 12%. Não se verificou uma correlação significativa da Hcy com a vitamina B<sub>6</sub> e com o ácido fólico. No entanto, para avaliar a associação combinada do ácido fólico e vitaminas B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub> com os níveis plasmáticos de Hcy foi aplicado um modelo de regressão linear múltipla. Contrariamente aos modelos de regressão linear simples, observou-se uma associação inversa com a Hcy ( $r = -0,368$ ;  $p < 0,001$ ), tendo o ácido fólico ( $\beta = -0,276$ ;  $t = -3,435$ ;  $p = 0,001$ ) e a vitamina B<sub>12</sub> ( $\beta = -0,201$ ;  $t = -2,490$ ;  $p = 0,014$ ) contribuído significativamente para o modelo aplicado. O contributo da vitamina B<sub>6</sub> não foi significativo ( $\beta = 0,021$ ;  $t = 0,266$ ;  $p = 0,791$ ).

Possíveis associações entre os níveis plasmáticos de Cys com as outras variáveis bioquímicas estudadas foram também avaliadas. Verificou-se que a Cys estava directamente associada com os níveis séricos de MAD ( $r = 0,454$ ;  $p < 0,01$ ), retinol ( $r = 0,196$ ;  $p < 0,01$ ) e  $\alpha$ -tocoferol ( $r = 0,405$ ;  $p < 0,01$ ). As correlações observadas com o MAD e o  $\alpha$ -tocoferol são de força moderada e a do retinol é uma correlação fraca. O coeficiente de determinação obtido pela aplicação da regressão linear entre a Cys e o MAD indica que apenas 20,6% da variância da Cys é explicada pela variância da concentração de MAD sérico. Os coeficientes de determinação obtidos nas regressões lineares simples da Cys com o retinol e com o  $\alpha$ -tocoferol, indicaram que 3,8% da variância plasmática deste aminotiol é explicada pelo retinol e 16,4% é explicada pelo modelo de regressão simples calculado com o  $\alpha$ -tocoferol. Observou-se também que os níveis plasmáticos de Cys estavam inversamente correlacionados com a concentração plasmática de AA ( $r = -0,376$ ;  $p < 0,01$ ), bem como, com os níveis séricos de luteína ( $r = -0,436$ ;  $p < 0,01$ ) e  $\beta$ -criptoxantina ( $r = -0,362$ ;  $p < 0,01$ ). O modelo de regressão linear simples entre a Cys e o AA explica 14,2% da variância da Cys. Já os modelos lineares obtidos entre a Cys e a luteína e entre a Cys e a  $\beta$ -criptoxantina, explicam respectivamente, 19% e 13,1% da variância da Cys. Foi posteriormente aplicado um modelo de regressão linear múltipla considerando uma associação entre a Cys e simultaneamente o MAD, retinol,  $\alpha$ -tocoferol, AA, luteína e  $\beta$ -criptoxantina. Verificou-se que o MAD ( $\beta = 0,285$ ;  $t = 4,83$ ;  $p < 0,001$ ),  $\alpha$ -tocoferol ( $\beta = 0,351$ ;  $t = 6,35$ ;  $p < 0,001$ ), luteína ( $\beta = -0,262$ ;  $t = -4,39$ ;  $p < 0,001$ ) e AA ( $\beta = -0,155$ ;  $t = -2,64$ ;  $p = 0,009$ ) contribuíram de forma significativa para o modelo da regressão linear e que o  $\alpha$ -tocoferol foi a variável que teve um efeito maior no modelo explicativo. A força de associação melhorou ( $r = 0,707$ ) significativamente quando comparada com os coeficientes de correlação de *Pearson* obtidos para a várias correlações lineares simples realizadas entre a

Cys e as outras variáveis bioquímicas. O poder explicativo do modelo de regressão múltipla também melhorou significativamente (50%) quando comparado com a capacidade predictiva dos vários modelos de regressão linear simples aplicados. No entanto é de referir que após o ajustamento do coeficiente de determinação, a capacidade explicativa do modelo passou a ser 48,4%. Não foram verificadas correlações significativas entre os níveis plasmáticos de Cys e as concentrações de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico no sangue.

**Tabela 21.** Regressão linear simples dos níveis plasmáticos da Hcy e Cys com outros parâmetros bioquímicos.

	Parâmetros	Coeficiente de correlação <sup>a</sup>	<i>p</i>	Coeficiente de determinação	Modelo de regressão
Hcy (µM) vs.	AA (µg/mL)	r = -0,344	<0,01	r <sup>2</sup> = 0,118	y = -0,818x + 11,04
	Vitamina B <sub>12</sub> (pg/mL)	r = -0,122	<0,05	r <sup>2</sup> = 0,015	y = -0,002x + 8,460
	Ácido fólico (ng/mL)	r = -0,086	0,152	r <sup>2</sup> = 0,007	y = -0,123x + 8,376
	Vitamina B <sub>6</sub> (nM)	r = -0,046	0,441	r <sup>2</sup> = 0,002	y = -0,005x + 7,432
	Cys (µM)	r = 0,776	<0,01	r <sup>2</sup> = 0,603	y = 13,729x + 69,88
	MAD (µM)	r = 0,465	<0,01	r <sup>2</sup> = 0,216	y = 2,959x - 0,102
	Luteína (µM)	r = -0,331	<0,01	r <sup>2</sup> = 0,109	y = -20,563x + 22,61
	β-criptoxantina (µM)	r = -0,295	<0,01	r <sup>2</sup> = 0,087	y = -4,575x + 7,936
	Retinol (µM)	r = 0,262	<0,05	r <sup>2</sup> = 0,068	y = 0,917x + 3,143
α - tocoferol (µM)	r = 0,252	<0,01	r <sup>2</sup> = 0,064	y = 0,129x + 3,752	
Cys (µM) vs.	AA (µg/mL)	r = -0,376	<0,01	r <sup>2</sup> = 0,142	y = -15,734x + 242,9
	Vitamina B <sub>12</sub> (pg/mL)	r = 0,058	0,325	r <sup>2</sup> = 0,003	y = 0,02x + 156,9
	Ácido fólico (ng/mL)	r = 0,085	0,160	r <sup>2</sup> = 0,007	y = 2,132x + 146,1
	Vitamina B <sub>6</sub> (nM)	r = -0,051	0,392	r <sup>2</sup> = 0,003	y = -0,092x + 174,0
	MAD (µM)	r = 0,454	<0,01	r <sup>2</sup> = 0,206	y = 51,20x + 42,35
	Luteína (µM)	r = -0,436	<0,01	r <sup>2</sup> = 0,190	y = -478,7x + 527,5
	β-criptoxantina (µM)	r = -0,362	<0,01	r <sup>2</sup> = 0,131	y = -99,56x + 189,5
	Retinol (µM)	r = 0,196	<0,01	r <sup>2</sup> = 0,038	y = 12,13x + 114,5
	α-tocoferol (µM)	r = 0,405	<0,01	r <sup>2</sup> = 0,164	y = 3,646x + 71,40

<sup>a</sup>Coeficiente de correlação de Pearson.

Hcy, homocisteína; Cys, cisteína, MAD, malondialdeído.

Estatisticamente significativo (*p* <0,05).

#### 4.7. Associação dos níveis plasmáticos da Hcy e Cys com o estado nutricional e clínico

Na Tabela 22 estão descritos os resultados das associações da Hcy e Cys com as variáveis antropométricas e fisiológicas da população. Foram observadas correlações positivas moderadas da Hcy com peso (*r* = 0,415; *p* <0,01), IMC (*r* = 0,448; *p* <0,01) e PA (*r* = 0,428; *p* <0,01). Foram também verificadas correlações positivas fracas da Hcy com prega cutânea subescapular, GC em quilogramas, água corporal total em litros, triglicéridos e PAS. Foi ainda observada uma correlação negativa entre a Hcy e a concentração de C-HDL (*r* = -0,354; *p* <0,01). As correlações positivas e significantes verificadas entre a Hcy e a PAD e entre a Hcy e as pulsações foram consideradas nulas ou negligenciáveis (*r* <0,20), de acordo com a classificação do coeficiente de correlação estabelecida por Franzblau (344). Não foram

## *Resultados*

observadas correlações significativas da Hcy com as pregas cutâneas tricipital, abdominal e suprailíaca, nem com as percentagens de GC e de ACT.

Em relação à Cys, verificou-se a presença de correlações positivas moderadas com o peso ( $r = 0,428$ ;  $p < 0,01$ ), IMC ( $r = 0,521$ ;  $p < 0,01$ ), PA ( $r = 0,433$ ;  $p < 0,01$ ) e triglicéridos ( $r = 0,413$ ;  $p < 0,01$ ). É de salientar o facto de que todas as correlações moderadas verificadas para a Hcy foram também observadas para a Cys, sendo que, a correlação positiva e fraca verificada entre a Hcy e os triglicéridos passou a ter uma força moderada quando se correlacionou a Cys com os triglicéridos. Foram também observadas correlações positivas e fracas da Cys com a prega cutânea subescapular, GC em quilogramas, ACT em litros, PAS, PAD, pulsações e com o tempo de duração da diabetes. O C-HDL ( $r = -0,267$ ;  $p < 0,01$ ) apresentou uma correlação negativa e fraca com a Cys. As correlações positivas e significantes da Cys com a PAD e as pulsações foram consideradas nulas ou negligenciáveis ( $r < 0,20$ ), de acordo com a classificação do coeficiente de correlação estabelecida por Franzblau (344). Não foram verificadas correlações significativas da Cys com a percentagem de GC, a percentagem de ACT e as pregas cutâneas tricipital, abdominal e suprailíaca.

**Tabela 22.** Associação da Hcy e Cys com as variáveis antropométricas e fisiológicas.

	Variáveis	Coefficiente de correlação*	p
Hcy (µM) vs.	Peso (kg)	r = 0,415	<0,01
	Altura (m)	r = 0,107	0,068
	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	r = 0,448	<0,01
	PA (cm)	r = 0,428	<0,01
	PAbdo (mm)	r = -0,070	0,250
	PTric (mm)	r = -0,083	0,159
	Psubsc (mm)	r = 0,211	<0,01
	Psuprai (mm)	r = -0,095	0,108
	GC (%)	r = -0,029	0,625
	GC (kg)	r = 0,242	<0,01
	ACT (%)	r = 0,035	0,561
	ACT (L)	r = 0,394	<0,01
	C-HDL (mg/dL)	r = -0,354	<0,01
	Triglicéridos (mg/dL)	r = 0,360	<0,01
	PAS (mmHg)	r = 0,301	<0,01
	PAD (mmHg)	r = 0,140	<0,05
	Pulsações (batimentos/min)	r = 0,171	<0,01
Cys (µM) vs.	Peso (kg)	r = 0,428	<0,01
	Altura (m)	r = 0,009	0,883
	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	r = 0,521	<0,01
	PA (cm)	r = 0,433	<0,01
	PAbdo (mm)	r = 0,009	0,879
	PTric (mm)	r = -0,016	0,782
	Psubsc (mm)	r = 0,284	<0,01
	Psuprai (mm)	r = -0,028	0,633
	GC (%)	r = 0,082	0,170
	GC (kg)	r = 0,295	<0,01
	ACT (%)	r = -0,073	0,221
	ACT (L)	r = 0,336	<0,01
	C-HDL (mg/dL)	r = -0,267	<0,01
	Triglicéridos (mg/dL)	r = 0,413	<0,01
	PAS (mmHg)	r = 0,373	<0,01
	PAD (mmHg)	r = 0,194	<0,01
	Pulsações (batimentos/min)	r = 0,191	<0,01

\* Coeficiente de correlação de *Spearman*.

ACT, água corporal total; CT, colesterol total; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; C-LDL, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade plasmática; Cys, cisteína; GC, gordura corporal; Hcy, homocisteína; IMC, índice de massa corporal; PA, perímetro abdominal; PAbdo, prega abdominal; PAD, pressão arterial diastólica; PAS, pressão arterial sistólica; Psubsc, prega subescapular; PTric, prega tricípital; Psuprai, prega supraílica. Estatisticamente significativo (p <0,05).

#### 4.8. Associação dos níveis plasmáticos da Hcy e Cys com a ingestão alimentar

Os resultados das associações da Hcy e Cys com a ingestão diária de nutrientes são apresentados na Tabela 23. Foram observadas correlações positivas fracas da Hcy com a ingestão de gordura polinsaturada ( $r = 0,269$ ;  $p < 0,01$ ), ácidos gordos ómega-3 ( $r = 0,257$ ;  $p < 0,01$ ), ácido linolénico ( $r = 0,330$ ;  $p < 0,01$ ), lisina ( $r = 0,232$ ;  $p < 0,01$ ) e metionina ( $r = 0,211$ ;  $p < 0,01$ ). As correlações positivas e significantes da concentração plasmática da Hcy com a ingestão de proteína, gordura total, ácidos gordos *trans*, glicina, serina, vitamina K, ácido pantoténico, cálcio, potássio, sódio, cloro, iodo e molibdénio foram consideradas nulas ou negligenciáveis ( $r < 0,20$ ), de acordo com a classificação do coeficiente de correlação estabelecida por Franzblau (344). Não foram verificadas correlações significativas da Hcy plasmática com a ingestão de calorias, gordura saturada e monoinsaturada, colesterol, ácidos gordos ómega-6, ácido oleico, ácido linoleico, EPA, DHA, cistina, retinol, carotenóides, vitamina E, vitamina D, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B<sub>6</sub>, folatos, vitamina B<sub>12</sub>, vitamina C, cobre, ferro, magnésio, manganésio, fósforo, selénio, zinco e boro.

Em relação à Cys, foram obtidas correlações positivas fracas com a ingestão de proteína ( $r = 0,212$ ;  $p < 0,01$ ), colesterol ( $r = 0,282$ ;  $p < 0,01$ ), ácidos gordos ómega-3 ( $r = 0,300$ ;  $p < 0,01$ ), ácido linolénico ( $r = 0,394$ ;  $p < 0,01$ ), lisina ( $r = 0,262$ ;  $p < 0,01$ ) e metionina ( $r = 0,239$ ;  $p < 0,01$ ). As correlações positivas e significantes da concentração plasmática da Cys com a ingestão de gordura saturada, ácidos gordos *trans*, EPA, DHA, glicina, serina, vitamina D, vitamina K, ácido pantoténico, vitamina B<sub>12</sub>, cálcio, potássio, sódio, boro, cloro, iodo e molibdénio foram consideradas nulas ou negligenciáveis ( $r < 0,20$ ), de acordo com a classificação do coeficiente de correlação estabelecida por Franzblau (344). Não foram verificadas correlações significativas da Cys plasmática com a ingestão de calorias, gordura total, gordura monoinsaturada e polinsaturada, ácidos gordos ómega-6, ácido oleico, linoleico, cistina, retinol, carotenóides, vitamina E, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B<sub>6</sub>, folatos, vitamina C, cobre, ferro, magnésio, manganésio, fósforo, selénio e zinco.

Foram também avaliadas as correlações entre os níveis plasmáticos de Hcy e Cys com a ingestão diária de frutos e legumes. Os coeficientes de correlação obtidos não foram significativos para Hcy ( $r = 0,037$ ;  $p = 0,527$ ) e nem para a Cys ( $r = 0,058$ ;  $p = 0,325$ ).

**Tabela 23.** Associação da Hcy e Cys com a ingestão diária de nutrientes.

	Variáveis	Coefficiente de correlação*	<i>p</i>
Hcy (µM) vs.	Calorias (kcal/dia)	r = 0,106	0,072
	Proteína (g/dia)	r = 0,193	<0,01
	Gordura total (g/dia)	r = 0,175	<0,05
	Gordura saturada (g/dia)	r = 0,078	0,183
	Gordura monoinsaturada (g/dia)	r = 0,035	0,553
	Gordura polinsaturada (g/dia)	r = 0,269	<0,01
	Colesterol (mg/dia)	r = -0,022	0,706
	Ácidos gordos ómega-3 (g/dia)	r = 0,257	<0,01
	Ácidos gordos ómega-6 (g/dia)	r = 0,003	0,958
	Ácido oleico (g/dia)	r = 0,065	0,271
	Ácido linoleico (g/dia)	r = -0,019	0,751
	Ácido linolénico (g/dia)	r = 0,330	<0,01
	Ácidos gordos <i>trans</i> (g/dia)	r = 0,164	<0,01
	EPA (g/dia)	r = 0,066	0,260
	DHA (g/dia)	r = 0,091	0,122
	Glicina (g/dia)	r = 0,161	<0,01
	Serina (g/dia)	r = 0,134	<0,05
	Cistina (g/dia)	r = 0,113	0,054
	Lisina (g/dia)	r = 0,232	<0,01
	Metionina (g/dia)	r = 0,211	<0,01
	Retinol (RE/dia)	r = 0,001	0,987
	Carotenóides (RE/dia)	r = -0,035	0,551
	Vitamina E (mg/dia)	r = 0,009	0,878
	Vitamina D (mg/dia)	r = 0,079	0,178
	Vitamina K (µg/dia)	r = 0,190	<0,01
	Tiamina (mg/dia)	r = 0,060	0,307
	Riboflavina (mg/dia)	r = 0,067	0,251
	Niacina (mg/dia)	r = 0,013	0,830
	Ácido pantoténico (mg/dia)	r = 0,157	<0,01
	Vitamina B <sub>6</sub> (mg/dia)	r = 0,017	0,770
	Folatos (µg/dia)	r = -0,086	0,143
	Vitamina B <sub>12</sub> (µg/dia)	r = 0,113	0,053
	Vitamina C (mg/dia)	r = 0,072	0,219
	Cálcio (mg/dia)	r = 0,119	<0,05
	Cobre (mg/dia)	r = 0,004	0,944
	Ferro (mg/dia)	r = -0,013	0,830
	Magnésio (mg/dia)	r = -0,022	0,705
	Manganésio (µg/dia)	r = -0,053	0,364
	Fósforo (mg/dia)	r = 0,069	0,242
	Potássio (mg/dia)	r = 0,169	<0,01
Selénio (µg/dia)	r = 0,103	0,079	
Sódio (mg/dia)	r = 0,198	<0,01	
Zinco (mg/dia)	r = 0,093	0,111	
Boro (mg/dia)	r = 0,086	0,145	
Cloro (mg/dia)	r = 0,144	<0,05	
Iodo (µg/dia)	r = 0,128	<0,05	
Molibdénio (µg/dia)	r = 0,155	<0,01	

**Tabela 23.** Associação da Hcy e Cys com a ingestão diária de nutrientes (continuação).

	Variáveis	Coefficiente de correlação*	p
Cys ( $\mu$ M) vs.	Calorias (kcal/dia)	r = 0,076	0,194
	Proteína (g/dia)	r = 0,212	<0,01
	Gordura total (g/dia)	r = 0,094	0,109
	Gordura saturada (g/dia)	r = 0,158	<0,01
	Gordura monoinsaturada (g/dia)	r = 0,067	0,250
	Gordura polinsaturada (g/dia)	r = 0,018	0,754
	Colesterol (mg/dia)	r = 0,282	<0,01
	Ácidos gordos $\omega$ -3 (g/dia)	r = 0,300	<0,01
	Ácidos gordos $\omega$ -6 (g/dia)	r = -0,011	0,847
	Ácido oleico (g/dia)	r = 0,059	0,313
	Ácido linoleico (g/dia)	r = -0,041	0,481
	Ácido linolênico (g/dia)	r = 0,394	<0,01
	Ácidos gordos trans (g/dia)	r = 0,192	<0,01
	EPA (g/dia)	r = 0,124	<0,05
	DHA (g/dia)	r = 0,156	<0,01
	Glicina (g/dia)	r = 0,184	<0,01
	Serina (g/dia)	r = 0,133	<0,05
	Cistina (g/dia)	r = 0,105	0,072
	Lisina (g/dia)	r = 0,262	<0,01
	Metionina (g/dia)	r = 0,239	<0,01
	Retinol (RE/dia)	r = 0,012	0,841
	Carotenóides (RE/dia)	r = -0,036	0,542
	Vitamina E (mg/dia)	r = 0,016	0,787
	Vitamina D (mg/dia)	r = 0,121	<0,05
	Vitamina K ( $\mu$ g/dia)	r = 0,184	<0,01
	Tiamina (mg/dia)	r = 0,051	0,387
	Riboflavina (mg/dia)	r = 0,083	0,156
	Niacina (mg/dia)	r = 0,020	0,783
	Ácido pantoténico (mg/dia)	r = 0,169	<0,01
	Vitamina B <sub>6</sub> (mg/dia)	r = 0,018	0,764
	Folatos ( $\mu$ g/dia)	r = -0,085	0,148
	Vitamina B <sub>12</sub> ( $\mu$ g/dia)	r = 0,177	<0,01
	Vitamina C (mg/dia)	r = 0,095	0,103
	Cálcio (mg/dia)	r = 0,118	<0,05
	Cobre (mg/dia)	r = -0,008	0,895
	Ferro (mg/dia)	r = -0,020	0,729
	Magnésio (mg/dia)	r = -0,047	0,423
	Manganésio ( $\mu$ g/dia)	r = -0,113	0,053
	Fósforo (mg/dia)	r = 0,081	0,166
	Potássio (mg/dia)	r = 0,164	<0,01
Selénio ( $\mu$ g/dia)	r = 0,074	0,209	
Sódio (mg/dia)	r = 0,193	<0,01	
Zinco (mg/dia)	r = 0,111	0,058	
Boro (mg/dia)	r = 0,120	<0,05	
Cloro (mg/dia)	r = 0,135	<0,05	
Iodo ( $\mu$ g/dia)	r = 0,133	<0,05	
Molibdénio ( $\mu$ g/dia)	r = 0,166	<0,01	

\*Coeficiente de correlação de Spearman.

DHA, ácido docosahexaenóico; EPA, ácido eicosapentaenóico; Cys, cisteína.

Estatisticamente significativo (p <0,05).

#### 4.9. Associação entre o stress oxidante, antioxidantes alimentares, estado nutricional e clínico

Na Tabela 24 são apresentados os resultados da associação do MAD, vitaminas antioxidantes e carotenóides com as variações antropométricas e fisiológicas estudadas. Foram observadas correlações positivas moderadas da concentração sérica de MAD com o peso ( $r = 0,456$ ;  $p < 0,01$ ), IMC ( $r = 0,421$ ;  $p < 0,01$ ) e PA ( $r = 0,419$ ;  $p < 0,01$ ). Foram também observadas correlações positivas e fracas do MAD com o retinol sérico ( $r = 0,263$ ;  $p < 0,01$ ),  $\alpha$ -tocoferol sérico ( $r = 0,235$ ;  $p < 0,01$ ), percentagem de GC ( $r = 0,285$ ;  $p < 0,01$ ), concentrações séricas de triglicéridos ( $r = 0,319$ ;  $p < 0,01$ ) e PAS ( $r = 0,237$ ;  $p < 0,01$ ). Verificaram-se correlações inversas e fracas do MAD e com as concentrações plasmáticas de AA ( $r = -0,256$ ;  $p < 0,01$ ) e sérica de C-HDL ( $r = -0,200$ ;  $p < 0,01$ ), luteína ( $r = -0,237$ ;  $p < 0,01$ ) e  $\beta$ -criptoxantina ( $r = -0,289$ ;  $p < 0,01$ ). A correlação negativa e significativa verificada entre as concentrações séricas de MAD e a prega cutânea tricípital, bem como, as correlações positivas e significantes da concentração sérica de MAD com a altura, prega cutânea subescapular, pulsações e tempo de duração da diabetes foram consideradas nulas ou negligenciáveis ( $r < 0,20$ ), de acordo com a classificação do coeficiente de correlação estabelecida por Franzblau (344). Não foram observadas correlações estatisticamente significantes entre as concentrações séricas de MAD e as restantes variáveis avaliadas.

Em relação ao AA, foram observadas associações positivas e moderadas entre as concentrações plasmáticas de AA e as concentrações séricas de luteína ( $r = 0,406$ ;  $p < 0,01$ ) e  $\beta$ -criptoxantina ( $r = 0,469$ ;  $p < 0,01$ ). Foi observada uma associação directa e fraca entre o AA plasmático e o C-HDL ( $r = 0,274$ ;  $p < 0,01$ ). Foram também verificadas correlações inversas e fracas dos níveis plasmáticos de AA com o IMC ( $r = -0,296$ ;  $p < 0,01$ ), PA ( $r = -0,284$ ;  $p < 0,01$ ) e com os triglicéridos ( $r = -0,308$ ;  $p < 0,01$ ). A correlação positiva e significativa das concentrações plasmáticas de AA com o peso, bem como, as correlações negativas e significantes dos níveis plasmáticos de AA com a prega cutânea subescapular, a GC em quilogramas, PAS, PAD, pulsações e HbA1c foram consideradas nulas ou negligenciáveis ( $r < 0,20$ ), de acordo com a classificação do coeficiente de correlação estabelecida por Franzblau (344). Não foram verificadas correlações significativas do AA plasmático com os níveis séricos de retinol e  $\alpha$ -tocoferol, pregas cutâneas tricípital, abdominal, suprailíaca, altura, percentagem de GC, tempo de evolução da diabetes.

No que diz respeito às possíveis associações dos níveis séricos do retinol observou-se a presença de correlações positivas e fracas com  $\alpha$ -tocoferol ( $r = 0,249$ ;  $p < 0,01$ ), PA ( $r = 0,203$ ;  $p < 0,01$ ) e tempo de evolução da diabetes ( $r = 0,217$ ;  $p < 0,01$ ). As correlações negativas e significantes do retinol sérico com a prega cutânea tricípital e as pulsações foram consideradas nulas ou negligenciáveis ( $r < 0,20$ ), de acordo com a classificação do coeficiente de correlação estabelecida por Franzblau (344). O mesmo critério foi utilizado para avaliar e considerar nulas as associações positivas verificadas entre as concentrações de retinol e peso, IMC, triglicéridos

e GC em quilogramas. Não foram observadas correlações estatisticamente significantes entre as concentrações séricas de retinol e as restantes variáveis avaliadas.

O  $\alpha$ -tocoferol foi correlacionado de forma positiva e fraca com o IMC (0,244;  $p < 0,01$ ), prega cutânea subescapular ( $r = 0,217$ ;  $p < 0,01$ ) e triglicéridos ( $r = 0,352$ ;  $p < 0,01$ ). As correlações negativas e significantes do  $\alpha$ -tocoferol com a luteína e a  $\beta$ -criptoxantina, bem como, as correlações positivas e significantes de  $\alpha$ -tocoferol com peso, PA, GC em quilogramas, PAS e pulsações foram consideradas nulas ou negligenciáveis ( $r < 0,20$ ), de acordo com a classificação do coeficiente de correlação estabelecida por Franzblau (344). Não foram observadas correlações estatisticamente significantes entre as concentrações séricas de retinol e as restantes variáveis avaliadas.

Verificou-se que a luteína estava directa e moderadamente associada com a  $\beta$ -criptoxantina através de uma correlação positiva e significativa ( $r = 0,434$ ;  $p < 0,01$ ). Foi também observada uma associação directa fraca entre os níveis séricos de luteína e as concentrações de C-HDL ( $r = 0,349$ ;  $p < 0,01$ ). Foram ainda verificadas correlações fracas e inversas da luteína com o peso ( $r = -0,362$ ;  $p < 0,01$ ), IMC ( $r = -0,369$ ;  $p < 0,01$ ), PA ( $r = -0,333$ ;  $p < 0,01$ ), prega cutânea subescapular ( $r = -0,210$ ;  $p < 0,01$ ), GC em quilogramas ( $r = -0,267$ ;  $p < 0,01$ ), triglicéridos ( $r = -0,327$ ;  $p < 0,01$ ), PAS ( $r = -0,291$ ;  $p < 0,01$ ), PAD ( $r = -0,205$ ;  $p < 0,01$ ) e pulsações ( $r = -0,210$ ;  $p < 0,01$ ). Não foram observadas correlações estatisticamente significantes entre as concentrações séricas de luteína e as restantes variáveis avaliadas.

Em relação à  $\beta$ -criptoxantina foram verificadas correlações inversas e moderadas com o peso ( $r = -0,374$ ;  $p < 0,01$ ), IMC ( $r = -0,353$ ;  $p < 0,01$ ) e PA ( $r = -0,355$ ;  $p < 0,01$ ). Foram também observadas associações positivas e fracas da sua concentração sérica com C-HDL ( $r = 0,299$ ;  $p < 0,01$ ) e HbA1c ( $r = 0,225$ ;  $p < 0,05$ ). Simultaneamente verificou-se a presença de associações negativas e fracas dos níveis séricos de  $\beta$ -criptoxantina com os triglicéridos ( $r = -0,295$ ;  $p < 0,01$ ), GC em quilogramas ( $r = -0,231$ ;  $p < 0,01$ ) e as pulsações ( $r = -0,211$ ;  $p < 0,01$ ). A correlação positiva e significativa observada entre a  $\beta$ -criptoxantina e a altura foi considerada nula ou negligenciável ( $r < 0,20$ ), de acordo com a classificação do coeficiente de correlação estabelecida por Franzblau (344).

**Tabela 24.** Associação do MAD, vitaminas antioxidantes e carotenóides com as variáveis antropométricas e fisiológicas.

	Variáveis	Coefficiente de correlação*	p
MAD ( $\mu\text{M}$ ) vs.	AA ( $\mu\text{g/mL}$ )	$r = -0,256$	$<0,01$
	Retinol ( $\mu\text{M}$ )	$r = 0,263$	$<0,01$
	$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{M}$ )	$r = 0,235$	$<0,01$
	Luteína ( $\mu\text{M}$ )	$r = -0,237$	$<0,01$
	$\beta$ -criptoxantina ( $\mu\text{M}$ )	$r = -0,289$	$<0,01$
	Peso (kg)	$r = 0,456$	$<0,01$
	Altura (m)	$r = 0,162$	$<0,01$
	IMC ( $\text{kg/m}^2$ )	$r = 0,421$	$<0,01$
	PA (cm)	$r = 0,419$	$<0,01$
	PAbdo (mm)	$r = 0,051$	0,400
	PTric (mm)	$r = -0,166$	$<0,01$
	Psubsc (mm)	$r = 0,188$	$<0,01$
	Psuprai (mm)	$r = -0,009$	0,875
	GC (%)	$r = 0,285$	$<0,01$
	GC (kg)	$r = 0,024$	0,685
	C-HDL (mg/dL)	$r = -0,200$	$<0,01$
	Triglicéridos (mg/dL)	$r = 0,319$	$<0,01$
	PAS (mmHg)	$r = 0,237$	$<0,01$
	PAD (mmHg)	$r = 0,107$	0,067
	Pulsações (batimentos/min)	$r = 0,127$	$<0,05$
	HbA1c (%)	$r = -0,017$	0,838
	ED (anos)	$r = 0,168$	$<0,05$
AA ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs.	Retinol ( $\mu\text{M}$ )	$r = 0,002$	0,979
	$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{M}$ )	$r = -0,107$	0,069
	Luteína ( $\mu\text{M}$ )	$r = 0,406$	$<0,01$
	$\beta$ -criptoxantina ( $\mu\text{M}$ )	$r = 0,469$	$<0,01$
	Peso (kg)	$r = 0,133$	$<0,05$
	Altura (m)	$r = -0,102$	0,081
	IMC ( $\text{kg/m}^2$ )	$r = -0,296$	$<0,01$
	PA (cm)	$r = -0,284$	$<0,01$
	PAbdo (mm)	$r = -0,004$	0,949
	PTric (mm)	$r = 0,050$	0,402
	Psubsc (mm)	$r = -0,174$	$<0,01$
	Psuprai (mm)	$r = 0,053$	0,371
	GC (%)	$r = 0,014$	0,822
	GC (kg)	$r = -0,187$	$<0,01$
	C-HDL (mg/dL)	$r = 0,274$	$<0,01$
	Triglicéridos (mg/dL)	$r = -0,308$	$<0,01$
	PAS (mmHg)	$r = -0,189$	$<0,01$
	PAD (mmHg)	$r = -0,154$	$<0,01$
	Pulsações (batimentos/min)	$r = -0,153$	$<0,01$
	HbA1c (%)	$r = -0,191$	$<0,05$
ED (anos)	$r = 0,044$	0,596	

**Tabela 24.** Associação do MAD, vitaminas antioxidantes e carotenóides com as variáveis antropométricas e fisiológicas (continuação).

	Variáveis	Coefficiente de correlação*	<i>p</i>
Retinol (µM) vs.	α-tocoferol (µM)	r = 0,249	<0,01
	Luteína (µM)	r = 0,068	0,246
	β-criptoxantina (µM)	r = 0,035	0,629
	Peso (kg)	r = 0,192	<0,01
	Altura (m)	r = 0,101	0,085
	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	r = 0,156	<0,01
	PA (cm)	r = 0,203	<0,01
	PAbdo (mm)	r = 0,098	0,109
	PTric (mm)	r = -0,116	<0,05
	Psubsc (mm)	r = 0,086	0,155
	Psuprai (mm)	r = 0,056	0,345
	GC (%)	r = -0,005	0,928
	GC (kg)	r = 0,129	<0,05
	C-HDL (mg/dL)	r = -0,122	0,077
	Triglicéridos (mg/dL)	r = 0,164	<0,05
	PAS (mmHg)	r = 0,025	0,670
	PAD (mmHg)	r = -0,081	0,167
	Pulsações (batimentos/min)	r = -0,118	<0,05
	HbA1c (%)	r = -0,100	0,234
	ED (anos)	r = 0,217	<0,01
α-tocoferol (µM) vs.	Luteína (µM)	r = -0,117	<0,05
	β-criptoxantina (µM)	r = -0,174	<0,05
	Peso (kg)	r = 0,133	<0,05
	Altura (m)	r = -0,102	0,081
	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	r = 0,244	<0,01
	PA (cm)	r = 0,170	<0,01
	PAbdo (mm)	r = 0,035	0,569
	PTric (mm)	r = 0,097	0,099
	Psubsc (mm)	r = 0,217	<0,01
	Psuprai (mm)	r = 0,058	0,327
	GC (%)	r = 0,087	0,146
	GC (kg)	r = 0,141	<0,05
	C-HDL (mg/dL)	r = 0,009	0,902
	Triglicéridos (mg/dL)	r = 0,352	<0,01
	PAS (mmHg)	r = 0,119	<0,05
	PAD (mmHg)	r = 0,041	0,485
	Pulsações (batimentos/min)	r = 0,150	<0,05
	HbA1c (%)	r = 0,137	0,102
	ED (anos)	r = -0,014	0,869

**Tabela 24.** Associação do MAD, vitaminas antioxidantes e carotenóides com as variáveis antropométricas e fisiológicas (continuação).

	Variáveis	Coefficiente de correlação*	p	
Luteína (µM) vs.	β-criptoxantina (µM)	r = 0,434	<0,01	
	Peso (kg)	r = -0,362	<0,01	
	Altura (m)	r = -0,079	0,176	
	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	r = -0,369	<0,01	
	PA (cm)	r = -0,333	<0,01	
	PAbdo (mm)	r = -0,069	0,256	
	PTric (mm)	r = -0,031	0,595	
	Psubsc (mm)	r = -0,210	<0,01	
	Psuprai (mm)	r = 0,027	0,650	
	GC (%)	r = -0,094	0,119	
	GC (kg)	r = -0,267	<0,01	
	C-HDL (mg/dL)	r = 0,349	<0,01	
	Triglicéridos (mg/dL)	r = -0,327	<0,01	
	PAS (mmHg)	r = -0,291	<0,01	
	PAD (mmHg)	r = -0,205	<0,01	
	Pulsações (batimentos/min)	r = -0,210	<0,01	
	HbA1c (%)	r = -0,091	0,275	
	ED (anos)	r = 0,043	0,608	
	β-criptoxantina (µM) vs.	Peso (kg)	r = -0,374	<0,01
		Altura (m)	r = 0,168	<0,05
IMC (kg/m <sup>2</sup> )		r = -0,353	<0,01	
PA (cm)		r = -0,355	<0,01	
PAbdo (mm)		r = -0,008	0,911	
PTric (mm)		r = 0,019	0,794	
Psubsc (mm)		r = -0,121	0,109	
Psuprai (mm)		r = -0,001	0,993	
GC (%)		r = -0,034	0,651	
GC (kg)		r = -0,231	<0,01	
C-HDL (mg/dL)		r = 0,299	<0,01	
Triglicéridos (mg/dL)		r = -0,295	<0,01	
PAS (mmHg)		r = -0,107	0,142	
PAD (mmHg)		r = -0,066	0,366	
Pulsações (batimentos/min)		r = -0,211	<0,01	
HbA1c (%)		r = 0,225	<0,05	
ED (anos)	r = 0,044	0,677		

\* Coeficiente de correlação de *Spearman*.

C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; ED, evolução da diabetes; GC, gordura corporal; HbA1c, hemoglobina glicosilada; IMC, índice de massa corporal; PA, perímetro abdominal; PAbdo, prega abdominal; PAD, pressão arterial diastólica; PAS, pressão arterial sistólica; Psubsc, prega subescapular; PTric, prega tricípital; Psuprai, prega supraílica. Estatisticamente significativo (p <0,05).

4.10. Polimorfismos genéticos da Hp e sua associação com os parâmetros bioquímicos

Na Tabela 25 são apresentados os resultados da distribuição das frequências dos fenótipos da Hp na população de diabéticos estudada. O fenótipo mais frequente em ambos os grupos foi o 2-1 e o menos frequente o 1-1. Pela aplicação do teste do Qui-quadrado verificou-se que não existiam diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,711$ ) na frequência da distribuição dos três fenótipos da Hp nos dois grupos de diabéticos do tipo 2.

**Tabela 25.** Distribuição das frequências dos fenótipos da Hp nos grupos da população de diabéticos.

Fenótipo	Grupo I (n = 75)	Grupo II (n = 75)
1-1	8 (10,6)	11 (14,6)
2-1	44 (58,7)	44 (58,7)
2-2	23 (30,7)	20 (26,7)
2-1 + 2-2	67 (89,3)	64 (85,3)

Os resultados estão expressos como número de indivíduos e como (percentagem).

Na Tabela 26 são apresentadas as probabilidades de ocorrência associadas aos efeitos resultantes do fenótipo 1-1 da Hp na variação dos parâmetros bioquímicos. Para esse cálculo foi considerado como grupo de referência o grupo II. Nos parâmetros Hcy, Cys e MAD não foi possível avaliar o efeito do fenótipo 1-1 da Hp por não existirem participantes expostos ou não expostos no grupo I. Os valores de OR obtidos para a probabilidade de ocorrência de deficiência plasmática de AA e PLF foram respectivamente, 5,25 e 1,05, ambos não significativos ( $p = 0,107$  e  $p = 0,960$ ).

**Tabela 26.** Efeito do fenótipo 1-1 da Hp na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I	Grupo II	OR	IC (95%)	p
	<i>Fenótipo 1-1 (n = 8)</i>	<i>Fenótipo 1-1 (n = 11)</i>			
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	0/8	2/9	0,00	NA	NA
Cys $> 300 \mu\text{M}$	0/8	1/10	0,00	NA	NA
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	8/0	10/1	NA	NA	NA
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	6/2	4/7	5,25	0,698 - 39,5	0,107
PLF $< 30 \text{ nM}$	3/5	4/7	1,05	0,159 - 6,92	0,960

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; Hp, haptoglobina; MAD, malondialdeído; NA, não aplicável; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*.

Na Tabela 27 estão descritas as probabilidade de ocorrência associada aos efeitos do fenótipo 2-1 da Hp na variação das concentrações dos parâmetros bioquímicos fora da gama de referência. Para esse cálculo foi considerado como grupo de referência o grupo II. O efeito da presença do fenótipo 2-1 da Hp na probabilidade de ocorrência de níveis plasmáticos de Hcy

elevados foi diferente entre os grupos. Verificou-se que o grupo I tinha um OR = 4,19 estatisticamente significativo ( $p = 0,021$ ). Em relação à Cys verificou-se um efeito semelhante com um OR de 4,55 e com um valor de  $p = 0,028$ . Em relação às concentrações de MAD, AA e PLF, os valores de OR obtidos não foram estatisticamente significativos.

**Tabela 27.** Efeito do fenótipo 2-1 da Hp na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I		Grupo II		OR	IC (95%)	$p$
	Fenótipo 2-1 ( $n = 44$ )		Fenótipo 2-1 ( $n = 44$ )				
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	13/31	4/40	4,19	1,24 - 14,1	0,021*		
Cys $> 300 \mu\text{M}$	11/33	3/41	4,55	1,17 - 17,7	0,028*		
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	41/3	42/2	0,651	0,103 - 4,10	0,647		
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	23/21	24/20	0,913	0,395 - 2,11	0,831		
PLF $< 30 \text{ nM}$	13/31	14/30	0,899	0,363 - 2,22	0,817		

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; Hp; haptoglobina; MAD, malondialdeído; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*. \*Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

Na Tabela 28 são apresentadas as probabilidades de ocorrência associadas aos efeitos do fenótipo 2-2 da Hp na variação dos parâmetros bioquímicos. Para esse cálculo foi considerado como grupo de referência o grupo II. O efeito da presença do fenótipo 2-2 da Hp na probabilidade de ocorrência de níveis plasmáticos de Hcy elevados para o grupo I não foi calculada porque no grupo II não foi observado a presença de hiperhomocisteinemia em nenhum participante. Em relação à Cys foi obtido um OR de 0,857 com um IC95% de 0,109 - 6,72 e um valor de  $p = 0,883$ . O efeito da presença do fenótipo 2-2 da Hp na elevação dos níveis séricos do MAD não foi diferente entre os dois grupos, tendo sido obtido um OR = 2,44 não significativo ( $p = 0,480$ ). Os valores de OR obtidos para a probabilidade de ocorrência de deficiência plasmática de AA e PLF foram respectivamente, 2,03 e 1,50, ambos não significativos ( $p = 0,261$  e  $p = 0,532$ ).

**Tabela 28.** Efeito do fenótipo 2-2 da Hp na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I		Grupo II		OR	IC (95%)	$p$
	Fenótipo 2-2 ( $n = 23$ )		Fenótipo 2-2 ( $n = 20$ )				
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	2/21	0/20	NA	NA	NA		
Cys $> 300 \mu\text{M}$	2/21	2/18	0,857	0,109 - 6,72	0,883		
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	22/1	18/2	2,44	0,205 - 29,1	0,480		
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	12/11	7/13	2,03	0,592 - 6,93	0,261		
PLF $< 30 \text{ nM}$	9/14	6/14	1,50	0,421 - 5,35	0,532		

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; Hp, haptoglobina; MAD, malondialdeído; NA, não aplicável; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*.

Na Tabela 29 estão descritos os resultados da avaliação da probabilidade de ocorrência associada ao efeito combinado dos fenótipos 2-1 e 2-2 da Hp na variação das concentrações dos parâmetros bioquímicos. O grupo II foi considerado o grupo de referência. O efeito combinado da presença dos fenótipos 2-1 e 2-2 da Hp na probabilidade de ocorrência de níveis plasmáticos de Hcy elevados no grupo I foi de 4,33 com um intervalo de confiança de 1,35-13,9 e um valor de  $p = 0,014$ . Para a Cys foi obtido um OR de 2,84 sem significância estatística ( $p = 0,062$ ), embora se tenha verificado uma tendência para a ocorrência, visto que, o valor de  $p$  obtido foi marginal. Os valores de OR obtidos para o MAD, AA e PLF foram respectivamente 1,05; 1,16 e 1,08. Para estes três compostos não foram obtidas significâncias estatísticas nos valores de OR calculados.

**Tabela 29.** Efeito combinado dos fenótipos 2-1 e 2-2 da Hp na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I		Grupo II		OR	IC (95%)	$p$
	Fenótipos 2-1 + 2-2 ( $n = 67$ )		Fenótipos 2-1 + 2-2 ( $n = 64$ )				
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	15/52		4/60		4,33	1,35 - 13,9	0,014*
Cys $> 300 \mu\text{M}$	13/54		5/59		2,84	0,950 - 8,50	0,062
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	63/4		60/4		1,05	0,251 - 4,39	0,947
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	35/32		31/33		1,16	0,587 - 2,31	0,664
PLF $< 30 \text{ nM}$	22/45		20/44		1,08	0,516 - 2,24	0,846

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; Hp, haptoglobina; MAD, malondialdeído; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*. \*Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

#### 4.11. Polimorfismo C677T da enzima MTHFR e sua associação com os parâmetros bioquímicos

Na Tabela 30 são apresentados os resultados da distribuição das frequências genóticas do polimorfismo C677T da MTHFR na população diabética estudada. Para o grupo I, os fenótipos CC ( $n = 32$ ) e CT ( $n = 32$ ) foram os mais frequentes. Para o grupo II, o fenótipo mais frequente foi o CC ( $n = 34$ ). Pela aplicação do teste do Qui-quadrado verificou-se que não existiam diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,788$ ) na frequência da distribuição dos três fenótipos do polimorfismo C677T da MTHFR nos dois grupos de diabéticos do tipo 2.

**Tabela 30.** Distribuição das frequências genotípicas do polimorfismo C677T da MTHFR nos grupos da população de diabéticos.

Genótipo	Grupo I (n = 69)	Grupo II (n = 65)
CC	32 (46,4)	34 (52,3)
CT	32 (46,4)	27 (41,5)
TT	5 (7,2)	4 (6,2)
CT + TT	37 (53,6)	31 (47,7)
CC + CT	64 (92,7)	61 (93,8)

Os resultados estão expressos como número de indivíduos e (percentagem).

Na Tabela 31 é avaliado o efeito do genótipo CC do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos. O valor de OR obtido para a probabilidade de elevação dos níveis plasmáticos de Hcy tendo o genótipo CC foi 2,29 vezes superior no grupo I em relação ao grupo II, no entanto a significância do cálculo do OR não foi estatisticamente relevante ( $p = 0,360$ ). Em relação à Cys, o valor de OR foi de 1,91 mas sem significância estatística ( $p = 0,403$ ). Para o MAD o OR obtido foi 1,29 com um IC95% de 0,265 a 6,27 e com o valor de  $p = 0,753$ . Em relação à probabilidade de ocorrência de baixos níveis de AA e PLF no grupo I em relação ao grupo II, os valores de OR foram respectivamente 2,15 e 2,45 mas sem significância estatística.

**Tabela 31.** Efeito do genótipo CC do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I		Grupo II		OR	IC (95%)	$p$
	Genótipo CC (n = 32)		Genótipo CC (n = 34)				
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	4/28		2/32		2,29	0,389 - 13,4	0,360
Cys $> 300 \mu\text{M}$	5/27		3/31		1,91	0,418 - 8,76	0,403
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	29/3		30/4		1,29	0,265 - 6,27	0,753
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	21/11		16/18		2,15	0,796 - 5,80	0,131
PLF $< 30 \text{ nM}$	15/17		9/25		2,45	0,874 - 6,87	0,088

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; MAD, malondialdeído; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*.

Na Tabela 32 estão descritos os resultados da avaliação do efeito do genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação das concentrações dos parâmetros bioquímicos. Os valores de OR obtidos no grupo I para a Hcy e Cys foram idênticos, correspondendo a uma probabilidade de ocorrência de 4,17 vezes superior no grupo I em relação ao grupo II, um intervalo de confiança de 0,802 a 21,6 e um valor de  $p = 0,089$ . Em relação ao MAD, foi obtido um valor de OR de 1,19 não significativo ( $p = 0,903$ ). Em relação à probabilidade de ocorrência

## Resultados

de baixos níveis de AA e PLF no grupo I em relação ao grupo II, os valores de OR foram respectivamente 1,10 e 0,567 mas sem significância estatística.

**Tabela 32.** Efeito do genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I		Grupo II		OR	IC (95%)	p
	Genótipo CT (n = 32)		Genótipo CT (n = 27)				
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	8/24		2/25		4,17	0,802 - 21,6	0,089
Cys $> 300 \mu\text{M}$	8/24		2/25		4,17	0,802 - 21,6	0,089
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	31/1		26/1		1,19	0,071 - 20,0	0,903
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	15/17		12/15		1,10	0,394 - 3,09	0,852
PLF $< 30 \text{ nM}$	8/24		10/17		0,567	0,185 - 1,73	0,320

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; MAD, malondialdeído; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*.

Na Tabela 33 constam os resultados da avaliação do efeito do genótipo TT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos. Para esse cálculo foi considerado como grupo de referência o grupo II. Para os parâmetros Hcy, Cys, MAD e AA não foi possível calcular o OR por falta de participantes expostos ou não expostos nos grupos I ou/e II. Para o PLF foi obtido um valor de OR de 0,750 sem significância estatística ( $p = 0,858$ ).

**Tabela 33.** Efeito do genótipo TT do polimorfismo C677T da MTHF na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I		Grupo II		OR	IC (95%)	p
	Genótipo TT (n = 5)		Genótipo TT (n = 4)				
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	2/3		0/4		NA	NA	NA
Cys $> 300 \mu\text{M}$	0/5		0/4		NA	NA	NA
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	5/0		4/0		NA	NA	NA
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	3/2		2/0		0,00	NA	NA
PLF $< 30 \text{ nM}$	1/4		1/3		0,750	0,032 - 17,5	0,858

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; MAD, malondialdeído; NA, não aplicável; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*.

Na Tabela 34 são apresentados os resultados da avaliação do efeito combinado dos genótipos CC e CT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação das concentrações dos parâmetros bioquímicos. A probabilidade de ocorrência de valores elevados de Hcy no grupo I em relação ao grupo II para a combinação dos genótipos CC e CT foi 3,29, sendo este valor de OR não significativo ( $p = 0,050$ ) mas marginal demonstrando que existe uma tendência. Em relação à Cys foi obtido um OR = 2,85 não significativo ( $p = 0,061$ ). Para o MAD, o valor de OR foi 1,33 com um valor de  $p = 0,674$ . A probabilidade de ocorrência de baixos níveis de AA e PLF no

grupo I em relação ao grupo II, foi 1,52 vezes superior para o AA e 1,24 vezes superior para o PLF, no entanto, ambos os valores de OR não foram estatisticamente significativos.

**Tabela 34.** Efeito combinado dos genótipos CC e CT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I		Grupo II		OR	IC (95%)	p
	Genótipo CC + CT (n = 64)		Genótipo CC + CT (n = 61)				
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	12/52	4/57	3,29	0,998 - 10,8	0,050		
Cys $> 300 \mu\text{M}$	13/51	5/56	2,85	0,951 - 8,57	0,061		
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	60/4	56/5	1,33	0,342 - 5,24	0,674		
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	36/28	28/33	1,52	0,749 - 3,07	0,248		
PLF $< 30 \text{ nM}$	23/41	19/42	1,24	0,589 - 2,61	0,571		

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; MAD, malondialdeído; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*.

Na Tabela 35 estão descritos os resultados da avaliação do efeito combinado dos genótipos CT e TT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação das concentrações dos parâmetros bioquímicos. A probabilidade de ocorrência de valores elevados de Hcy no grupo I em relação ao grupo II para a combinação dos genótipos CT e TT foi 5,37 com um valor de p associado de 0,040. Em relação à Cys foi obtido um OR = 4,00 não significativo (p = 0,096). Para o MAD o valor de OR obtido foi 1,20 com um IC95% (0,072 - 20,0) e um valor de p = 0,899. A probabilidade de ocorrência de baixos níveis de AA e PLF no grupo I em relação ao grupo II, foi 0,592 vezes inferior para o AA e 0,584 vezes inferior para o PLF, no entanto, ambos os valores de OR não foram estatisticamente significativos (p = 0,260 e p = 0,317, respectivamente).

**Tabela 35.** Efeito combinado dos genótipos CT e TT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I		Grupo II		OR	IC (95%)	p
	Genótipo CT + TT (n = 37)		Genótipo CT + TT (n = 31)				
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	10/27	2/29	5,37	1,08 - 26,8	0,040*		
Cys $> 300 \mu\text{M}$	8/29	2/29	4,00	0,782 - 20,5	0,096		
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	36/1	30/1	1,20	0,072 - 20,0	0,899		
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	18/19	24/15	0,592	0,238 - 1,47	0,260		
PLF $< 30 \text{ nM}$	9/28	11/20	0,584	0,204 - 1,67	0,317		

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; MAD, malondialdeído; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*. \*Estatisticamente significativo (p < 0,05).

#### 4.12. Combinação dos polimorfismos genéticos da Hp e do C677T da enzima MTHFR e sua associação com os parâmetros bioquímicos

Na Tabela 36 são apresentados os resultados da avaliação do efeito combinado do fenótipo 2-2 da Hp com o genótipo TT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação das concentrações dos parâmetros bioquímicos na população diabética avaliada. O efeito da presença combinada do fenótipo 2-2 da Hp e do genótipo TT da MTHFR na probabilidade de ocorrência de hiperhomocisteinemia no grupo I não foi calculada porque no grupo II não foi observado a presença de hiperhomocisteinemia em nenhum participante. Em relação à Cys o valor de OR para o grupo I foi inferior a 1,00. No entanto, o valor de p obtido não foi estatisticamente significativo ( $p = 0,873$ ). O valor de OR obtido para o MAD foi 2,46 associado a um valor de  $p = 0,475$ . A probabilidade de ocorrência de baixos níveis de AA e PLF no grupo I em relação ao grupo II, foi 1,66 vezes superior para o AA e 1,35 vezes superior para o PLF, no entanto, ambos os valores de OR não foram estatisticamente significativos.

**Tabela 36.** Efeito combinado do fenótipo 2-2 da Hp com o genótipo TT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I		Grupo II		OR	IC (95%)	p
	Fenótipo 2-2 + Genótipo TT (n = 28)		Fenótipo 2-2 + Genótipo TT (n = 24)				
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	4/24		0/24		0,00	NA	NA
Cys $> 300 \mu\text{M}$	2/26		2/22		0,846	0,110 - 6,51	0,873
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	27/1		22/2		2,46	0,209 - 28,9	0,475
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	15/13		9/13		1,66	0,539 - 5,15	0,375
PLF $< 30 \text{ nM}$	10/18		7/17		1,35	0,418 - 4,35	0,616

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; MAD, malondialdeído; NA, não aplicável; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*.

Na Tabela 37 estão descritas as probabilidades de ocorrência associadas ao efeito combinado do fenótipo 2-2 da Hp com o genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação das concentrações dos parâmetros bioquímicos. A probabilidade de ocorrência de valores elevados de Hcy no grupo I em relação ao grupo II para a combinação do genótipo 2-2 da Hp com o genótipo CT da MTHFR foi de 5,00 com um IC95% (1,04 - 24,1) e um valor de p associado de 0,045. Em relação à Cys foi obtido um OR de 2,38, não significativo ( $p = 0,166$ ). Para o MAD foi obtido um valor de OR não significativo ( $p = 0,527$ ) de 1,81. A probabilidade de ocorrência de baixos níveis de AA e PLF no grupo I em relação ao grupo II, foi 0,931 vezes inferior para o AA e 0,867 vezes inferior para o PLF, no entanto, ambos os valores de OR não foram estatisticamente significativos ( $p = 0,850$  e  $p = 0,736$ , respectivamente).

**Tabela 37.** Efeito combinado do fenótipo 2-2 da Hp com o genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I		Grupo II		OR	IC (95%)	p
	Fenótipo 2-2 + Genótipo CT (n = 53)		Fenótipo 2-2 + Genótipo CT (n = 47)				
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	10/45		2/45		5,00	1,04 - 24,1	0,045*
Cys $> 300 \mu\text{M}$	10/45		4/43		2,38	0,697 - 8,19	0,166
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	53/2		44/3		1,81	0,289 - 11,3	0,527
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	27/28		29/28		0,931	0,444 - 1,95	0,850
PLF $< 30 \text{ nM}$	17/38		16/31		0,867	0,378 - 1,99	0,736

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; MAD, malondialdeído; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*. \*Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

Na Tabela 38 são apresentados os resultados da avaliação do efeito combinado do fenótipo 2-1 da Hp com o genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação das concentrações dos factores bioquímicos. Para as concentrações plasmáticas da Hcy foi obtido um OR de 4,14 com um IC95% (1,56 - 11,0) e um valor de p estatisticamente significativo a 99% de confiança. Em relação à Cys foi também verificada uma probabilidade de ocorrência de níveis plasmáticos de Cys 4,40 vezes superior no grupo I em relação ao grupo II, estando este valor associado a um valor de  $p = 0,006$ . No que diz respeito aos níveis séricos de MAD a probabilidade de ocorrência foi menor no grupo I quando comparada com o II, mas o valor de OR obtido não foi estatisticamente significativo ( $p = 0,768$ ). A probabilidade de ocorrência de baixos níveis de AA e PLF no grupo I em relação ao grupo II, foi 1,32 vezes superior para o AA e 0,748 vezes inferior para o PLF, no entanto, ambos os valores de OR não foram estatisticamente significativos.

**Tabela 38.** Efeito combinado do fenótipo 2-1 da Hp com o genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR na variação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	Grupo I		Grupo II		OR	IC (95%)	p
	Fenótipo 2-1 + Genótipo CT (n = 76)		Fenótipo 2-1 + Genótipo CT (n = 71)				
	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos	Expostos / Não expostos			
Hcy $\geq 15 \mu\text{M}$	21/55		6/65		4,14	1,59 - 11,0	0,004*
Cys $> 300 \mu\text{M}$	19/57		5/66		4,40	1,54 - 12,5	0,006*
MAD $> 1,71 \mu\text{M}$	72/4		68/3		0,794	0,171 - 3,68	0,768
AA $< 4,0 \mu\text{g/mL}$	38/28		36/35		1,32	0,672 - 2,59	0,420
PLF $< 30 \text{ nM}$	21/55		24/47		0,748	0,370 - 1,51	0,418

AA, ácido ascórbico; Cys, cisteína; IC, intervalo de confiança; Hcy, homocisteína; MAD, malondialdeído; PLF, piridoxal-5-fosfato; OR, *Odd ratio*. \*Estatisticamente significativo ( $p < 0,01$ ).



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação nutricional

A percentagem de GC está fortemente relacionada com o risco de aparecimento de doenças crónicas como a DMT2 e a DCV. A avaliação do IMC, do PA e a utilização de equações antropométricas são métodos amplamente utilizados nos estudos epidemiológicos em que é realizada a avaliação nutricional da população estudada. No entanto, o IMC e o PA não permitem determinar a percentagem de GC e a aplicação de equações antropométricas não permite conhecer a composição corporal. Vários métodos de referência têm vindo a ser utilizados para determinar a percentagem de GC, entre eles, a densitometria, o *Dual energy X-ray absorptiometry* e a ressonância magnética (345). No entanto, estas técnicas são muito dispendiosas, morosas e com limitações de mobilidade porque requerem a utilização de equipamentos especializados que não são facilmente transportáveis. Por estes motivos a utilização de métodos de referência em estudos epidemiológicos é limitada.

A BIA é um método não-invasivo, indolor, livre de radiação, rápido, seguro e simples, capaz de estimar clinicamente a composição corporal de forma fiável e com excelente reprodutividade em medições repetidas (erro <1%) (346). O aparelho necessário é relativamente barato, portátil e por ser de pequeno porte, pode ser facilmente transportado para ser utilizado em diferentes locais. Todas estas características tornam a BIA uma boa opção para avaliar a composição corporal em estudos epidemiológicos.

De acordo com o conhecimento actual, não estão disponíveis em Portugal dados epidemiológicos de comparação de diferentes métodos de avaliação da GC em diabéticos do tipo 2 (com e sem complicações) e não diabéticos. Este estudo permitiu avaliar o estado nutricional através da aplicação e comparação de diversos métodos e simultaneamente verificar a presença de possíveis diferenças entre os diabéticos do tipo 2 com e sem complicações angiopáticas e os não diabéticos. Os resultados da percentagem de GC obtidos pela aplicação das equações antropométricas utilizadas foram comparados com os resultados obtidos pelo método de BIA. As nove equações antropométricas foram escolhidas com base na sua utilização clínica e epidemiológica para estimar a GC em adultos. A variabilidade das medições repetidas de GC obtida com o equipamento de BIA utilizado está de acordo com a variabilidade descrita na literatura (347). De uma forma global, as equações de Deurenberg (1998) e Gallagher foram as que permitiram obter os valores médios de GC próximos dos valores obtidos pelo método de BIA e que simultaneamente apresentaram menor variabilidade entre as medições. Com a aplicação das equações de Lohman e Faulkner foram obtidos valores médios de percentagens de CG muito inferiores (20,0% e 17,5%, respectivamente) aos valores obtidos pelo método de BIA. Todas as outras equações antropométricas utilizadas também subestimaram a percentagem de GC quando comparadas com o método de BIA, a excepção foi a equação de Deurenberg (1991) para a qual foi obtido um valor médio de

percentagem de GC superior em 2% à média obtida pelo método de BIA. Importa ainda referir que neste estudo não foi possível validar o método de BIA por comparação com um método de referência por dois motivos: incapacidade financeira para aquisição dos equipamentos requeridos e simultaneamente por não existirem nos locais onde foi realizado o recrutamento dos participantes. No entanto, estão descritos alguns estudos na literatura científica nos quais o método de BIA foi aplicado em diabéticos e validado pela comparação com métodos de referência (348,349). Em ambos os casos, verificou-se que não existiam diferenças significativas entre a percentagem de GC obtida pelos dois métodos. Em relação à avaliação da MM e da ACT em diabéticos do tipo 2 pela aplicação do método de BIA, diversos autores evidenciaram algumas discrepâncias entre os resultados obtidos por este método e pelos métodos de referência em programas de perda de peso, visto que, o método BIA tem como princípio de cálculo uma hidratação constante da MM nos indivíduos avaliados, algo que não é real quando se perde peso, pelo que, os resultados apresentados para os participantes diabéticos devem ser considerados com alguma precaução, embora neste caso não sejam comparadas avaliações de BIA antes e após a perda de peso dos participantes. Em relação à percentagem de MM determinada pela aplicação do método de BIA, verificou-se que era muito similar entre os três grupos (grupo I: 62,4% vs. grupo II: 62,3% vs. grupo III: 62,4%) e que os resultados obtidos para os grupos dos diabéticos foram semelhantes aos observados (64,8%) por Ritz *et al.* (2007) no estudo de comparação de diferentes métodos para avaliação da composição corporal realizado em diabéticos do tipo 2 e obesos integrados num programa de perda de peso. A aplicação do método de BIA permitiu também avaliar a percentagem de ACT, verificando-se que existia uma prevalência muito elevada de desidratação em todos os grupos (>55%). Considerando que, os resultados obtidos nos diabéticos devem ser analisados com alguma precaução pela alteração de osmolaridade característica da sua doença crónica, o valor obtido para os não diabéticos (58,4%) é preocupante e evidência uma inadequada hidratação, confirmada posteriormente pelos resultados da aplicação do QFA. O resultado obtido para o grupo dos não diabéticos foi uma ingestão média diária de água de cerca de um 1 L, um valor muito inferior às recomendações da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar que recomenda um consumo diário de água de 2 L para as mulheres e de 2,5 L para os homens (350).

Para avaliar a concordância de resultados entre as equações antropométricas e o método BIA foi efectuada uma análise de *Bland-Altman* (328) e aplicado o critério de Lohman (329). A aplicação destes dois critérios permitiu verificar que as equações de Deurenberg (1991), Deurenberg (1998), Gallagher e do estudo Heritage satisfaziam todos os aspectos avaliados e que por isso os seus resultados foram considerados concordantes com os do método BIA. De acordo com estes resultados as equações de Deurenberg (1991), Deurenberg (1998), Gallagher e do estudo Heritage foram consideradas as mais adequadas para utilizar em estudos epidemiológicos futuros em adultos diabéticos do tipo 2 ou não diabéticos quando não

for possível a utilização de métodos de referência ou do método BIA. No entanto, os resultados obtidos pela análise de *Bland-Altman* devem ser avaliados com algum cuidado, já que, em algumas equações antropométricas, embora mais de 95% dos resultados individuais da percentagem de GC obtidos estarem dentro dos limites estabelecidos e a gama desses limites ser aceitável, o ET do método antropométrico é muito elevado.

O critério de Lohman (329) foi também utilizado para avaliar a concordância entre os resultados da percentagem de GC obtidos pela aplicação das equações antropométricas e pelo método de BIA. A Utilização do critério de Lohman permitiu fazer uma avaliação mais realista do que a análise de *Bland-Altman* em relação à concordância dos resultados de percentagem de GC obtidos entre as equações antropométricas e o método de BIA. Assim, verificou-se que as equações de Deurenberg (1991), Deurenberg (1998), Gallagher, Jackson & Pollock e do estudo Heritage estavam fortemente correlacionadas ( $r \geq 0,8$ ) com o método de BIA e que tinham uma exactidão aceitável, apresentando um ET inferior a 2% em relação ao BIA.

De acordo com a análise de Bland-Altman e o critério de Lohman, a equação de Deurenberg (1998) demonstrou ser a equação antropométrica mais adequada para avaliar a percentagem de GC, em adultos Caucasianos com ou sem diabetes do tipo 2, já que, a referida equação evidenciou uma concordância com todos os critérios estabelecidos e permitiu obter um ET médio de 0,04 quando comparado com o método de BIA.

A prevalência de obesidade foi avaliada por três metodologias: IMC, PA e percentagem de GC. De acordo com os resultados do IMC, a prevalência de obesidade nos diabéticos do tipo 2 foi superior ao dobro do que a obtida nos indivíduos não diabéticos (grupo III). Esta observação está de acordo com o verificado na literatura (351-354). Apesar disso, a prevalência de excesso de peso no grupo III (não diabéticos) foi de 40,5%. A obesidade abdominal verificada foi elevada para todos os grupos estudados, mas a prevalência verificada para os diabéticos (grupos I e II) foi cerca de 20% superior quando comparada com a dos não diabéticos (grupo III). A prevalência de obesidade avaliada pela percentagem de GC foi comparada pelo método de BIA e pelos três tipos de equações antropométricas aplicadas que tiveram maior concordância com o método de BIA. Assim, para todos os grupos e em ambos os géneros, a prevalência de obesidade calculada pelo método de BIA foi superior a 70%. Nos diabéticos, a obesidade foi mais frequente nos homens do que nas mulheres, mas nos indivíduos não diabéticos verificou-se o contrário. Para os grupo I e III, os resultados da prevalência de obesidade pela avaliação da percentagem de GC foram semelhantes entre a aplicação da equação de Deurenberg (1998) (grupo I: 88,0% vs. 71,3%) e do método de BIA (87,1% vs. 76,1%). No grupo II, a equação de Gallagher foi a que permitiu obter um prevalência de excesso de GC (86,7%) mais próxima da obtida pelo método de BIA (83,6%). As equações de Boileau e de Siri foram também utilizadas para avaliar a prevalência de obesidade pela avaliação da percentagem GC, no entanto a prevalência de obesidade obtida foi para todos os grupos foi muito inferior à verificada pelo método BIA. É ainda importante referir que, embora a

prevalência de obesidade calculada pela avaliação do IMC para os indivíduos não diabéticos (grupo III) tenha sido cerca de 17%, essa frequência foi extremamente elevada (76,1%) quando o critério de avaliação utilizado foi o excesso de GC. Em relação aos diabéticos foram também observadas diferenças relevantes entre a prevalência de obesidade avaliada pelo critério do IMC e pelo excesso de GC. Uma possível explicação para este facto é que existe uma fraca relação entre o IMC e a percentagem de GC, já que, uma proporção elevada dos participantes com peso normal (grupo I: 8,1% vs. grupo II: 2,7% vs. grupo III: 20%) ou excesso de peso (grupo I: 30% vs. grupo II: 41% vs. grupo III: 59%), tinha uma percentagem de GC acima do valor recomendado pela OMS. Esta justificação está de acordo com os resultados obtidos por Meeuwssen *et al.* num estudo epidemiológico realizado no Reino Unido numa grande amostra populacional de adultos (23627), onde foi observada uma associação fraca e não linear entre o IMC e a percentagem de GC calculada pelo método de BIA (355).

Os resultados obtidos para a percentagem de GC apresentados neste trabalho de investigação estão de acordo com os resultados publicados por outros autores para diabéticos do tipo 2 (349,356,357).

## 5.2. Caracterização dos hábitos alimentares

Neste trabalho de investigação foram avaliados e comparados os hábitos alimentares de dois grupos de diabéticos do tipo 2 (com e sem angiopatia) e de um grupo de não diabéticos pela aplicação de um QFA previamente validado para a população adulta Portuguesa (313). Optou-se por este método de avaliação do consumo alimentar individual porque é um método rápido, barato e fácil de utilizar, não altera a ingestão habitual e permite obter uma elevada taxa de resposta (119,358). Um período de avaliação dos hábitos alimentares dos últimos 12 meses dos participantes permitiu considerar o efeito da sazonalidade da ingestão alimentar, contemplando assim, a variabilidade intraindividual. No entanto o QFA foi aplicado apenas uma única vez, algo que fez aumentar a variabilidade intraindividual da ingestão estimada, mas que neste estudo não comprometeu a possibilidade de mesmo assim serem observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados.

A ingestão média diária de calorias foi superior nos diabéticos do tipo 2 com angiopatia comparativamente com os não diabéticos, mas não diferiu entre os dois grupos de diabéticos. No que diz respeito à ingestão diária de macronutrientes, a ingestão média de proteína foi superior nos diabéticos do tipo 2 (grupos I e II) em relação aos não diabéticos. Não se verificaram diferenças na ingestão média diária de hidratos de carbono e a ingestão média de gordura total foi apenas diferente entre os diabéticos com angiopatia e os não diabéticos, sendo essa ingestão superior nos primeiros.

Em Portugal, é escassa a informação sobre o consumo alimentar individual em amostras aleatórias de diabéticos do tipo 2 na população Portuguesa. Assim, os resultados da ingestão média diária de macronutrientes e o seu contributo percentual para a ingestão energética total

obtidos no nosso estudo foram comparados com o estudo de Castro (359) para os participantes diabéticos e com a informação proveniente do estudo EpiPorto (360) para os não diabéticos. No estudo de Castro (359) os valores médios de ingestão de macronutrientes foram apresentados em separado para homens e mulheres e no estudo do EpiPorto os resultados dos participantes são apresentados por percentis e valores médios de ingestão estratificados por idades. Para que as comparações fossem realizadas da forma mais correcta possível, os valores médios obtidos no nosso estudo para os não diabéticos (grupo III) foram comparados com as médias dos valores apresentados no estudo do EpiPorto para ambos os géneros e nos estratos de idade dos 50 aos 64 e  $\geq 65$  anos. Em relação aos diabéticos optou-se por realizar a média entre os valores de ingestão média diária descritos no estudo de Castro (359) para os homens e mulheres. Em relação à ingestão média calórica verificou-se que tanto para os diabéticos (grupo I: 1704 kcal vs. grupo II: 1607 kcal) como para os não diabéticos (grupo III: 1492 kcal) os valores do nosso estudo foram inferiores aos obtidos nos estudos de Castro (359) (2011 kcal) e do EpiPorto (2118 kcal). O contributo médio percentual de cada macronutriente e do etanol para a ingestão energética diária foi comparado com os resultados de outros estudos. Os resultados apresentados neste estudo para os diabéticos em relação à proteína (grupo I: 19,0% vs. grupo II: 19,0%) foram semelhantes ao descrito por Castro (359) (19,4%), mas para os não diabéticos (grupo III), o valor obtido foi inferior (17,7%) ao observado no estudo do EpiPorto (18,4%). Em relação aos hidratos de carbono totais, os resultados obtidos no nosso estudo para ambos os grupos de diabéticos (grupo I: 47,9% vs. grupo II: 47,8%) foram ligeiramente superiores aos valores observados por Castro (359) (46,2%), já o resultado do grupo III (50,9%) foi semelhante ao obtido no EpiPorto (49,6%). Para a gordura total verificou-se que os valores obtidos para os grupos I (33,0%) e II (32,5%) foram ligeiramente inferiores aos descritos por Castro (359) (33,9%). No grupo III (31,6%) o contributo médio percentual da gordura total para a ingestão energética total diária foi 3,4% superior ao obtido no estudo EpiPorto (28,2%). Em relação ao etanol verificou-se um maior contributo percentual (5,7%) na população do estudo EpiPorto do que no grupo III deste estudo (2,6%), no entanto no que diz respeito aos dois grupos de diabéticos do nosso estudo (grupo I: 2,3% vs. grupo II: 3,1%) os valores foram mais próximos do percentual (2,5%) obtido por Castro (359).

Os constituintes da gordura total foram também avaliados individualmente. Assim, observou-se que os diabéticos com angiopatia tinham uma ingestão média diária de gordura monoinsaturada e de EPA superior aos não diabéticos mas o mesmo não se verificou entre os diabéticos sem angiopatia e os não diabéticos. A ingestão de gordura saturada, colesterol, ácido linolénico, ácidos gordos *trans*, ácidos gordos ómega-3 e o DHA foi inferior no grupo dos não diabéticos comparativamente com os dois grupos de diabéticos.

A ingestão média de água por dia foi inferior (grupo I: 1,244 L vs. grupo II: 1,235 L vs. grupo III: 1,024 L) aos valores recomendados pela *European Food Safety Authority* (350) em todos os

grupos, no entanto, o valor médio verificado para o grupo dos não diabéticos foi o mais baixo diferindo significativamente dos outros dois.

Em relação à ingestão de aminoácidos específicos envolvidos no metabolismo da Hcy, observou-se uma ingestão mais elevada de metionina nos dois grupos de diabéticos (grupo I: 1,76 g/dia vs. grupo II: 1,67 g/dia) do que nos não diabéticos (grupo III: 1,40 g/dia). A ingestão de cistina foi apenas significativamente superior nos diabéticos com angiopatia (grupo I: 0,926 g/dia) em relação aos não diabéticos (grupo III: 0,790 g/dia). Verificou-se também que a maior ingestão destes aminoácidos nos diabéticos estava positivamente associada com os níveis plasmáticos de Hcy e Cys. Algo que poderá aumentar o risco de aparecimento e/ou progressão de DCV nos diabéticos. A ingestão média diária dos aminoácidos glicina e lisina foi também avaliada entre os grupos estudados. A ingestão destes dois aminoácidos foi significativamente superior nos dois grupos de diabéticos em relação ao grupo dos não diabéticos. A lisina e glicina são aminoácidos envolvidos nas vias de formação de produtos de glicação avançada e uma maior ingestão destes aminoácidos promove a formação dos AGEs, o *stress* oxidante e a inflamação. Esta maior ingestão verificada para os grupos I e II associada ao facto dos participantes desses grupos serem diabéticos favorece ainda mais o mecanismo associado à glicação avançada.

A ingestão média diária de micronutrientes foi também avaliada e comparada entre os grupos estudados. A ingestão de vitaminas B<sub>12</sub> e K, ácido pantoténico, biotina, cálcio, potássio, sódio e cloro foi significativamente superior nos diabéticos tipo 2 comparativamente aos não diabéticos. A ingestão de boro foi estatisticamente superior nos diabéticos com angiopatia do que nos diabéticos sem angiopatia e nos não diabéticos. A ingestão de tiamina, riboflavina, vitamina D, fósforo, zinco, iodo e molibdénio foi significativamente superior nos diabéticos com angiopatia quando comparada com os não diabéticos. A ingestão média diária de retinol, carotenóides, niacina e seus equivalentes, vitaminas B<sub>6</sub>, C e E, folatos, cobre, ferro magnésio, manganésio e selénio foi semelhante para todos os grupos. De uma forma geral a ingestão média de micronutrientes foi superior nos diabéticos do que nos não diabéticos. As diferenças encontradas foram maioritariamente superiores entre os diabéticos tipo 2 com angiopatia e os não diabéticos, algo que poderá ser justificado pelo facto de que a ingestão média de calorias foi cerca de 200 kcal superior nos diabéticos com angiopatia do que nos não diabéticos e a estimativa de ingestão de nutrientes é feita com base na ingestão energética diária (361).

Os valores de ingestão média de micronutrientes obtidos foram comparados com os dos estudos EpiPorto, com o relatório científico publicado em 2012 no âmbito do projecto *LiveWell* for LIFE (362), com o inquérito de consumo alimentar Holandês 2007-2010 (363) para os participantes não diabéticos e com o estudo de Castro (359) para os diabéticos tipo 2.

A ingestão média diária das vitaminas E, D, tiamina, riboflavina, niacina e seus equivalentes, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, ácido pantoténico e ácido fólico foi superior no estudo do EpiPorto em relação aos resultados obtidos neste estudo. As maiores diferenças foram observadas para a ingestão de

vitaminas tiamina (1,7 mg/dia vs. 1,26 mg/dia), riboflavina (1,9 mg/dia vs. 1,59 mg/dia), niacina e seus equivalentes (20,9 mg/dia vs. 16,5 mg/dia), B<sub>6</sub> (2,0 mg/dia vs. 1,67 mg/dia) e vitamina C (118,8 mg/dia vs. 112 mg/dia). Em relação à ingestão média diária de minerais verificou-se também que os valores médios de ingestão de cálcio, ferro, magnésio, potássio, sódio e fósforo foram superiores aos valores obtidos neste estudo, tendo sido observado que as maiores diferenças foram entre ingestão de sódio (3487,3 mg/dia vs. 2540 mg/dia) e a ingestão de potássio (3555,6 mg/dia vs. 2711 mg/dia).

A ingestão média de micronutrientes obtida para os não diabéticos (grupo III) foi também comparada com os valores descritos no relatório científico publicado em 2012 no âmbito do projecto *LiveWell for LIFE* (362). No referido relatório são apresentados resultados resumidos da ingestão média de micronutrientes para a população Francesa, obtidos a partir do estudo Individual e Nacional do Consumo Alimentar 2006-2007 (362). Para que a comparação fosse efectuada da forma mais adequada foi previamente calculada para cada vitamina e mineral a média dos valores descritos para homens e mulheres. Assim, verificou-se que a ingestão média diária das vitaminas A, E, riboflavina, niacina e seus equivalentes, B<sub>6</sub>, ácido pantoténico e ácido fólico foi superior no estudo INCA2 quando comparada com a ingestão média obtida no nosso estudo para o grupo III. As maiores diferenças de ingestão foram verificadas entre os valores médios da vitamina A (706 µg/dia vs. 418 µg/dia), vitamina E (11,5 mg/dia vs. 7,38 mg/dia), niacina e seus equivalentes (18,9 mg/dia vs. 16,5 mg/dia), ácido pantoténico (129 mg/dia vs. 112 mg/dia) e ácido fólico (288 µg/dia vs. 265 µg/dia). No entanto a ingestão média de vitamina C foi muito inferior no grupo populacional do estudo INCA2 do que no grupo III do nosso estudo (92,8 mg/dia vs. 112 mg/dia). As ingestões médias de tiamina (1,2 mg/dia vs. 1,3 mg/dia), vitamina B<sub>12</sub> (5,80 µg/dia vs. 6,26 µg/dia) e vitamina D (2,55 µg/dia vs. 2,79 µg/dia) foram semelhantes nos dois estudos. Em relação à ingestão média de minerais observou-se uma maior ingestão para o cálcio, fósforo, potássio, sódio, ferro, zinco, cobre e iodo. As maiores diferenças de ingestão foram observadas para o cálcio (917 mg/dia vs. 794 mg/dia), potássio (2984 mg/dia vs. 2711 mg/dia), sódio (2990 mg/dia vs. 2540 mg/dia), fósforo (1275 mg/dia vs. 1120 mg/dia) e iodo (126 µg/dia vs. 69,1 µg/dia). Já a ingestão média diária de magnésio (295 mg/dia) e manganésio (3,57 µg/dia) foi ligeiramente superior no nosso estudo quando comparada com os valores descritos no estudo INCA2 (magnésio: 293 mg/dia; manganésio: 2,9 µg/dia).

As comparações efectuadas entre a ingestão média diária de micronutrientes nos participantes não diabéticos (grupo III) e os resultados descritos no inquérito de consumo alimentar Holandês 2007-2010 (363) foram realizadas considerando a ingestão descrita no percentil 50, para a faixa etária de 51-69 anos e calculando a média dos valores descritos para homens e mulheres. Assim, verificou-se que a ingestão média de retinol (614 µg/dia), vitamina B<sub>6</sub> (1,95 mg/dia), folatos (286 µg/dia) vitamina D (3,7 µg/dia) e vitamina E (12,8 mg/dia) foi superior aos valores médios obtidos neste estudo e descritos na Tabela 12. As ingestões médias de tiamina

(1,1 mg/dia), vitamina B<sub>12</sub> (4,8 µg/dia) e vitamina C (92 mg/dia) foram inferiores aos valores estimados no nosso estudo. A ingestão média diária de riboflavina descrita no inquérito de consumo alimentar Holandês 2007-2010 foi semelhante à observada no nosso trabalho (1,55 mg/dia vs. 1,59 mg/dia). Em relação aos minerais verificou-se que a ingestão média diária de cálcio (1042 mg/dia), fósforo (1542 mg/dia), magnésio (348 mg/dia), potássio (3512 mg/dia) e zinco (10,8 mg/dia) foi superior quando comparada com a ingestão média obtida neste estudo para esses minerais (Tabela 12). No entanto a ingestão de cobre (1,2 mg/dia) e selênio (47 µg/dia) foi inferior à estimada neste trabalho para o grupo dos não diabéticos (grupo III).

A ingestão média diária de vitaminas e minerais nos dois grupos de diabéticos tipo 2 estudados foi comparada com os valores obtidos por Castro (359) para uma amostra de 100 diabéticos de tipo 2 com uma média de idades de 64 anos. Assim, verificou-se que a ingestão média de tiamina, riboflavina, niacina e seus equivalentes, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, folatos, vitamina C e vitamina E foi superior no estudo de Castro (359) em relação aos dois grupos de diabéticos tipo 2 do presente estudo. As maiores diferenças foram verificadas para os folatos (359): 322 µg/dia vs. grupo I: 277 µg/dia vs. grupo II: 259 µg/dia) e para a vitamina C (359): 155 mg/dia vs. grupo I: 129 mg/dia vs. grupo II: 129 mg/dia). Em relação aos minerais, observaram-se também, valores de ingestão média diária de cálcio (1185 mg/dia), magnésio (359,4 mg/dia) e zinco (126,5 mg/dia) superiores à ingestão média obtida para ambos grupos de diabéticos tipo 2 do nosso estudo. No entanto as ingestões médias diárias de cobre (1,8 µg/dia) e de selênio (11,7 µg/dia) foram muito inferiores às observadas na população diabética avaliada no presente trabalho de investigação.

Na avaliação dos hábitos alimentares dos três grupos estudados foi também determinada a prevalência de inadequação da ingestão de macronutrientes e micronutrientes. A estimativa da ingestão inadequada de nutrientes num grupo pressupõe a comparação do consumo estimado para o grupo com padrões de referência. Em Portugal, à semelhança de outros países, não foram adoptadas recomendações nutricionais nacionais ou europeias, podendo ser utilizado como padrão de referência as recomendações estabelecidas pelo *National Institute of Medicine* (190) para a população Americana.

Para os macronutrientes e seus constituintes verificou-se que a ingestão de proteína era adequada para todos os grupos, a prevalência de inadequação de ingestão de hidratos de carbono foi significativamente inferior no grupo III em relação aos outros dois grupos. A prevalência de inadequação da ingestão diária de fibra foi superior a 55% para todos os grupos, sendo os diabéticos sem angiopatia os que apresentaram a maior prevalência de inadequação. A inadequação de ingestão de gordura total foi verificada em 36% dos diabéticos do tipo 2 com angiopatia, 22,7% dos diabéticos do tipo 2 sem angiopatia e em 25,9% dos indivíduos não diabéticos. A inadequação de ingestão de ácidos gordos ómega-6 e ómega-3 foi muito elevada para todos os grupos (>70%). A inadequação da ingestão de ácidos gordos ómega-6 foi muito semelhante entre os três grupos, já a inadequação de ingestão de ácidos gordos ómega-3 foi

superior nos não diabéticos em relação aos diabéticos sem angiopatia. A avaliação da ingestão diária de EPA e DHA permitiu verificar que a prevalência da inadequação foi superior a 70% em todos os grupos. O efeito do déficit de ingestão dos ácidos gordos EPA e DHA sugere a existência de um risco aumentado de aparecimento e/ou progressão de DCV (330), especialmente no grupo dos diabéticos com angiopatia aos quais estão associados outros factores do risco cardiovascular.

A avaliação da prevalência de inadequação da ingestão de vitaminas e minerais nos três grupos em estudo foi realizada por comparação com o valor da RDA ou do AI quando a RDA não estava disponível para o micronutriente. A RDA é o tipo de DRI mais indicado para avaliar a inadequação de ingestão a nível individual mas não é a mais adequada para avaliar a inadequação alimentar de um grupo (360). O método mais adequado para avaliar a inadequação de ingestão de micronutrientes nos participantes deste estudo teria sido a utilização do método do ponto de corte na EAR. Para a aplicação deste método seria necessário conhecer a EAR do nutriente e a distribuição da ingestão habitual no grupo (317). No cálculo dessa distribuição é necessário no mínimo dois dias de avaliação da ingestão por indivíduo para calcular a variabilidade intraindividual. No entanto, o QFA dos últimos 12 meses utilizado neste estudo foi aplicado apenas num único dia não sendo possível utilizar o método do ponto de corte na EAR. No entanto, a utilização do QFA validado reduz uma possível variabilidade intraindividual em comparação com outros métodos de avaliação da ingestão alimentar individual como o questionário das 24 h.

Os riscos associados à utilização da RDA como padrão de referência para avaliar a inadequação de ingestão de um grupo é a sobrestimação da proporção do grupo que está em risco de inadequação (364). Assim os resultados de avaliação da inadequação de ingestão de micronutrientes obtidos neste estudo devem ser considerados com algum cuidado, tendo especial atenção para situações em que a média de ingestão diária de um nutriente num grupo é superior ao valor da RDA, indicando que o grupo atingiu ou ultrapassou as recomendações para o referido nutriente. No entanto, mesmo em casos em que a média de ingestão do grupo excede o valor da RDA, existe uma proporção dos indivíduos que têm um consumo inadequado (365). É ainda importante referir que quando não existem valores de RDA e EAR estabelecidos, é necessário recorrer ao valor de AI, mesmo que este não possa ser utilizado para determinar a prevalência de inadequação da ingestão de nutrientes num grupo. Nos grupos com uma média de ingestão igual ou superior ao AI pode assumir-se que existe uma baixa prevalência de inadequação para um dado nutriente, no entanto quando a média de ingestão do grupo está abaixo da AI, não se pode fazer suposições acerca da inadequação da ingestão nesse grupo (364).

De acordo com os resultados da prevalência da inadequação de ingestão de micronutrientes obtidos neste estudo, foi verificado que a prevalência de inadequação para a tiamina variou entre os 29,3% e os 38,5%, sendo que, o grupo dos não diabéticos foi o que evidenciou maior

prevalência de inadequação. Para a riboflavina a prevalência de inadequação da ingestão foi inferior a 25% em todos os grupos, sendo o grupo III o que apresentou maior prevalência da inadequação de ingestão desta vitamina. A prevalência de inadequação da ingestão de niacina e seus equivalentes foi superior a 35% nos três grupos e semelhante entre eles. A prevalência de inadequação da ingestão de folatos foi superior a 85% em todos os grupos estudados, sendo que, o valor médio de ingestão diária desta vitamina para cada grupo (grupo I: 277 µg/dia vs. grupo II: 259 µg/dia vs. grupo III: 265 µg/dia) foi muito inferior ao valor da RDA. Para o ácido pantotênico a prevalência de inadequação da ingestão foi superior a 75% em todos os grupos. Como o valor de referência utilizado foi a AI (5 mg/dia) e o valor médio de ingestão diária desta vitamina foi inferior ao AI para todos os grupos (grupo I: 4,14 mg/dia vs. grupo II: 3,77 mg/dia vs. grupo III: 3,37 mg/dia), os resultados obtidos permitem apenas ter uma ideia da tendência da inadequação da ingestão desta vitamina mas não é possível afirmar de forma fiável que existe uma elevada prevalência na inadequação da sua ingestão. Em relação à vitamina C, a prevalência de inadequação da ingestão desta vitamina foi semelhante e inferior a 25% em todos os grupos, sendo o grupo dos não diabéticos (grupo III) o que apresentou maior valor de prevalência. Para as vitaminas D e K, a prevalência de inadequação da ingestão foi 100% para todos os grupos. No entanto, a vitamina D tem uma RDA estabelecida (15 µg/dia para adultos dos 31-70 anos; 20 µg/dia para adultos >70 anos) mas para a vitamina K apenas está estabelecido o AI (homens: 120 µg /dia; mulheres: 90 µg /dia). Verificou-se também que o valor médio de ingestão diária de vitamina D foi para todos os grupos (grupo I: 3,31 µg/dia vs. grupo II: 3,12 31 µg/dia vs. grupo III: 2,79 31 µg/dia) muito inferior ao valor da RDA. Assim, se o método utilizado para avaliar a prevalência de inadequação da ingestão fosse o ponto de corte da EAR, a prevalência de inadequação da ingestão de vitamina D provavelmente seria também elevada para todos os grupos estudados. É ainda importante referir que uma baixa ingestão de vitamina D é considerado um factor de risco para o aparecimento de hipovitaminose D (366) e que a deficiência em vitamina D tem vindo a ser associada com DCV e da DMT2 (367). No que diz respeito à vitamina K, o valor médio de ingestão diária desta vitamina foi inferior para todos os grupos (grupo I: 18,0 31 µg/dia vs. grupo II: 15,0 31 µg/dia vs. grupo III: 11,7 31 µg/dia) ao valor definido no AI e por isso não é possível afirmar de forma fiável que existe uma elevada prevalência na inadequação da sua ingestão. A prevalência da inadequação da vitamina E foi superior a 96% para todos os grupos, sendo o grupo dos diabéticos do tipo 2 sem angiopatia o que apresentou a maior prevalência. Verificou-se também que os valores médios de ingestão diária de vitamina E foram muito inferiores (grupo I: 8,07 mg/dia vs. grupo II: 7,80 vs. grupo III: 7,38 mg/dia) ao valor da RDA em todos os grupos. A biotina foi avaliada por comparação com o seu valor de AI (30 µg/dia), visto não estar estabelecido nenhum valor de RDA. Assim, observou-se que a prevalência de inadequação foi superior a 98,7% em todos os grupos, mas não é possível tirar nenhuma conclusão sobre estes resultados, visto que, o valor médio de ingestão diária desta vitamina é muito inferior (grupo I: 10,8 µg/dia vs. grupo II: 9,47 31 µg/dia

vs. grupo III: 7,64 31 µg/dia) ao valor estabelecido pela AI. Para este tipo de DRIs são habitualmente estabelecidos valores muito superiores aos valores que posteriormente são definidos nas futuras RDA e por isso este valor de referência está associado a um elevado grau de incerteza (317). Em relação à vitamina B<sub>6</sub> a prevalência foi cerca de 40% em todos os grupos e o valor de ingestão média diária de todos os grupos (grupo I: 1,84 mg/dia vs. grupo II: 1,69 mg/dia vs. grupo III: 1,67 mg/dia) foi semelhante à RDA estabelecida. É ainda importante referir que a média de ingestão diária da tiamina, riboflavina, niacina e seus equivalentes, vitamina B<sub>12</sub>, vitamina C, cobre, ferro, fósforo, sódio e selénio foi para todos os grupos superior aos valores definidos nas RDAs, podendo a prevalência de inadequação da ingestão destas vitaminas estar sobrestimada.

Em relação ao minerais, foram observadas as maiores prevalências de inadequação da ingestão dos grupos estudados para o potássio (≥93,3%), cloro (≥96,0%) e molibdénio (100%). Destes três minerais apenas o molibdénio tem RDA estabelecida mas os seus valores médios de ingestão foram muito inferiores ao valor da RDA para todos os grupos, evidenciando que provavelmente se for utilizado o método do ponto de corte da EAR será mantida a elevada prevalência de inadequação da ingestão deste mineral. A prevalência de inadequação da ingestão de cálcio foi também elevada para todos os grupos (>58%), sendo o grupo dos não diabéticos o que apresentou valores de prevalência mais elevados. A prevalência de inadequação da ingestão de cobre, manganésio e fósforo foi inferior a 18% para todos os grupos. No entanto para o cobre e fósforo está estabelecida uma RDA e para o manganésio apenas existe um AI definido. Verificou-se também que a ingestão média diária de cobre e fósforo era superior ao valor de RDA em todos os grupos, demonstrando que existe uma probabilidade elevada da prevalência de inadequação da ingestão poder estar sobrestimada. Para o ferro, a prevalência da inadequação da ingestão foi inferior a 22% em todos os grupos, sendo a ingestão média diária desse micronutriente em todos os grupos superior (grupo I: 12,4 mg/dia vs. grupo II: 11,6 mg/dia vs. grupo III: 11,5 mg/dia) ao valor da RDA (8 mg/dia). A prevalência de inadequação da ingestão de iodo e magnésio obtida no estudo foi superior a 70% em todos os grupos e os valores médios de ingestão diária desses minerais (iodo - grupo I: 101 µg/dia; grupo II: 86,0 µg/dia; grupo III: 69,1 µg/dia e magnésio - grupo I: 310 mg/dia; grupo II: 294 mg/dia; grupo III: 295 mg/dia) foram muito inferiores à RDA.

Os resultados da prevalência de inadequação da ingestão de vitaminas e minerais obtidos no presente estudo para o grupo III foram comparados com os respectivos valores de prevalência provenientes do estudo EpiPorto (360). Para realizar as comparações do modo mais correcto possível, optou-se por calcular o valor médio de ambos os géneros nas faixas etárias dos 50 aos 70 anos e >70 anos. Assim, verificou-se que os valores médios de prevalência de inadequação da ingestão das vitaminas A (5,45%), tiamina (1,75%), riboflavina (2,95%), niacina e seus equivalentes (1,53%), B<sub>6</sub> (8,00%), B<sub>12</sub> (0,55%), ácido fólico (69,4%), C (15,5%), E (94,0%), magnésio (42,9%) e fósforo (1,00%) foram inferiores aos calculados no nosso estudo.

Duas possíveis justificações para as diferentes prevalências obtidas no estudo EpiPorto e no nosso estudo são o facto de que no estudo EpiPorto a prevalência de inadequação foi calculada utilizando o método do ponto de corte na EAR e no nosso estudo foi utilizado o método de comparação com os valores das DRIs. O outro facto é que no estudo EpiPorto a ingestão média diária de energia total foi superior (em cerca de 500 kcal) ao valor obtido no nosso estudo para o grupo III, sendo que as ingestões diárias de micronutrientes em ambos os estudos foram estimadas com base nas ingestões diárias de energia total.

De um modo geral a prevalência de inadequação de micronutrientes foi superior no grupo dos não diabéticos (grupo III) em relação aos dois grupos de diabéticos. No entanto o padrão de ingestão de vitaminas e minerais nos dois grupos de diabéticos tipo 2 avaliados foi muito semelhante. Para um total de 24 micronutrientes avaliados, o grupo III foi o que apresentou o maior valor de prevalência de inadequação para 5 vitaminas (tiamina, riboflavina, B<sub>12</sub>, folatos e C) e para 5 minerais (cálcio, fósforo, potássio, iodo e zinco). No entanto foi no grupo I que se verificou a maior prevalência de inadequação de ingestão de vitamina A, E, niacina e seus equivalentes e manganésio. No grupo II apenas foi verificada maior prevalência de inadequação em relação aos outros dois grupos para a ingestão de vitamina E, ferro e magnésio. Assim, sugere-se que todos os participantes no estudo que apresentaram défices de ingestão nos micronutrientes avaliados enriqueçam a sua dieta com boas fontes alimentares desses micronutrientes e/ou iniciem um programa de suplementação alimentar mediante aconselhamento médico.

A diabetes e a hipertensão são ambas doenças crónicas muito comuns nos países desenvolvidos. A prevalência de hipertensão em diabéticos do tipo 2 é duas vezes superior do que numa população de não diabéticos. Os benefícios da redução da tensão arterial parecem ser maiores em pessoas com diabetes tipo 2 do que em hipertensos sem diabetes (368). Evidências provenientes de estudos observacionais e experimentais sustentam a ideia de que a restrição de sódio é benéfica para a hipertensão e que os diabéticos com hipertensão sensível ao sal têm um mau prognóstico em relação à ocorrência de um evento cardiovascular (368). Neste estudo foi avaliada a prevalência de ingestão de sódio alimentar (sódio intrínseco aos alimentos e sódio adicionado para a confecção) acima do valor máximo recomendado pela FDA, isto é, o *Tolerable Upper Level Intake* (UL) que corresponde ao nível de ingestão máximo de um nutriente susceptível de não estar relacionado com efeitos adversos para a saúde (190). Para todos os grupos a prevalência de sódio acima do UL foi muito elevada, verificando-se o valor mais baixo para o grupo dos não diabéticos (65%) e o valor mais elevado para os diabéticos com angiopatia (84%). A prevalência de ingestão de sódio alimentar total foi também comparada com o valor máximo recomendado pela OMS (2,0 g/dia) que é inferior ao UL (2,3 g/dia) definido pela FDA. Assim, verificou-se que a prevalência da ingestão de sódio alimentar total acima do valor de referência estabelecido pela OMS foi extremamente elevada para todos os grupos, sendo o valor mais baixo verificado para o grupo dos não diabéticos

(83,2%). De acordo com os resultados obtidos sugere-se que seja iniciado em todos os participantes do estudo com ingestão de sódio acima do limite recomendado pela OMS um programa de restrição de sódio alimentar de pelo menos 5 semanas com posterior avaliação da tensão arterial (369).

No futuro será necessário realizar mais estudos que complementem os resultados deste trabalho e que permitam ajustar os dados obtidos de acordo com a distribuição da ingestão habitual no grupo, nomeadamente com uma nova aplicação do QFA utilizado ou pela aplicação de um registo alimentar de 3 dias à mesma população.

### 5.3. Optimização e validação de métodos

Para a realização das análises de doseamento de Hcy, Cys, MAD, vitaminas A, C, E e B<sub>6</sub> e de carotenóides no sangue foi necessário implementar, otimizar e validar previamente cinco métodos cromatográficos.

Em relação ao método para a determinação dos níveis plasmáticos de Hcy e Cys, o LD (0,046 µM e 0,240 µM, respectivamente) e o LQ (0,152 µM e 0,800 µM, respectivamente) obtidos permitiram confirmar a sensibilidade do método, já que os referidos limites foram pelo menos cinco vezes inferiores aos diversos valores descritos por Gautier *et al.* (334) (Hcy: LD = 0,55 µM; LQ = 1,09 µM), Toyo'oka *et al.* (335) (Hcy: LD = 120 µM; Cys: LD = 520 µM), Tokgöz *et al.* (370) (Hcy: LD = 1 µM), Rizzo *et al.* (371) (Hcy: LD = 16,8 µM e Cys: LD = 13,3 µM) e Fermo *et al.* (372) (Hcy: LD = 0,1 µM e LQ = 0,85 µM). O método demonstrou ter uma precisão aceitável (repetibilidade do método e precisão intermédia) concordante com outros métodos previamente descritos por Garcia *et al.* (332) (Hcy: 3% e 6%), Rizzo *et al.* (Hcy: 0,98% e 3,20%; Cys: 0,27% e 6,25%), Krij *et al.* (373) (Hcy: 1,9% e 3,8%; Cys: 2,3% e 3,9%) Frick *et al.* (374) (Hcy: 4,19-4,66% e 4,86-5,56%). A exactidão foi avaliada por ensaios de recuperação, sendo que, o melhor valor de recuperação da Hcy foi obtido para a concentração mais elevada (60 µM) e o da Cys para concentração média (250 µM). Os valores de recuperação calculados a três níveis de concentração para a Hcy (92,0-95,2%) e a Cys (90,0-92,8%) estavam dentro da gama de referência recomendada (80-120%) pelos guias de validação (323,324) e foram semelhantes aos obtidos por Garcia *et al.* (Hcy: 94-104%), melhores do que os alcançados por Gautier *et al.* (Hcy: 96-112%), Rizzo *et al.* (Hcy: 80-104%; Cys: 83-95%), Frick *et al.* (Hcy: 93,7-115%) e menos exactos do que os descritos por Fermo *et al.* (Hcy: 96,4-101,4%), e Carducci *et al.* (375) (Hcy: 98%; Cys: 96%).

Para o doseamento da vitamina B<sub>6</sub> no plasma foi implementado, otimizado e validado um método de HPLC com detecção por fluorescência induzida com bissulfito de sódio. A principal limitação deste método foi o facto da fase móvel mais adequada para separar de forma aceitável o PLF da frente do solvente conter uma concentração de 100 mM de tampão fosfato (dihidrogenofosfato de potássio monobásico). Verificou-se também que era necessária uma

elevada concentração de tampão fosfato para garantir uma apropriada separação entre as diferentes formas da vitamina B<sub>6</sub>. Foram testadas diversas colunas cromatográficas de fase reversa indicadas para serem utilizadas com fases móveis 100% aquosas sem que ocorra um colapso de fase após algumas utilizações (376). Contrariamente ao esperado durante a utilização da coluna Purospher® STAR RP-18 *endcapped* (150 x 4,6 mm diâmetro interno, 4 µm tamanho de partícula) da Merck, protegida com uma pré-coluna LiChroCART® (40 x 4,0 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula) foi verificado o colapso da fase estacionária com diminuição sucessiva do tempo de retenção do PLF até perda completa de retenção e coeluição com a frente do solvente. De todas as outras colunas utilizadas a que permitiu obter uma boa separação entre o PLF e a fase móvel foi a Synergi™ Hydro-RP (150 x 4,6 mm diâmetro interno, 4 µm tamanho de partícula) da Phenomenex (Torrance, California, EUA) protegida com uma pré-coluna AQ C18 (40 x 2,0 mm diâmetro interno, 5 µm tamanho de partícula). Em relação aos parâmetros da validação deste método cromatográfico, o LD (2,59 nM) e LQ (7,84 nM) calculados e comprovados experimentalmente foram semelhantes aos valores obtidos por Talwar *et al.* (377) (LD = 2,1 nM e LQ = 5,8 nM) que para dosear o PLF utilizou um método de HPLC com detecção por fluorescência induzida pela semicarbazida. O LD (8,0 nM) obtido por Bailay *et al.* (378) para o PLF foi muito superior ao calculado neste trabalho, no entanto importa referir que o autor utilizou um método de HPLC com detecção por fluorescência induzida com cianeto de potássio. O LD do PLF foi também calculado por Giorgi *et al.* (379) que utilizou um método de HPLC com uma eluição em gradiente linear (solvente A uma fase aquosa com 0,01% de ácido trifluoracético e solvente B 100% de metanol) e detecção por UV a 280 nm. O valor de LD (2,02 µM) obtido pelo autor foi também superior ao valor calculado neste trabalho. A precisão e exactidão do método foram comparadas com as obtidas por outros autores. Assim, a repetibilidade do método (2,15-3,28%) e a precisão intermédia (4,10%) obtidas para o PLF foram semelhantes às descritas por Talwar *et al.* (377) (repetibilidade: <6%; precisão intermédia: <7%), Bailay *et al.* (378) (repetibilidade: 2,8%; precisão intermédia: 5,2%) inferiores aos valores descritos por Bisp *et al.* (380) (repetibilidade: 5,1-6,1%; precisão intermédia: 8,1-8,8%). Em relação à exactidão do método, os resultados obtidos para as três concentrações avaliadas (10, 130 e 210 nM) variaram de 91,4 a 99,2%, sendo obtida uma recuperação média global de 96%. Estes resultados estão de acordo com os valores de recuperação apresentados por Talwar *et al.* (377) que obteve uma recuperação média de PLF no plasma superior a 95% e com os resultados descritos por Bisp *et al.* (380) e Deitrick *et al.* (381) que obtiveram uma exactidão média global de 97%. No entanto, a exactidão média global obtida neste estudo para o método de doseamento da vitamina B<sub>6</sub> foi superior à alcançada por Bailey *et al.* (378) em que a recuperação média global foi de 92,8%.

Foi previamente implementado, optimizado e validado um método de HPLC com detecção por UV para a determinação dos níveis plasmáticos de vitamina C. A estabilidade da vitamina C nas amostras de sangue e plasma é afectada por diversos factores, como sendo, os

anticoagulantes, a acidificação, a exposição à luz e temperatura de armazenamento (382). A principal dificuldade verificada durante a optimização do método foi a necessidade de garantir a estabilidade do AA no padrão e nas amostras (383). No entanto, foi desenvolvida uma nova solução de estabilização com ácido perclórico e ácido metafosfórico que reduziu significativamente as perdas de AA nas amostras de plasma durante a congelação a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A nova solução de estabilização pode também ser utilizada para análise de vitamina C em alimentos, tendo sido também comprovada a sua utilidade e efectividade na estabilização de amostras de frutos, polpas de fruta e sumos (384). Em relação aos parâmetros de validação, verificou-se que o LD ( $0,035\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) e o LQ ( $0,090\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) obtidos no presente estudo foram respectivamente, sete e nove vezes menores que os limites (LD =  $0,263\text{ }\mu\text{g/mL}$  e LQ =  $0,866\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) descritos por Karlsen *et al.* (385). O LD obtido neste trabalho de investigação foi também muito inferior ao determinado (LD =  $0,525\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) por Kand'ár *et al.* (386). O LD e LQ obtidos por Li *et al.* (387) quando desenvolveu e validou um método de HPLC com detecção electroquímica para o doseamento de AA e de ácido úrico no plasma humano foram semelhantes (LD =  $0,035\text{ }\mu\text{g/mL}$  e LQ =  $0,175\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) aos obtidos no presente estudo com detecção por UV. A precisão do método de doseamento da vitamina C no plasma foi também avaliada e comparada com a literatura científica disponível. Os valores da repetibilidade do método variaram de 2,05% a 3,98% e a precisão intermédia foi 3,01%. Esses valores foram semelhantes ou inferiores aos descritos por Karlsen *et al.* (385) (repetibilidade: 4,2-4,5%; precisão intermédia: 4,3-4,6%), Kand'ár *et al.* (386) (repetibilidade: 2,1%; precisão intermédia: 5,8%) e por Li *et al.* (387) (repetibilidade: 0,3-4,5%; precisão intermédia: 6,0%). A exactidão do método de doseamento da vitamina C (91,0-98,8%) descrito nesta tese foi considerada adequada (80-120%) de acordo com os valores de referência definidos nos guias de validação (323,324) e semelhante aos valores apresentados por Karlsen *et al.* (385) (90,8-94,%), Kand'ár *et al.* (386) (92-102,5%) e Li *et al.* (387) (93-101%).

Com o objectivo de poder quantificar os níveis séricos de MAD em todos os participantes deste estudo, foi desenvolvido, optimizado e validado um método de HPLC. A principal dificuldade encontrada no desenvolvimento e optimização do método foi conseguir ultrapassar a falta de especificidade observada quando a detecção do MAD foi realizada por fluorescência utilizando o TBA como agente de derivatização. Tem sido proposto que a fraca especificidade deste método pode estar associada com uma sobrestimativa das concentrações séricas de MAD e com a capacidade limitada para detectar verdadeiras diferenças no nível de peroxidação lipídica em estudos clínicos (388). No entanto, o doseamento do MAD pelo método do TBA continua a ser indevidamente considerado como um método adequado para avaliar os níveis séricos de MAD em estudos clínicos (389-391). Tendo em consideração as diversas problemáticas associadas ao método de TBA, optou-se por validar um método de HPLC com detecção por UV. Assim, os resultados obtidos demonstraram que o método validado tem uma elevada especificidade (sem a presença de picos interferentes) e sensibilidade, com valores de

LD (0,016  $\mu\text{M}$ ) e LQ (0,050  $\mu\text{M}$ ) pelo menos seis vezes menores do que os limites obtidos por Antunes *et al.* (392) (LD: 0,11  $\mu\text{M}$ ; LQ: 0,38  $\mu\text{M}$ ) durante a validação do método de doseamento do MAD por HPLC com detecção por fluorescência induzida com 2,4-dinitrofenilhidrazina, por Londero *et al.* (393) (LD: 0,1  $\mu\text{M}$ ) durante a validação do método de doseamento do MAD por HPLC com detecção por fluorescência induzida com TBA; por Agarwal *et al.* (394) (LD: 0,128) durante a validação do método de doseamento do MAD por HPLC com detecção por fluorescência induzida com TBA e por Moselhy *et al.* (388) (LD: 0,31  $\mu\text{M}$ ; LQ: 1,02  $\mu\text{M}$ ) durante a validação do método de doseamento do MAD por HPLC com detecção por DAD. A repetibilidade do método (0,527-3,07%) e a precisão intermédia (8,52%) foram inferiores aos valores obtidos por Londero *et al.* (393) (repetibilidade: 8%; precisão intermédia: 10%), Agarwal *et al.* (394) (repetibilidade: 8,6-10,3%; precisão intermédia: 3,6-7,9%) e por Antunes *et al.* (392) (repetibilidade: 3,67-14,69%; precisão intermédia: 2,42-7,13%). A exactidão do método foi avaliada por ensaios de recuperação após adição de uma quantidade conhecida de padrão a três níveis de concentração de MAD (0,8; 1,8; 2,8  $\mu\text{M}$ ). Os resultados da recuperação variaram de 92,8-103% e foi obtida uma recuperação média total de 96,7%. De acordo com os resultados apresentados por Antunes *et al.* (392) (75,5-81,4%), Londero *et al.* (393) (87-95%), Agarwal *et al.* (394) (88-101%) e Moselhy *et al.* (388) (82,4-101%), o método descrito neste trabalho de investigação demonstrou ser mais exacto do que os métodos apresentados pelos referidos autores.

A análise em simultâneo dos níveis séricos de vitamina A, E e seis carotenóides (luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno) foi realizada por um método de HPLC com detecção DAD previamente validado. Durante o desenvolvimento e optimização do método a principal dificuldade foi conseguir obter uma adequada separação (factor de resolução  $\geq 1,5$ ) entre a luteína e a zeaxantina (isómeros de posição). Durante a optimização do método de análise foi testado um sistema de duas colunas cromatográficas composto por uma coluna Alltima™ C18 acoplada com uma coluna Vydac 201TP54 C18. O sistema de colunas cromatográficas permitiu obter uma boa sensibilidade e resolução entre todos os analitos, mas o tempo de retenção dos carotenóides mais apolares (licopeno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno) foi elevado e o tempo de corrida necessário para cada injeção foi de 45 min. Posteriormente foi testada a utilização de uma única coluna analítica, a Supelcosil™ LC-18-DB. Esta coluna permitiu obter uma sensibilidade e resolução semelhantes às conseguidas com o sistema das duas colunas (Alltima™ C18 e Vydac 201TP54 C18) e simultaneamente reduzir o tempo de corrida para 25 min. As características específicas de composição e diâmetro da coluna Supelcosil™ LC-18-DB permitiram garantir a resolução entre os isómeros luteína e zeaxantina, tornar o método mais rápido e reduzir os custos associados ao método de análise. Em relação à validação do método analítico, os valores obtidos para os vários parâmetros de validação foram comparados com os descritos por Gueguen *et al.* (318), Lee *et al.* (395) e Karppi *et al.* (396). Assim, os valores de LD (0,251  $\mu\text{M}$ ) e LQ (0,760  $\mu\text{M}$ ) obtidos para o retinol foram

superiores aos descritos por Karppi *et al.* (396) (0,04  $\mu\text{M}$ ) e Lee *et al.* (395) (0,03  $\mu\text{M}$ ). No entanto, o valor de LD obtido no nosso estudo foi inferior ao obtido por Gueguen *et al.* (318) (0,45  $\mu\text{M}$ ) e o LQ próximo do calculado pelo mesmo autor (0,66  $\mu\text{M}$ ). Em relação aos valores da precisão e da exactidão os resultados obtidos para o retinol estão de acordo com Gueguen *et al.* (318) (repetibilidade do método: 3,3%; precisão intermédia: 4,4% e recuperação média total: 99,6%), Karppi *et al.* (396) (repetibilidade do método: 1,7%; precisão intermédia: 6,9% e recuperação média total: 90,0%) e Lee *et al.* (395) (repetibilidade do método: 2,1-4,0%; precisão intermédia: 5,2-7,8% e recuperação total: 98-102%). Para o  $\alpha$ -tocoferol, o LD obtido neste estudo foi superior ao LD (0,232  $\mu\text{M}$ ) calculado por Lee *et al.* (395), mas inferior aos valores descritos por Gueguen *et al.* (318) (2,64  $\mu\text{M}$ ) e Karppi *et al.* (396) (0,73  $\mu\text{M}$ ). Os valores de precisão e exactidão calculados para o  $\alpha$ -tocoferol durante a validação do método estão de acordo com os valores disponíveis na literatura: (318) (repetibilidade do método: 3,8%; precisão intermédia: 3,8% e recuperação média total: 109%), (395) (repetibilidade do método: 1,6-4,4%; precisão intermédia: 1,0-2,8% e recuperação média total: 96-101%) e (396) (repetibilidade do método: 1,1%; precisão intermédia: 5,3% e recuperação média global: 97,9%). Os LD obtidos para a luteína, licopeno e  $\beta$ -caroteno foram superiores aos descritos por Karppi *et al.* (396) (luteína: 0,01  $\mu\text{M}$ ; licopeno: 0,02  $\mu\text{M}$  e  $\beta$ -caroteno: 0,02  $\mu\text{M}$ ), Gueguen *et al.* (318) (luteína: 0,06  $\mu\text{M}$ ; licopeno: 0,03  $\mu\text{M}$  e  $\beta$ -caroteno: 0,03  $\mu\text{M}$ ) e Lee *et al.* (395) (luteína: 0,035  $\mu\text{M}$ ; licopeno: 0,019  $\mu\text{M}$  e  $\beta$ -caroteno: 0,037  $\mu\text{M}$ ). No entanto, os LD obtidos por Lee *et al.* (395) e Karppi *et al.* (396) para zeaxantina (0,035  $\mu\text{M}$  e 0,01  $\mu\text{M}$ ),  $\beta$ -criptoxantina (0,018  $\mu\text{M}$  e 0,01  $\mu\text{M}$ ) e  $\alpha$ -caroteno (0,02  $\mu\text{M}$  e 0,019  $\mu\text{M}$ ) foram superiores aos obtidos no nosso estudo. De um modo geral a precisão e exactidão obtidas no nosso método para o doseamento de carotenóides foram ligeiramente inferiores às obtidas por Karppi *et al.* (396) mas semelhante às descritas por Lee *et al.* (395) e Gueguen *et al.* (318). Para a luteína, a repetibilidade do método a precisão intermédia e a recuperação média global obtidas por Karppi *et al.* (396) foram respectivamente, 2,6%; 5,8% e 101%. Os resultados obtidos pelo mesmo autor e para os mesmos parâmetros foram para a zeaxantina (4,0%; 7,6% e 90,1%),  $\beta$ -criptoxantina (1,7%; 6,4% e 97,0%), licopeno (1,3%; 8,8% e 92,5%),  $\alpha$ -caroteno (2,1; 7,7% e 85,8%) e  $\beta$ -caroteno (1,7%; 7,4% e 80,2%). Os resultados apresentados por Lee *et al.* (395) para os mesmos parâmetros de validação foram respectivamente para a luteína (2,1-5,5%; 8,1-14% e 93-102%), zeaxantina (2,2-4,7%; 9,4-14% e 97-105%),  $\beta$ -criptoxantina (2,6-4,6%; 5,1-13% e 88-105%), licopeno (6,4-11%; 7,4-9,8% e 89-93%),  $\alpha$ -caroteno (7,1-9,1%; 8,9-92% e 94-95%) e  $\beta$ -caroteno (7,1-11%; 12-14% e 98-104%). De todos os resultados dos trabalhos comparados com o nosso estudo, Gueguen *et al.* (318) são os que descrevem valores médios de repetibilidade e precisão intermédia do método mais elevados para a  $\beta$ -criptoxantina (7,8% e 13,7%), licopeno (9,5% e 12,5%) e  $\alpha$ -caroteno (8,8% e 12,1%). No entanto os valores médios dos mesmos parâmetros de validação apresentados pelo mesmo autor para luteína-zeaxantina (3,8% e 4,5%) e  $\beta$ -caroteno (6,7% e 9,1%) foram inferiores aos descritos por Lee *et al.* (395).

#### 5.4. Avaliação das concentrações dos compostos bioquímicos em estudo

Neste estudo as concentrações médias de Hcy, Cys, MAD, luteína,  $\beta$ -criptoxantina, ácido fólico e vitaminas A, C, E, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, no plasma ou soro foram avaliadas e comparadas entre os três grupos estudados. Para todos os compostos bioquímicos avaliados foi realizado um ajuste dos valores médios para possíveis variáveis de confundimento, como sendo, a idade, género, IMC e ingestão média diária de energia (modelo 1). Dependendo do composto bioquímico foi também aplicado outro modelo de ajuste para possíveis variáveis de confundimento adicionais. Assim, os valores médios de Hcy (depois de ajustados de acordo com o modelo 1) foram significativamente superiores nos dois grupos de diabéticos em relação ao grupo III (grupo I: 10,4  $\mu$ M vs. grupo II: 9,32  $\mu$ M vs. grupo III: 4,28  $\mu$ M). Koubaa *et al.* (397) realizaram um estudo observacional do tipo caso-controlo em 86 diabéticos do tipo 2 e 120 controlos com o objectivo de avaliar uma possível associação entre os níveis plasmáticos de Hcy e o polimorfismo do genótipo C677T da MTHFR nos diabéticos do tipo 2. Neste estudo, a concentração média de Hcy no plasma para o grupo de diabéticos (12,51  $\mu$ M) foi ligeiramente superior à observada no grupo controlo (11,76  $\mu$ M). Os valores de Hcy obtidos pelo autor foram superiores aos verificados no nosso trabalho de investigação. No entanto e contrariamente ao observado no nosso estudo, as diferenças verificadas entre os níveis de Hcy nos dois grupos não foram estatisticamente significativas. Num outro estudo epidemiológico experimental do tipo ensaio clínico aleatório realizado por Gariballa *et al.* (398) com o objectivo de medir o efeito de suplementos alimentares no risco de infecção em diabéticos do tipo 2, um grupo de 100 participantes diabéticos foi dividido em dois subgrupos de 50 participantes cada (intervenção e controlo). Durante 90 dias foi dado ao grupo de intervenção uma cápsula vitamínica (com vitaminas C,  $\alpha$ -tocoferol, vitamina B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>2</sub> e ácido fólico) e ao grupo controlo uma cápsula idêntica mas sem vitaminas. Os níveis plasmáticos de Hcy foram avaliados no início do estudo e após 3 meses. O valor médio inicial de Hcy no grupo de intervenção foi 12,7  $\mu$ M e no grupo controlo foi 10,3  $\mu$ M. Após o período de intervenção, os níveis de Hcy no grupo de intervenção baixaram para 11,5  $\mu$ M e no grupo controlo subiram ligeiramente para 10,7  $\mu$ M. Comparativamente ao nosso estudo, os valores médios obtidos para o grupo não suplementado foram semelhantes aos descritos neste trabalho para os diabéticos tipo 2 com e sem angiopatia. Ndrepepa *et al.* (265) realizaram um estudo epidemiológico observacional onde avaliaram os níveis plasmáticos de Hcy em 2121 adultos com doença arterial coronária comprovada por angiografia (dos quais 507 eram diabéticos tipo 2 e 1614 não eram diabéticos). As concentrações de Hcy obtidas foram 12,4  $\mu$ M para o grupo dos diabéticos e 11,7  $\mu$ M para o grupo dos não diabéticos. Os resultados dos níveis de Hcy obtidos nos participantes com doença arterial coronária foram ligeiramente superiores aos apresentados no nosso trabalho. Em 2008, Gu *et al.* (399) realizaram um estudo em 120 diabéticos do tipo 2 e 40 controlos, no qual foram avaliados os níveis plasmáticos de Hcy. Os valores obtidos pelo

referido autor são muito semelhantes (diabéticos: 9,28  $\mu\text{M}$  vs. controlos: 5,64  $\mu\text{M}$ ) aos obtidos neste trabalho de investigação.

As concentrações médias de Cys no plasma após o ajuste com o modelo 1 foram significativamente superiores nos diabéticos do grupo I (242  $\mu\text{M}$ ) em relação aos outros dois grupos e estatisticamente superiores nos diabéticos do grupo II (228  $\mu\text{M}$ ) em relação ao grupo controlo (96,6  $\mu\text{M}$ ). Actualmente existe ainda pouca bibliografia disponível com resultados de avaliação dos níveis de Cys em diabéticos do tipo 2. No entanto, foi publicado recentemente um estudo realizado em ratos com diabetes induzida que avaliou o efeito cardioprotector da suplementação alimentar com Cys e taurina. Os resultados do estudo indicaram que a suplementação com Cys isoladamente ou em conjunto com a taurina tinha um efeito cardioprotector preventivo, mas não curativo da disfunção cardíaca pré-existente (400). Salemi *et al.* (401) desenvolveram um estudo observacional do tipo caso-controlo num grupo de 50 pessoas que tiveram nas últimas 48 h um AVC e em 49 adultos saudáveis. Os níveis plasmáticos de Cys foram avaliados em todos os participantes nas 48 h posteriores ao evento cardiovascular. Verificou-se que as concentrações plasmáticas de Cys foram significativamente superiores no grupo dos casos em relação aos controlos (296,3  $\mu\text{M}$  vs. 286,6  $\mu\text{M}$ ). É ainda importante referir um estudo de referência realizado por El-Khairi *et al.* (203) para a avaliação do risco da hipercisteinémia na doença cardiovascular. Foi um estudo do tipo caso-controlo que incluiu 750 participantes com DCV e 800 controlos. Todos os participantes foram recrutados em 19 centros de saúde de 9 países Europeus. Os níveis médios plasmáticos de Cys foram comparados entre os dois grupos. Foi também investigada a relação entre a concentração da Cys no plasma e o risco de DCV, bem como, o risco em separado de EAM, AVC e DAP. Para isso foi realizado um modelo de regressão logística generalizado em que se considerou como grupo de referência o grupo de pessoas com níveis intermédios de Cys (250-275  $\mu\text{M}$ ). Os resultados do estudo indicam que existe uma forte relação dos baixos níveis plasmáticos de Cys com o AVC e DAP, mas não com EAM. A relação da Cys com AVC e DAP foi forte e em forma de U, isto é, as pessoas com os níveis mais baixos e mais elevados de Cys são as que têm maior risco de ter um AVC ou DAP (203). Embora os resultados deste estudo não tenham sido obtidos com diabéticos do tipo 2, fundamentam os resultados obtidos no nosso estudo, visto que, as concentrações médias de Cys mais elevadas foram observadas no grupo de diabéticos tipo 2 com angiopatia e os valores mais baixos no grupo controlo.

O grau de *stress* oxidante foi elevado em todos os grupos, tendo-se verificado uma prevalência de níveis elevados de MAD superior a 70% em todos os grupos, mas especialmente nos diabéticos tipo 2 (MAD >90%). Após o ajuste das concentrações médias de MAD obtidas para cada grupo, verificou-se que existiam diferenças estatísticas entre os três grupos avaliados (grupo I: 2,70  $\mu\text{M}$  vs. grupo II: 2,49  $\mu\text{M}$  vs. grupo III: 2,29  $\mu\text{M}$ ), sendo o grupo I o que apresentou o maior valor médio e o grupo III o menor. Num estudo epidemiológico observacional do tipo caso-controlo, Aldebasi *et al.* (402) avaliaram os níveis plasmáticos de

MAD em diabéticos tipo 2 e adultos saudáveis. Foram constituídos três grupos, um de casos e dois grupos controlo. O grupo dos casos foi composto por 100 diabéticos do tipo 2 com retinopatia. O grupo I de controlo foi definido para 60 diabéticos do tipo 2 sem retinopatia e o grupo II para 60 adultos saudáveis. As concentrações séricas de MAD para o grupo dos diabéticos com retinopatia foram significativamente superiores às observadas para os dois grupos controlo (grupo dos casos: 3,20  $\mu\text{M}$  vs. grupo controlo I: 2,74  $\mu\text{M}$  vs. grupo controlo II: 2,63  $\mu\text{M}$ ). As concentrações médias de MAD obtidas no nosso estudo foram inferiores às descritas por este autor. Num estudo do tipo caso-controlo realizado por Paşaoğlu *et al.* (403) um dos objectivos foi avaliar a peroxidação lipídica e os seus produtos finais, entre eles, os níveis plasmáticos de MAD. Para isso foram constituídos três grupos. O grupo I foi composto por 20 participantes recentemente diagnosticados com diabetes tipo 2, grupo II por 20 diabéticos tipo 2 tratados com antidiabéticos orais e o grupo III por 20 adultos saudáveis. Os valores médios de MAD no soro foram estatisticamente superiores nos diabéticos dos grupos I e II comparativamente ao grupo III (grupo I: 2,18  $\mu\text{M}$  vs. grupo II: 2,52  $\mu\text{M}$  vs. grupo III: 1,52  $\mu\text{M}$ ). Os resultados dos valores médios de MAD obtidos no nosso estudo para o grupo dos não diabéticos (grupo III) foram superiores aos observados por Paşaoğlu *et al.* (403), no entanto as concentrações médias de MAD verificadas para os dois grupos de diabéticos foram semelhantes às descritas pelo autor para os diabéticos tipo 2 a fazer tratamento com antidiabéticos orais.

Em relação à concentração de vitaminas antioxidantes no sangue dos participantes no estudo, verificou-se que após o ajuste de acordo com os modelos aplicados, as concentrações médias de vitamina C foram significativamente inferiores nos dois grupos de diabéticos em relação ao grupo dos controlos (III). Para o  $\alpha$ -tocoferol verificou-se o contrário, já que, para os grupos I e II foram obtidos valores médios significativamente superiores ao do grupo III. As concentrações médias de retinol ajustadas alteraram as diferenças estatísticas entre os grupos. Após o ajuste, foram apenas observadas diferenças entre os grupos I e II. Os resultados obtidos foram comparados com os descritos na literatura científica.

As concentrações médias de  $\alpha$ -tocoferol sérico obtidas nos grupos I (29,3  $\mu\text{M}$ ) e II (30,9  $\mu\text{M}$ ) deste trabalho de investigação foram semelhantes às descritas por Winterbone *et al.* (404) num ensaio clínico aleatório em diabéticos do tipo 2 onde foram constituídos dois grupos (intervenção e controlo). A média dos níveis séricos de  $\alpha$ -tocoferol no grupo de intervenção antes do período de suplementação foi de 28,9  $\mu\text{M}$ . No entanto, os valores de mediana descritos por Olmedilla *et al.* (405) para homens (23,57  $\mu\text{M}$ ) e mulheres (26,24  $\mu\text{M}$ ) diabéticos insulín-dependentes no percentil 50 foram inferiores aos valores obtidos no nosso estudo. Em relação ao grupo controlo, o valor médio de  $\alpha$ -tocoferol obtido (22,4  $\mu\text{M}$ ) foi semelhante às médias descritas por Ylönen *et al.* (406) para homens (22,8  $\mu\text{M}$ ) e mulheres (23,1  $\mu\text{M}$ ) não diabéticos e inferior aos valores de mediana descritos por Olmedilla *et al.* (340) para homens (28,56  $\mu\text{M}$ ) e mulheres (27,86  $\mu\text{M}$ ) no percentil 50.

Em relação ao retinol, verificou-se que os valores médios obtidos para todos os grupos (grupo I: 4,63  $\mu\text{M}$  vs. grupo II: 4,00  $\mu\text{M}$  vs. grupo III: 4,38  $\mu\text{M}$ ) foram superiores aos valores da mediana no percentil 50 descritos por Olmedilla *et al.* (405) em adultos diabéticos insulino-dependentes (homens: 1,46  $\mu\text{M}$  vs. mulheres: 1,28  $\mu\text{M}$ ) e por Abahusain *et al.* (407) em 107 diabéticos do tipo 2 (1,73  $\mu\text{M}$ ). Uma explicação para este facto poderá ser a variabilidade interindividual originada por diferenças nas características iniciais das populações estudadas. No entanto, é ainda de referir o estudo desenvolvido por Merzouk *et al.* (408), no qual foram comparados os níveis plasmáticos de retinol (vitamina A) em indivíduos diabéticos (tipos I e II) e não diabéticos. A concentração média de retinol descrita por este autor para o grupo dos diabéticos tipo 2 sem complicações é semelhante (cerca de 4  $\mu\text{M}$ ) à apresentada neste trabalho de investigação.

Em 2004, Yamada *et al.* (409) realizaram um estudo epidemiológico do tipo caso-controlo em 41 diabéticos do tipo 2. Foram constituídos dois grupos, o primeiro composto por 26 diabéticos do tipo 2 com angiopatia e o segundo com 15 diabéticos do tipo 2 sem angiopatia. Os níveis plasmáticos de vitamina C foram comparados nos dois grupos não tendo sido observadas diferenças estatísticas entre eles. As concentrações médias de AA obtidas para os grupos I (4,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e II (4,16  $\mu\text{g/mL}$ ) do nosso estudo foram inferiores aos valores descritos por Yamada *et al.* (409) (diabéticos tipo 2: 10,4  $\mu\text{g/mL}$  vs. controlos: 9,34  $\mu\text{g/mL}$ ), no entanto Yamada *et al.* (409) não observaram diferenças estatísticas entre os dois grupos de diabéticos. Num outro estudo do tipo ensaio clínico aleatório descrito por Chen *et al.* (410) foram avaliados os níveis plasmáticos de vitamina C em diabéticos tipo 2 antes e após a suplementação com essa vitamina. Verificou-se que antes do período de suplementação, os 32 diabéticos tipo 2 que foram seleccionados para o estudo de intervenção tinham concentrações plasmáticas de vitamina C próximas (grupo casos: 4,05  $\mu\text{g/mL}$  vs. grupo controlo: 3,70  $\mu\text{g/mL}$ ) das descritas no nosso trabalho de investigação. Carter *et al.* (411), no âmbito de um estudo de intervenção comunitário para a prevenção da DMT2 realizou uma análise transversal onde apresentou resultados para a concentração média de vitamina C (6,87  $\mu\text{g/mL}$ ) no plasma de 2115 adultos com risco elevado de terem DMT2. O valor médio descrito pelo autor é um pouco superior ao obtido no nosso estudo para o grupo de não diabéticos (grupo III: 5,15  $\mu\text{g/mL}$ ).

As concentrações médias de luteína e  $\beta$ -criptoxantina foram também avaliadas e comparadas entre os três grupos. Após o ajuste para as variáveis de confundimento, verificou-se que as concentrações médias de luteína e  $\beta$ -criptoxantina no soro foram significativamente superiores no grupo controlo em relação aos dois grupos de diabéticos. É ainda de salientar que para a  $\beta$ -criptoxantina, o valor médio obtido no grupo III foi pelo menos 2 vezes superior ao verificado nos outros dois grupos. A informação disponível sobre os níveis séricos destes dois carotenóides em diabéticos tipo 2 é escassa, no entanto num estudo realizado por Coyne *et al.* (412) foram avaliados os níveis séricos de carotenóides neste tipo de doentes. Os resultados obtidos para a luteína foram inferiores (mediana no percentil 50 = 0,42  $\mu\text{M}$ ) aos valores médios

descritos para todos os grupos do nosso trabalho (grupo I: 0,721  $\mu$ M vs. grupo II: 0,724  $\mu$ M vs. grupo III: 0,784  $\mu$ M). Em relação à  $\beta$ -criptoxantina, os resultados apresentados por Coyne *et al.* (411) foram semelhantes (mediana no percentil 50 = 0,21  $\mu$ M) aos determinados no presente trabalho de investigação para os dois grupos de diabéticos (grupo I: 0,171  $\mu$ M vs. grupo II: 0,153  $\mu$ M). Num outro estudo epidemiológico realizado por Olmedilla *et al.* (413) foram avaliadas as concentrações de carotenóides em 349 adultos saudáveis de 5 países Europeus (Espanha, França, Irlanda do Norte, República da Irlanda e Holanda). De todos os adultos avaliados, foram os participantes de Espanha (0,28  $\mu$ M) e em França (0,365  $\mu$ M) que apresentaram concentrações médias de luteína mais elevadas. No entanto os referidos valores são muito inferiores às concentrações médias de luteína obtidas para todos os grupos do nosso estudo, o que sugere um maior consumo de vegetais de folha verde, já que a luteína é actualmente considerado um indicador da ingestão deste tipo de vegetais (414) e diferentes padrões de consumo poderão originar variações nos níveis plasmáticos deste carotenóide. No que se refere à  $\beta$ -criptoxantina, os níveis médios plasmáticos mais elevados foram observados nos participantes de Espanha (0,41  $\mu$ M) e Holanda (0,31  $\mu$ M), sendo que, os referidos valores são muito semelhantes aos determinados no nosso trabalho para o grupo controlo (0,38  $\mu$ M). De acordo com o estudo de Jansen *et al.* (414), a  $\beta$ -criptoxantina é o melhor marcador bioquímico da ingestão de fruta, sendo a sua principal fonte alimentar nos países ocidentais os frutos do grupo dos citrinos (415). A concentração média de  $\beta$ -criptoxantina no grupo III do nosso estudo indica que o padrão de consumo deste tipo de frutos foi semelhante ao reportado por Olmedilla *et al.* (413) para países como a Espanha ou a Holanda.

As vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e o ácido fólico têm uma função preponderante no metabolismo de Hcy. Na maior parte dos tecidos e células, a principal via de conversão da Hcy em metionina é feita através da transferência de um grupo metilo do 5-metiltetrahidrofolato para a Hcy, sendo a reacção catalisada pela MS e tendo como cofactor a vitamina B<sub>12</sub>. A vitamina B<sub>6</sub>, na sua forma metabolicamente activa (PLF) é cofactor da enzima C $\beta$ S que está envolvida no catabolismo da Hcy em sulfato através da via da transulfuração (416). Perante a importância destas vitaminas nas vias de remetilação e transulfuração da Hcy, considerou-se importante avaliar e comparar as concentrações sanguíneas das vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e ácido fólico nos três grupos estudados. Assim, verificou-se que para estas vitaminas as concentrações médias não ajustadas eram semelhantes entre os grupos e que a presença de diabetes tipo 2 e as suas complicações não estavam relacionadas com baixos níveis sanguíneos destas três vitaminas. Após o ajuste das concentrações médias da vitamina B<sub>6</sub> nos três grupos para a possível presença de variáveis de confundimento, não se observaram alterações significativas e mantiveram-se os níveis séricos semelhantes entre os grupos (grupo I: 42,4 nM vs. grupo II: 52,1 nM vs. grupo III: 52,4 nM). No entanto e apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre os níveis médios de vitamina B<sub>6</sub> nos grupos em estudo, a prevalência de participantes com baixos níveis plasmáticos de vitamina B<sub>6</sub> foi superior 30% em todos os grupos e em concordância com essa

prevalência verificou-se também que a inadequação da ingestão de vitamina B<sub>6</sub> foi cerca de 40% na população estudada. As concentrações médias plasmáticas de vitamina B<sub>6</sub> obtidas neste estudo de investigação foram inferiores aos valores descritos por Ahn *et al.* (417) num estudo epidemiológico do tipo caso-controlo realizado em 64 diabéticos tipo 2 (69,2 nM) e 28 não diabéticos (80 nM). As prevalências da deficiência em vitamina B<sub>6</sub> no plasma (<30 nM) apresentada pelo autor para os dois grupos foram também muito inferiores às obtidas no nosso estudo. Em 2011, Satyanarayana *et al.* (418) avaliaram os níveis plasmáticos de vitamina B<sub>6</sub> no âmbito de um estudo epidemiológico transversal realizado em 105 diabéticos (60 com retinopatia e 45 sem retinopatia) e 45 controlos. As concentrações médias de vitamina B<sub>6</sub> obtidas para o grupo dos diabéticos sem retinopatia (49,0 nM) e dos controlos sem diabetes (55,1 nM) foram semelhantes às obtidas respectivamente nos grupos II e III do nosso estudo, no entanto a concentração média determinada para o grupo de diabéticos com retinopatia (77,7 nM) foi superior à obtida no grupo I do nosso estudo.

Em relação à vitamina B<sub>12</sub> e após ajustamento para variáveis de confundimento (idade, género, IMC, ingestão diária de energia) foram observadas concentrações médias superiores no grupo I em relação aos outros dois grupos. No entanto para todos os grupos do nosso estudo, as concentrações médias de vitamina B<sub>12</sub> no soro (grupo I: 620 pg/mL vs. grupo II: 529 pg/mL vs. grupo III: 539 pg/mL) foram mais elevadas do que as obtidas no ensaio clínico aleatório duplo cego realizado por Aghamohammadi *et al.* (419) em 68 diabéticos do tipo 2 (501,9 pg/mL). Os nossos resultados foram também superiores aos referidos por Pflipsen *et al.* (419) (470 pg/mL) num estudo transversal desenvolvido com o objectivo de avaliar a prevalência da deficiência de vitamina B<sub>12</sub> em 195 diabéticos do tipo 2. No nosso estudo epidemiológico, a prevalência da deficiência de vitamina B<sub>12</sub> na população diabética e não diabética avaliada foi muito baixa, tendo variado de 1,4% para o grupo I até 2,7% para o grupo II. Contrariamente, Pflipsen *et al.* (420) obteve uma prevalência de deficiência desta vitamina muito mais elevada (22%), provavelmente devido a uma menor ingestão diária desta vitamina, e ao facto do valor de referência (<350 pg/mL) considerado para avaliar a deficiência em vitamina B<sub>12</sub> ser superior ao definido no nosso estudo (<200 pg/mL) (343).

A concentração média de ácido fólico no soro após o ajustamento para possíveis variáveis de confundimento (idade, género, IMC, ingestão diária de energia, ingestão diária de metionina e de ácido fólico) foi superior no grupo I (10,7 ng/mL) em relação ao grupo III (9,32 ng/mL). Uma possível justificação para esse facto é que o grupo I foi dos três grupos o que teve a maior ingestão média diária de energia e o grupo III a menor. No entanto nenhum dos participantes no estudo apresentou baixos níveis séricos de ácido fólico. Os valores médios obtidos no nosso estudo para o ácido fólico nos diabéticos tipo 2 foram superiores aos descritos por Aghamohammadi *et al.* (419) (diabéticos do grupo de intervenção: 5,8 ng/mL e diabéticos do grupo controlo: 6,1 ng/mL), Satyanarayana *et al.* (418) (diabéticos com retinopatia: 7,2 ng/mL e diabéticos sem retinopatia: 7,8 ng/mL) e De Chiara *et al.* (421) (6,1 ng/mL), mas inferiores aos

apresentados por Pflipsen *et al.* (420) (17,7 ng/mL). Em relação à concentração média de ácido fólico obtida para o grupo controlo (III), Satyanarayana *et al.* (418) descrevem valores semelhantes (10,0 ng/mL) aos obtidos no nosso estudo. No nosso estudo nenhum dos participantes apresentou concentrações séricas de ácido fólico inferiores aos valores recomendados (339). No entanto, deficiências enzimáticas ao nível do metabolismo do folato poderão ser responsáveis pela elevação dos níveis plasmáticos da Hcy. Um exemplo disso é a deficiência em dihidrofolato redutase, enzima responsável pela conversão de dihidrofolato em tetrahydrofolato (191). O dihidrofolato pode provir directamente de alimentos fortificados com ácido fólico ou do 5,10-metilenotetrahydrofolato (forma natural), mas a sua acumulação na célula por défice da enzima dihidrofolato redutase poderá originar hiperhomocisteinemia. Adicionalmente a deficiência nesta enzima inibe também a regeneração da tetrahydrobiopteridina (BH4) a partir da 7,8-dihydrobiopteridina (BH2). A forma reduzida da biopteridina (BH4) funciona como cofactor da óxido nítrico sintetase endotelial, enquanto a sua forma oxidada (BH2) é inactiva na função de cofactor da mesma enzima. Este facto significa que na presença de um elevado grau de *stress* oxidante (ex. diabetes ou aterosclerose), a actividade da óxido nítrico sintetase endotelial está diminuída, o que favorece a disfunção endotelial (422). Assim, embora não tenha sido observada deficiência de folato sérico na população avaliada, a presença de um possível polimorfismo genético da enzima dihidrofolato redutase poderá ser a causa da relevante prevalência de hiperhomocisteinemia verificada na população diabética estudada, especialmente nos diabéticos do grupo I.

De um modo geral poderá dizer-se que em relação à prevalência de baixos níveis de vitaminas cofactores do metabolismo da Hcy, apenas a vitamina B<sub>6</sub> apresentou uma prevalência relevante (>30% em todos os grupos) na população estudada e que não será a causa para a presença de uma prevalência muito superior de hiperhomocisteinemia nos diabéticos do tipo 2 com angiopatia (grupo I: 20%) em relação aos diabéticos tipo 2 sem angiopatia (grupo II: 8,7%) ou aos participantes não diabéticos (grupo III: 0,71%). No entanto, a prevalência de níveis baixos de vitamina B<sub>6</sub> poderá contribuir para a acumulação de Cys no plasma e para o aparecimento e progressão de retinopatia nos diabéticos avaliados. O PLF é actualmente reconhecido como um activo inibidor da glicação avançada (423). Alguns estudos experimentais em ratos diabéticos têm demonstrado que o PLF (principal forma activa da vitamina B<sub>6</sub> no plasma) tem um efeito inibidor na progressão da retinopatia (424) e que PXN protege a retina de alterações patológicas (425). Apesar destes factos, poucos estudos epidemiológicos têm sido realizados com o objectivo de procurar uma evidência científica que comprove a causalidade entre a deficiência plasmática de vitamina B<sub>6</sub> e a presença de retinopatia. No entanto, num estudo desenvolvido por Ellis *et al.* (426) foi observada ausência de retinopatia em diabéticos tratados com vitamina B<sub>6</sub> e com base nos resultados obtidos foi considerada a possibilidade da deficiência em vitamina B<sub>6</sub> ser uma causa molecular da retinopatia na diabetes *mellitus*. Num estudo recente realizado por Satyanarayana *et al.* (418) foi sugerida a possível associação

entre deficiência em vitamina B<sub>12</sub> e a hiperhomocisteinémia na retinopatia diabética. No entanto para a vitamina B<sub>6</sub> não existem estudos publicados, em revistas indexadas que investiguem a possibilidade da deficiência em PLF poder ser um factor de risco independente da retinopatia diabética, sendo necessário no futuro a realização de estudos epidemiológicos que comprovem a relação causal entre o PLF e a retinopatia diabética.

Existe um grande número de evidências epidemiológicas que têm associado a hiperhomocisteinémia e a DCV (427), no entanto são poucos os estudos que consideram a Cys um factor de risco independente da DCV (156,260). Em 2005, Hoogeveen *et al.* (261) demonstrou num estudo de coorte que a hiperhomocisteína estava independentemente relacionada com a mortalidade a cinco anos e que enquanto factor de risco, os níveis elevados de Hcy parecem ser mais importantes na mortalidade dos diabéticos tipo 2 do que nos indivíduos não diabéticos. O nosso estudo permitiu obter novos dados de causalidade entre a hiperhomocisteinémia e a DCV em diabéticos do tipo 2 com e sem angiopatia. A probabilidade dos diabéticos do tipo 2 com angiopatia terem hiperhomocisteinémia foi cerca de 2,9 vezes superior à dos diabéticos sem angiopatia e 35,3 vezes maior do que nos indivíduos não diabéticos (grupo III). Em relação ao grupo dos diabéticos sem angiopatia foi também estimado que o risco de terem níveis elevados de Hcy seria cerca de 12,3 vezes superior em relação aos participantes não diabéticos. A relação causal da elevação das concentrações sanguíneas de Cys e MAD e da diminuição dos níveis plasmáticos de AA com a diabetes do tipo 2 foi também avaliada. No que se refere à Cys nada se pode concluir em relação ao efeito isolado da presença de DMT2, isto porque, não foi possível fazer o cálculo do OR por não existirem participantes no grupo III com hipercisteinémia. No entanto verificou-se que o efeito isolado da presença de angiopatia não contribuiu de forma significativa para a alteração das concentrações plasmáticas deste aminotiol.

Em relação ao MAD e ao AA, verificou-se que os diabéticos do tipo 2 com angiopatia tinham uma probabilidade 5,33 vezes maior de ter níveis elevados de MAD e 3,31 vezes superior de ter hipovitaminose C em comparação com o grupo III. Já os diabéticos do grupo II apresentaram concentrações séricas de MAD elevadas com uma frequência 4,2 vezes superior e baixos níveis plasmáticos de AA cerca de 3 vezes maiores do que os observados no grupo dos não diabéticos. Este resultados indicam que o efeito combinado da presença de angiopatia e DMT2 nos participantes aumentou o risco de terem níveis elevados de MAD mas não a probabilidade de ocorrência de hipovitaminose C. Em relação aos níveis plasmáticos de AA, o efeito isolado da presença de DMT2 parece ser determinante no aumento do risco de hipovitaminose C.

De acordo com o conhecimento actual não existe nenhum estudo publicado (em revistas indexadas) em diabéticos do tipo 2 com e sem angiopatia que tenha avaliado simultaneamente a probabilidade de ocorrência da alteração nos níveis sanguíneos de Hcy, Cys, MAD e AA e com o qual possamos comparar os resultados obtidos no nosso estudo.

### 5.5. Associação dos níveis plasmáticos da homocisteína e cisteína com os outros compostos bioquímicos

A evidência de que existe uma associação entre a hiperhomocisteinémia e diversas doenças crónicas (ex. cardiovasculares e doenças neurodegenerativas) tem vindo a ser demonstrada por diversos estudos epidemiológicos realizados aos longo dos últimos anos (428,429). No entanto existem pouco estudos em diabéticos do tipo 2 que relacionem os níveis plasmáticos da Hcy com micronutrientes que desempenham uma função preponderante no metabolismo deste composto aminorotol e que de algum modo poderão estar positiva ou negativamente associados com o aumento ou diminuição da concentração plasmática da Hcy. No presente estudo foram avaliadas de forma sistemática as possíveis associações da Hcy com Cys, MAD, vitaminas antioxidantes e compostos bioactivos, bem como, com vitaminas cofactores do metabolismo da Hcy.

Assim, verificou-se que para a população de diabéticos tipo 2 avaliada ( $n = 150$ ), a Hcy estava fortemente associada com a Cys ( $r = 0,776$ ;  $p < 0,01$ ) e moderadamente com o MAD ( $r = 0,465$ ;  $p < 0,01$ ). Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos por Amany *et al.* (2008) num estudo epidemiológico transversal realizado na Noruega em 7038 adultos e em que foi observada uma associação positiva entre os níveis plasmáticos de Hcy e Cys ( $r = 0,37$ ;  $p = 0,01$ ) (430). No entanto essa associação não foi tão evidente como a verificada no nosso estudo, o que poderá ser justificado pelo facto de a população não ser diabética. De acordo com o conhecimento actual não existem estudos epidemiológicos em diabéticos do tipo 2 que correlacionem os níveis plasmáticos de Hcy e Cys. No entanto a Cys tem vindo a ser testada como um possível suplemento alimentar para a melhoria do controlo glicémico em diabéticos tipo 2 (431,432), sendo por isso importante conhecer a relação entre os níveis plasmáticos destes dois aminorotóis que são actualmente considerados factores independentes do risco cardiovascular (203). Em relação ao MAD, num trabalho de investigação desenvolvido por Ozdemir *et al.* (2005) em 48 diabéticos tipo 2, foi também demonstrada uma associação positiva e moderada entre os níveis plasmáticos de Hcy e MAD ( $r = 0,549$ ;  $p < 0,0001$ ) (433).

Diversos estudos têm demonstrado uma associação inversa entre a ingestão de vitaminas antioxidantes e a DCV (434,435), no entanto a informação deste tipo de associação em diabéticos é controversa (436). Recentemente, Sarmiento *et al.* (437) publicaram uma revisão sistemática da literatura sobre este tema e concluíram que a informação disponível é escassa e heterogénea e que são necessários mais estudos epidemiológicos que permitam esclarecer a função de algumas vitaminas antioxidantes (ex. vitamina A, C e E) no risco cardiovascular em diabéticos. No nosso estudo foi verificada uma associação positiva e fraca entre os níveis plasmáticos de Hcy e os níveis séricos de retinol ( $r = 0,262$ ;  $p < 0,05$ ) e  $\alpha$ -tocoferol ( $r = 0,252$ ;  $p < 0,01$ ). Contrariamente, Brazionis *et al.* (438) avaliaram os níveis plasmáticos de retinol em 441 Australianos não diabéticos e verificaram que o retinol plasmático estava inversamente associado com a incidência de mortalidade a cinco anos por DCV. No entanto

neste estudo não foram avaliados os níveis plasmáticos de Hcy ou Cys. Num outro estudo do tipo caso-controlo prospectivo, realizado por Costacou *et al.* (436) em 54 diabéticos do tipo I e 67 controlos foi demonstrado que concentrações séricas mais elevadas de  $\alpha$ -tocoferol estavam associadas com menor risco de doença arterial coronária em diabéticos do tipo I com nefropatia ou que faziam suplementação vitamínica. A conclusão do estudo de Costacou *et al.* (436) não é concordante com as associações estabelecidas no nosso estudo entre a Hcy e o retinol e entre a Hcy e o  $\alpha$ -tocoferol, no entanto é de referir que a DCV tem uma etiologia multifactorial e que os níveis de  $\alpha$ -tocoferol foram analisados numa população de diabéticos tipo I com uma média de idades de 28 anos. No nosso estudo foi também observada uma relação inversa entre a hiperhomocisteinémia e os níveis plasmáticos de AA ( $r = -0,344$ ;  $p < 0,01$ ), luteína ( $r = -0,331$ ;  $p < 0,01$ ) e  $\beta$ -criptoxantina ( $r = -0,295$ ;  $p < 0,01$ ). Em relação ao AA, Gariballa *et al.* (438), descrevem um ensaio clínico aleatório duplo cego em 100 diabéticos tipo 2. Foram constituídos 2 grupos, intervenção ( $n = 50$ ) e controlo ( $n = 50$ ). O grupo de intervenção foi sujeito a suplementação oral com vitaminas antioxidantes (vitaminas C e E) e vitaminas do complexo B envolvidas no metabolismo da Hcy (vitaminas B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico). No início do estudo e ao fim de três meses foram medidos e avaliados os níveis plasmáticos Hcy nos grupos de intervenção e controlo. Os autores concluíram que a suplementação vitamínica permitiu aumentar a concentração sérica de vitamina E e ácido fólico e diminuir a concentração plasmática Hcy no grupo de intervenção comparativamente com o grupo controlo. Colocaram também a hipótese que o tipo de suplementação utilizado poderia aumentar a capacidade antioxidante e ter um efeito anti-inflamatório em diabéticos obesos. Embora a suplementação oral utilizada neste estudo não tenha sido unicamente com vitamina C, os resultados obtidos por Gariballa *et al.* (439) sugerem que poderá existir uma relação inversa entre os níveis plasmáticos de vitamina C e Hcy. Num estudo epidemiológico transversal realizado em 8335 adultos por Floegel *et al.* (440) foi também concluído que a ingestão de vitamina C estava inversamente relacionada com os níveis plasmáticos. Em 2008, Cascalheira *et al.* (441) avaliaram os níveis séricos de Hcy em 20 homens e 60 mulheres com idades superiores a 50 anos e também observaram a presença de uma associação inversa ( $r = -0,30$ ,  $p < 0,05$ ) entre a Hcy e os níveis séricos de ascorbato (forma ionizada do AA).

As concentrações plasmáticas de carotenóides têm vindo a ser utilizadas em diferentes grupos populacionais como indicadores do estado de saúde e risco de aparecimento de doenças crónicas (442). Têm sido descritos alguns estudos que relacionam a concentração plasmática de carotenóides com a diabetes (443), no entanto até ao momento não se conhece qualquer estudo com resultados que relacione a luteína e  $\beta$ -criptoxantina com a Hcy e Cys em diabéticos do tipo 2. O nosso estudo permitiu obter novos dados que associam inversamente as concentrações séricas desses carotenóides com as concentrações plasmáticas de Hcy e Cys em diabéticos do tipo 2. Pela primeira vez foi também observado que os níveis plasmáticos de Cys estavam inversamente relacionados com o AA ( $r = -0,376$ ;  $p < 0,01$ ) e positivamente

associados aos níveis séricos de MAD ( $r = 0,454$ ;  $p < 0,01$ ), retinol ( $r = 0,196$ ;  $p < 0,01$ ) e  $\alpha$ -tocoferol ( $r = 0,405$ ;  $p < 0,01$ ) em diabéticos do tipo 2.

Para as vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e ácido fólico, após a aplicação de um modelo de regressão linear simples apenas foi verificada uma associação inversa significativa mas negligenciável ( $r < 0,2$ ) entre a vitamina B<sub>12</sub> e a Hcy ( $r = -0,122$ ;  $p < 0,05$ ). No que diz respeito ao ácido fólico, os resultados do nosso estudos não estão de acordo com os descritos por Samman *et al.* (444) que descrevem uma associação inversa moderada entre os folatos e a Hcy plasmática ( $r = -0,40$ ;  $p < 0,001$ ) após um período de suplementação oral com cápsulas que continham uma mistura de frutos e um concentrado de vegetais em homens adultos. Em 2007, Sonsin *et al.* (445) avaliaram os níveis plasmáticos de Hcy, vitamina B<sub>12</sub> e de folatos numa população multi-étnica com insuficiência cardíaca ( $n = 112$ ) e nos respectivos controlos ( $n = 131$ ). Os autores também descrevem uma correlação inversa entre o logaritmo dos níveis plasmáticos de Hcy e o logaritmo das concentrações plasmáticas de vitamina B<sub>12</sub> ( $r = -0,343$ ;  $p = 0,007$ ) e de folatos ( $r = -0,324$ ;  $p = 0,013$ ). Os dois estudos descritos foram realizados em populações não diabéticas, no entanto em 2011, Satyanarayana *et al.* (418) num estudo epidemiológico do tipo caso-controlo em 300 diabéticos do tipo 2 e 100 controlos, observaram uma associação inversa significativa da Hcy com a vitamina B<sub>12</sub> ( $r = -0,485$ ;  $p < 0,001$ ) e com o ácido fólico ( $r = -0,323$ ;  $p = 0,002$ ), mas não com a vitamina B<sub>6</sub> ( $r = -0,137$ ;  $p = 0,383$ ). Al-Maskari *et al.* (446) num outro estudo caso-controlo em 50 diabéticos do tipo 2 e 50 controlos concluíram que a baixa ingestão de folatos e de vitamina B<sub>12</sub> estava associada com os seus baixos níveis séricos e com a hiperhomocisteinémia em diabéticos do tipo 2. Nos últimos anos são vários os estudos descritos que avaliam o efeito isolado da suplementação com ácido fólico ou combinada com outras vitaminas do complexo B envolvidas no metabolismo da Hcy. Um desses estudos foi realizado por Gariballa *et al.* (439) e os seus resultados demonstraram que a suplementação com ácido fólico, vitaminas B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> aumentava a capacidade antioxidante e poderia ter um efeito anti-inflamatório em diabéticos obesos. Em 2011, Aghamohammadi *et al.* (419) desenvolveram um ensaio clínico aleatório duplo cego em diabéticos do tipo 2, tendo observado que a suplementação com ácido fólico no grupo de intervenção levou à diminuição da concentração plasmática de Hcy e ao aumento de folatos e vitamina B<sub>12</sub>. No mesmo ano Rafnsson *et al.* (447) numa revisão sistemática da literatura sobre a hipótese de vitamina B<sub>12</sub> ser um factor de risco independente da DCV e da diabetes concluíram que existe pouca evidência de que a deficiência em vitamina B<sub>12</sub> predisponha para o risco de DCV e diabetes no adulto e que os dados disponíveis não sustentavam a ideia de que a suplementação com esta vitamina reduzia o risco de DCV e diabetes. Em 2012, Sudchada *et al.* (448) numa meta-análise concluíram que a suplementação com ácido fólico em diabéticos do tipo 2 poderia reduzir os níveis plasmáticos de Hcy e observaram uma tendência para essa suplementação estar associada com um melhor controlo glicémico. No nosso estudo não foi possível associar de forma independente e significativa os

níveis plasmáticos da Hcy com o ácido fólico e com a vitamina B<sub>6</sub> e a associação verificada entre a Hcy e a vitamina B<sub>12</sub> teve uma força de associação menor do que a observada por outros autores (418,445,449). Em relação à vitamina B<sub>6</sub>, Satyanarayan *et al.* (2011) descrevem também uma associação inversa não significativa com os níveis plasmáticos de Hcy (418). No entanto após a aplicação de um modelo de regressão linear múltipla foi possível estabelecer uma relação inversa dos níveis plasmáticos de Hcy ( $r = -0,368$ ;  $p < 0,001$ ) com os níveis séricos de ácido fólico ( $\beta = -0,276$ ;  $t = -3,435$ ;  $p = 0,001$ ) e de vitamina B<sub>12</sub> ( $\beta = -0,201$ ;  $t = -2,490$ ;  $p = 0,014$ ) na população de diabéticos do tipo 2 estudada.

Perante a informação científica disponível, o presente estudo é o primeiro a relacionar simultaneamente os níveis plasmáticos de Cys com as concentrações de MAD, retinol,  $\alpha$ -tocoferol, AA, luteína,  $\beta$ -criptoxantina, vitamina B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e ácido fólico em diabéticos do tipo 2. Assim, após a aplicação de uma regressão linear múltipla verificou-se que a Cys estava associada com os níveis séricos de MAD ( $\beta = 0,285$ ;  $t = 4,83$ ;  $p < 0,001$ ),  $\alpha$ -tocoferol ( $\beta = 0,351$ ;  $t = 6,35$ ;  $p < 0,001$ ), retinol ( $r = 0,196$ ;  $p < 0,01$ ), AA ( $\beta = -0,155$ ;  $t = -2,64$ ;  $p = 0,009$ ) e luteína ( $\beta = -0,262$ ;  $t = -4,39$ ;  $p < 0,001$ ). No entanto a correlação linear independente verificada entre a Cys e a  $\beta$ -criptoxantina ( $r = -0,362$ ;  $p < 0,01$ ) não contribuiu de forma significativa para o modelo múltiplo aplicado ( $\beta = -0,076$ ;  $t = -1,211$ ;  $p = 0,227$ ). O mesmo aconteceu com a associação significativa ( $r = 0,196$ ;  $p < 0,01$ ) mas negligenciável verificada entre a Cys e o retinol ( $\beta = 0,026$ ;  $t = 0,454$ ;  $p = 0,650$ ). No que diz respeito às vitaminas envolvidas no metabolismo da Hcy analisadas (vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e ácido fólico), não foram observadas associações com os níveis plasmáticos de Cys. Em 2009, Casais *et al.* (450) num estudo realizado com 164 doentes que tiveram uma trombose verificou-se que os níveis plasmáticos de Cys e de folatos não estavam correlacionados.

#### 5.6. Associação dos níveis plasmáticos da homocisteína e cisteína com o estado nutricional e clínico

A relação dos níveis plasmáticos de Hcy e Cys com o estado nutricional e clínico da população não é habitualmente avaliada de uma forma completa e sistemática nos estudos epidemiológicos. No presente trabalho de investigação foram observadas associações significativas ( $p < 0,01$ ) entre os níveis plasmáticos da Hcy e Cys com o peso ( $r = 0,415$ ;  $r = 0,428$ ), IMC ( $r = 0,448$ ;  $r = 0,521$ ), PA ( $r = 0,428$ ;  $r = 0,433$ ), prega cutânea subescapular ( $r = 0,211$ ;  $r = 0,284$ ), GC em quilogramas ( $r = 0,242$ ;  $r = 0,295$ ), água corporal total em litros ( $r = 0,394$ ;  $r = 0,336$ ), triglicéridos ( $r = 0,360$ ;  $r = 0,413$ ), C-HDL ( $r = -0,354$ ;  $r = -0,267$ ) e PAS ( $r = 0,301$ ;  $r = 0,373$ ). Nos últimos anos têm sido publicados alguns estudos epidemiológicos que descrevem uma associação positiva entre os níveis plasmáticos de Hcy e Cys com os principais factores antropométricos que determinam a obesidade. Em 2012, Rekha *et al.* (451) observaram uma correlação moderada entre as concentrações plasmáticas de Hcy e o IMC

( $r = 0,430$ ;  $p < 0,001$ ) em 90 mulheres inférteis obesas, com excesso de peso e normoponderais. No mesmo ano, Shin (452) correlacionou de forma positiva a Hcy com o peso corporal ( $r = 0,352$ ;  $p < 0,001$ ), IMC ( $r = 0,177$ ;  $p = 0,001$ ) e PA ( $r = 0,269$ ;  $p < 0,001$ ) em 398 adultos que participaram num programa de *check-up* médico. Vayá *et al.* (453), considerando que a relação entre a obesidade e a hiperhomocisteinémia era ainda muito controversa e que necessitava de ser clarificada, realizaram um estudo em 66 doentes com obesidade mórbida em que demonstraram que a obesidade abdominal era um preditor independente da hiperhomocisteinémia. Em 2008, Elshorbagy *et al.* (429) avaliaram a relação dos níveis plasmáticos da Cys com a composição corporal em adultos saudáveis. Foram observadas correlações significativas da Cys com IMC ( $r = 0,28$ ;  $p < 0,001$ ;  $n = 7038$ ) e com GC em quilogramas ( $r = 0,26$ ;  $p < 0,001$ ;  $n = 5179$ ), mas não com a massa magra em quilogramas ( $r = 0,02$ ;  $p = 0,20$ ). Numa revisão sistemática da literatura científica, Elshorbagy *et al.* (454) resumem alguns estudos epidemiológicos em que foi observada uma correlação positiva entre a Cys e IMC. Os autores concluíram que no futuro seriam necessários mais estudos de base populacional que avaliem a relação da Cys com a GC. Deste modo os resultados do nosso estudo permitiram aumentar evidência científica de que a Cys poderá ser um novo factor de risco para a obesidade.

Vários estudos epidemiológicos têm associado a hiperhomocisteinémia com a hipertensão sistólica em diferentes grupos populacionais (455-457), no entanto a causalidade desta associação é ainda controversa (458) já que as evidências indicam que a concentração plasmática de Hcy não é um dos principais factores de risco para a incidência de hipertensão (459) e em grandes estudos de intervenção têm sido obtidos resultados contraditórios no que se refere à capacidade das dietas alimentares diminuírem os níveis plasmáticos de Hcy e a pressão arterial. Os resultados obtidos do presente estudo de base populacional aumentaram a evidência científica de que existe uma associação moderada entre a hiperhomocisteinémia e a pressão arterial sistólica em adultos caucasianos diabéticos do tipo 2 e não diabéticos.

A associação da Cys com a hipertensão arterial tem sido recentemente discutida (460-462). Em alguns estudos epidemiológicos tem sido demonstrado que a N-acetilcisteína (análogo estável da Cys) diminui a pressão arterial (462-465). Este facto sustenta a ideia que a Cys ligada à glutatona (tripéptido de glicina, glutamato e Cys) poderá exercer um efeito anti-hipertensivo diminuindo o *stress* oxidante, melhorando a insulino-resistência e o metabolismo da glucose, bem como, impedindo a acumulação de AGEs e modulando os níveis de óxido nítrico e de outras moléculas vasoactivas (462). Habitualmente os níveis plasmáticos de glutatona e de AA estão diminuídos em hipertensos (466). A suplementação alimentar com AA diminui a pressão arterial e favorece o aumento dos níveis de glutatona e de Cys ligada nos tecidos (462). No entanto foi demonstrado por Mills *et al.* (259) num estudo do tipo caso-controlo realizado em 96 doentes cardiovasculares e 33 controlos que os níveis plasmáticos de Cys livre em circulação eram significativamente superiores nos doentes quando comparados com os controlos. Os

resultados deste estudo permitiram concluir que a presença de níveis elevados de Cys livre no plasma em doentes cardiovasculares favorecem a formação de um ambiente oxidativo que poderá aumentar a susceptibilidade à lesão vascular. A associação positiva entre os níveis plasmáticos de Cys e a PAS observada no nosso estudo permitiu aumentar a evidência científica de que existe uma relação entre a hipercisteinémia e o risco de hipertensão sistólica em adultos com ou sem diabetes do tipo 2. Para além disso, foi possível verificar que os diabéticos do tipo 2 estudados apresentaram uma prevalência elevada de baixos níveis de AA no plasma o que poderá contribuir para terem maiores concentrações de Cys livre no plasma. Em concordância com os resultados apresentados no nosso estudo, o C-HDL têm vindo a ser associado com a Hcy. Em 2011, Xiao *et al.* (467) observaram uma correlação negativa entre os níveis plasmáticos de Hcy e as concentrações séricas de C-HDL ( $r = -0,148$ ;  $p < 0,001$ ). Os autores Ni *et al.* (468) descrevem também uma associação significativa ( $p = 0,012$ ) entre a Hcy e o C-HDL em 138 adultos com doença arterial coronária e 99 controlos com angiograma coronário normal. Em 2009, Taskinen *et al.* (469) realizaram um ensaio clínico aleatório duplo cego em 3065 diabéticos do tipo 2 e 2363 controlos e verificaram que existia uma associação inversa entre a concentração plasmática de Hcy e os níveis séricos de C-HDL em ambos os grupos (intervenção:  $p = 0,0001$ ; controlo:  $p = 0,07$ ).

### 5.7. Associação dos níveis plasmáticos da homocisteína e cisteína com a ingestão alimentar

A ingestão de nutrientes provenientes da dieta alimentar pode influenciar os níveis plasmáticos de Hcy e Cys (470), especialmente na população diabética em que a adopção de uma alimentação adequada é uma das principais estratégias a seguir no tratamento desta doença crónica (150,471,472). Actualmente existe pouca informação sobre a relação da ingestão alimentar com os níveis plasmáticos de Hcy e Cys, especialmente em diabéticos do tipo 2. No presente trabalho de investigação foi avaliada a relação entre as concentrações plasmáticas de Hcy e Cys com a ingestão diária de nutrientes na população em estudo. Assim, verificou-se que a Hcy estava correlacionada de forma significativa ( $p < 0,01$ ) com a gordura polinsaturada ( $r = 0,269$ ), ácidos gordos ómega-3 ( $0,257$ ), ácido linolénico ( $r = 0,330$ ), lisina ( $r = 0,232$ ) e metionina ( $r = 0,211$ ). No que se refere à Cys foram também observadas associações significativas ( $p < 0,01$ ) com a proteína ( $r = 0,212$ ), colesterol ( $r = 0,282$ ), ácidos gordos ómega-3 ( $r = 0,300$ ), ácido linolénico ( $r = 0,394$ ), lisina ( $r = 0,262$ ) e metionina ( $r = 0,239$ ). Todas as outras correlações significativas da Hcy e Cys com a ingestão de outros nutrientes tiveram uma magnitude inferior a 0,20, o que significa que a força entre as duas variáveis é insignificante e por isso não foi considerada.

A elevada toxicidade da metionina nos humanos foi previamente comprovada (473), bem como, o efeito aterogénico de elevadas ingestões deste aminoácido (474). No entanto, no ensaio clínico aleatório realizado em 65 adultos com excesso de peso, Haulrik *et al.* (475) concluíram que dietas alimentares com elevado teor de proteína e metionina não originavam

um aumento dos níveis plasmáticos de Hcy em relação às dietas com baixo teor de proteína e metionina. Em concordância com estes resultados, Ward *et al.* (476) concluíram que o aumento da ingestão de metionina apenas causaria um aumento na concentração plasmática de Hcy em jejum se a ingestão fosse cinco vezes superior à ingestão habitual ( $0,95 \pm 0,51$  mg/dia) e que a Hcy plasmática não era afectada por alterações a longo prazo na ingestão alimentar de metionina. Contrariamente, Guttormsen *et al.* (477) verificaram que uma refeição rica em proteína (especialmente de origem animal) pode aumentar os níveis plasmáticos de Hcy pelo menos durante 8 horas e que a presença de hiperhomocisteinémia está associada ao aumento da Cys livre no plasma. A evidência epidemiológica da relação entre a ingestão alimentar de metionina e os níveis plasmáticos de Hcy em diabéticos é muito limitada (478-480), deste modo os resultados do nosso estudo contribuem para sustentar a ideia de que existe uma associação entre a metionina da dieta alimentar e as concentrações plasmáticas de Hcy e Cys.

A ingestão de frutos e legumes tem vindo a ser inversamente associada com o risco de doenças crónicas (289), nomeadamente de DCV (481). No entanto o efeito da ingestão de frutos e legumes na diminuição do risco de aparecimento de diabetes é ainda inconclusivo (482-484). A relação da ingestão diária de frutos e legumes com a concentração de Hcy e Cys no plasma tem vindo a ser amplamente discutida (290,444,485). Num estudo epidemiológico descrito por Diakoumopoulou *et al.* (486) realizado em 126 diabéticos do tipo 2 e 76 controlos concluiu-se que o consumo de frutos e legumes é um determinante forte e independente dos níveis plasmáticos de Hcy. Em 2007, Chang *et al.* (487), descrevem uma relação inversa dos níveis plasmáticos de Hcy com a ingestão de frutos em diabéticos do tipo 2 (OR = 0,155;  $p < 0,05$ ). Em 2008, Zarini *et al.* (488) realizaram um estudo epidemiológico em 182 diabéticos do tipo 2 e 166 não diabéticos em que concluíram que elevadas ingestões de frutos e legumes estavam associadas com concentrações menores de Hcy no plasma. No entanto esta associação foi apenas significativa ( $p = 0,034$ ) no grupo dos não diabéticos. Contrariamente a estes resultados, no nosso estudo a relação observada entre a ingestão de frutos e legumes e as concentrações de Hcy ( $r = 0,037$ ;  $p = 0,527$ ) e de Cys ( $r = 0,058$ ;  $p = 0,325$ ) no plasma não foi significativa, o que poderá ser justificado pelo facto de que na população avaliada a média de ingestão diária de frutos e legumes em todos os grupos foi superior (grupo I: 411 mg/dia; grupo II: 454 mg/dia; grupo III: 402 g/dia) ao valor mínimo diário (400 g/dia) recomendado pela OMS para prevenir o aparecimento de doenças crónicas (489).

#### 5.8. Associação entre o stress oxidante, antioxidantes alimentares, estado nutricional e clínico

A presença de um elevado grau de *stress* oxidante tem vindo a ser associada com a etiologia de diversas doenças crónicas (490). O MAD tem uma função importante na modificação oxidativa do C-LDL e é o principal produto final da peroxidação dos ácidos araquidónico, EPA e DHA. As LDL oxidadas resultam da interacção entre aldeídos como o MAD e os resíduos de

lisina na apoB-100 das LDL. Estas lipoproteínas oxidadas induzem a aterosclerose e aterotrombose (491). A peroxidação lipídica das estruturas celulares é um processo importante no desenvolvimento da aterosclerose e das complicações da diabetes. A diabetes é uma doença que produz uma alteração no perfil lipídico por maior susceptibilidade à peroxidação lipídica que está associada a um aumento do *stress* oxidante (403). No nosso estudo, o grau de *stress* oxidante foi comparado entre três grupos populacionais avaliados através da medição dos níveis séricos de MAD, no entanto poucos estudos epidemiológicos têm avaliado possíveis associações do MAD com antioxidantes alimentares ou com indicadores do estado nutricional e clínico das populações estudadas (491-495). Assim, no nosso estudo verificou-se que os níveis séricos de MAD estavam significativamente ( $p < 0,01$ ) associados com o peso ( $r = 0,456$ ), IMC ( $r = 0,421$ ), PA ( $r = 0,419$ ), retinol sérico ( $r = 0,263$ ),  $\alpha$ -tocoferol sérico ( $r = 0,235$ ), AA plasmático ( $r = -0,256$ ), luteína sérica ( $r = -0,237$ ),  $\beta$ -criptoxantina ( $r = -0,289$ ), percentagem de GC ( $r = 0,285$ ), C-HDL ( $r = -0,200$ ), triglicéridos ( $r = 0,319$ ) e PAS ( $r = 0,237$ ). Em 2002, Olusi (496) descreve a presença de uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de MAD e o IMC ( $r = 0,342$ ;  $p = 0,013$ ) num estudo epidemiológico realizado em 250 adultos obesos com diferentes graus de obesidade (IMC: 30-50 kg/m<sup>2</sup>) e 50 normoponderais (IMC: 19,25 kg/m<sup>2</sup>). Um ano depois, Duman *et al.* (493) associam de forma significativa ( $p \leq 0,05$ ) os níveis séricos de MAD com o IMC em 107 diabéticos do tipo 2. O resultado da associação entre o MAD e IMC obtido no nosso estudo está de acordo com os descritos pelos autores, no entanto o grau de associação verificado entre as duas variáveis foi superior no nosso estudo. Em 2009, Lodovici *et al.* (497) realizaram um estudo em diabéticos do tipo 2 com e sem complicações e com um mau controlo metabólico da diabetes, tendo verificado que existia uma correlação positiva dos níveis de MAD com a concentração de C-HDL e vitamina E em todos os participantes. No nosso trabalho de investigação foram obtidos resultados semelhantes aos descritos por Lodovici *et al.* (497) para a vitamina E mas contrários para o C-HDL. Uma correlação positiva significativa ( $p < 0,05$ ) entre os níveis plasmáticos de MAD e de triglicéridos foi apresentada por Altomare *et al.* (498) num estudo epidemiológico realizado em diabéticos do tipo 2 com mau controlo metabólico. No nosso estudo foi também verificada a presença de uma associação positiva entre estes dois parâmetros bioquímicos. Recentemente foi descrito por Qing *et al.* (499) uma relação inversa ( $r = -0,226$ ;  $p < 0,05$ ) entre os níveis séricos de MAD e de luteína em diabéticos do tipo 2. Os resultados do nosso estudo estão de acordo com os descritos por Qing *et al.* (499) e estabelecem também pela primeira vez uma associação inversa entre os níveis séricos de MAD e de  $\beta$ -criptoxantina em adultos portugueses com ou sem diabetes do tipo 2.

As complicações cardiovasculares na diabetes são caracterizadas por uma disfunção endotelial e aceleram o processo de aterosclerose, sendo actualmente a principal causa de morbilidade e mortalidade nos diabéticos do tipo 2 (500). A evidência científica de estudos epidemiológicos sugere que o aumento da formação de radicais livres altamente reactivos provocada pela presença de uma hiperglicémia é a causa de um elevado grau de *stress* oxidante que por sua

vez promove o desenvolvimento e progressão da diabetes e das suas complicações (501). Os radicais livres podem ser eliminados do organismo por um diverso número de mecanismos antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos (502). Muitos estudos têm demonstrado que antioxidantes alimentares (ex. vitamina C, E, A e carotenóides) têm um efeito protector na prevenção da DCV, especialmente quando já existe uma doença crónica prévia como a diabetes (490,503,504). No entanto a disponibilidade de estudos epidemiológicos em diabéticos do tipo 2 que apresentem resultados que associem simultaneamente os antioxidantes alimentares com o estado nutricional e clínico de diabéticos é muito limitada (172). Assim, no nosso estudo são apresentados resultados de associações significativas ( $p < 0,01$ ) do AA plasmático com o IMC ( $r = -0,296$ ), PA ( $r = -0,284$ ), C-HDL ( $r = 0,274$ ), triglicéridos ( $r = -0,308$ ), luteína sérica ( $r = 0,406$ ) e  $\beta$ -criptoxantina sérica ( $r = 0,469$ ). Em 2007, Johnston *et al.* (505) realizaram um estudo epidemiológico transversal em 118 adultos sedentários não fumadores no qual observaram que existia uma relação inversa ( $p < 0,05$ ) entre os níveis plasmáticos de vitamina C com o IMC (Homens:  $r = -0,383$ ; Mulheres:  $r = -0,476$ ), o PA (Homens:  $r = -0,385$ ; Mulheres:  $r = -0,497$ ) e a percentagem de GC (Homens:  $r = -0,394$ ; Mulheres:  $r = -0,461$ ). Em 2012, Garcia *et al.* (506) realizaram um estudo em 580 mulheres de 6 comunidades rurais do México, tendo sido observada a presença de uma associação inversa do AA plasmático com o IMC ( $r = -0,21$ ;  $p < 0,05$ ). Os resultados apresentados no nosso trabalho de investigação estão de acordo com os descritos por Johnston *et al.* (505) e Garcia *et al.* (506). A relação entre as concentrações plasmáticas de AA com os componentes lipídicos foi também previamente avaliada por Hallfrisch *et al.* (507) num estudo realizado em 316 mulheres e 511 homens. Os autores demonstraram que existia uma associação positiva entre os níveis plasmáticos de AA com C-HDL (Homens:  $r = -0,16$ ;  $p < 0,001$ ; Mulheres:  $r = -0,13$ ;  $p < 0,05$ ). A metanálise de 13 ensaios clínicos aleatórios sobre o efeito da suplementação com vitamina C nos níveis séricos de C-LDL e de triglicéridos permitiu concluir que a suplementação com um mínimo de 500 mg/dia de vitamina C durante pelo menos 4 semanas pode resultar na diminuição das concentrações séricas de C-LDL e de triglicéridos, mas não aumenta significativamente os níveis de C-HDL (508). A conclusão da referida metanálise está de acordo com o resultado da associação inversa verificada no nosso estudo entre a vitamina C e os triglicéridos. A associação positiva dos níveis plasmáticos de AA com os níveis séricos de luteína e  $\beta$ -criptoxantina verificada no nosso estudo está de acordo com os resultados apresentados por Schünemann *et al.* (509) em 1616 adultos residentes em Nova Iorque ocidental. Os autores verificaram que existia uma correlação positiva dos níveis plasmáticos de vitamina C com as concentrações séricas de luteína ( $r = 0,13$ ;  $p < 0,01$ ) e  $\beta$ -criptoxantina ( $r = 0,20$ ;  $p < 0,01$ ). De acordo com o nosso conhecimento actual não estão disponíveis estudos epidemiológicos em diabéticos do tipo 2 que correlacionem a vitamina C plasmática com a luteína e  $\beta$ -criptoxantina séricas.

As concentrações de retinol no soro dos participantes foram significativamente ( $p < 0,01$ ) correlacionados com o  $\alpha$ -tocoferol sérico ( $r = 0,249$ ), PA ( $r = 0,203$ ) e com o tempo de evolução da diabetes ( $r = 0,217$ ). Já para o  $\alpha$ -tocoferol sérico foram observadas associações ( $p < 0,01$ ) com o IMC ( $r = 0,244$ ), prega cutânea subescapular ( $r = 0,217$ ) e triglicéridos ( $r = 0,352$ ). A associação destas duas vitaminas lipossolúveis com outros parâmetros bioquímicos e com o estado nutricional e clínico na diabetes do tipo 2 não foi previamente descrita em estudos epidemiológicos publicados em revistas científicas indexadas. No entanto, no estudo de Garcia *et al.* (506) realizado em 580 mulheres de 6 comunidades rurais do México foi avaliada uma possível associação do retinol e  $\alpha$ -tocoferol séricos com o IMC e PA. Os autores verificaram que existia uma correlação positiva e significativa ( $p < 0,05$ ) entre os níveis de  $\alpha$ -tocoferol no soro com o IMC ( $r = 0,26$ ) e PA ( $r = 0,51$ ), mas as correlações do retinol sérico com o IMC ( $r = -0,02$ ) e PA não foram significativas ( $r = -0,01$ ).

A relação dos níveis séricos da luteína e da  $\beta$ -criptoxantina com os outros parâmetros bioquímicos e com o estado nutricional e clínico dos participantes foi avaliada no nosso estudo. Foram observadas associações significativas ( $p < 0,01$ ) das concentrações de luteína no soro com o peso ( $r = -0,362$ ), IMC ( $r = -0,369$ ), PA ( $r = -0,333$ ), prega cutânea subescapular ( $r = -0,210$ ), GC em quilogramas ( $r = -0,267$ ), triglicéridos ( $r = -0,327$ ), PAS ( $r = -0,291$ ), PAD ( $r = -0,205$ ), pulsações ( $r = -0,210$ ),  $\beta$ -criptoxantina sérica ( $r = 0,434$ ) e C-HDL ( $r = 0,349$ ). Uma associação positiva entre a luteína e a  $\beta$ -criptoxantina sérica ( $r = 0,42$ ;  $p < 0,001$ ) foi também observada por Schünemann, *et al.* (509) e semelhante à encontrada no nosso estudo, embora os autores tenham avaliado esta relação na população em geral. No mesmo ano, Bovier *et al.* (510) descreveram um estudo em que é avaliada a relação entre as concentrações séricas da luteína e a percentagem de GC, tendo verificado que a correlação entre os dois parâmetros não era significativa. O mesmo foi observado no nosso estudo, no entanto Bovier *et al.* (510) não correlacionaram a luteína sérica com a GC medida em quilogramas, algo que foi efectuado no nosso trabalho, onde foi observada a presença de uma relação inversa e significativa. Em 2007, num estudo epidemiológico realizado por Waters *et al.* (511) em 22 mulheres pós-menopausa foi estabelecida uma associação negativa dos níveis séricos da luteína com o IMC ( $r = -0,44$ ;  $p < 0,05$ ) e com PA ( $r = -0,45$ ;  $p < 0,05$ ). No nosso trabalho de investigação foi também verificada a presença de correlações negativas da luteína com o IMC e PA, mas as características clínicas da população avaliada no nosso estudo não são idênticas às do estudo de Waters *et al.* (511), sendo necessário no futuro a realização de novos estudos epidemiológicos que permitam aumentar a evidência científica para estas correlações nos diabéticos tipo 2 e na população Portuguesa. A relação dos níveis séricos de luteína com os triglicéridos e com o C-HDL foi também avaliada por Renzi *et al.* (512) em 108 adultos saudáveis, tendo sido verificada uma correlação significativa ( $p < 0,01$ ) para o C-HDL ( $r = 0,36$ ), mas não para os triglicéridos ( $r = -0,01$ ). Já em 2008, Wang *et al.* (513) tinham observado uma associação positiva entre as concentrações de luteína no soro e o C-HDL, num estudo

realizado em 2895 mulheres de meia idade e idosas. Nos estudos epidemiológicos em que foram observadas associações positivas entre a luteína sérica e o C-HDL não foram realizados em diabéticos, deste modo o nosso estudo permitiu aumentar o conhecimento científico neste tipo de população. Num estudo realizado por Hozawa *et al.* (514) foi evidenciado que a concentração sérica de luteína estava inversamente relacionada com a pressão arterial e que os indivíduos com maiores concentrações de carotenóides totais (excepto licopeno) tinham geralmente menor risco de vir a ter hipertensão. Em 2011, Zou *et al.* (515) num estudo do tipo caso-controlo concluíram que a luteína poderia ter uma função protectora no aparecimento de aterosclerose precoce. No nosso trabalho de investigação foram apresentados resultados que estão em concordância com as conclusões obtidas nos estudos de Hozawa *et al.* (514) e Zou *et al.* (515). A  $\beta$ -criptoxantina é um dos cinco carotenóides mais abundantes nos alimentos (516) mas um dos menos avaliados nos estudos epidemiológicos em diabéticos (517,518). No nosso estudo foram observadas associações significativas ( $p < 0,05$  ou  $p < 0,01$ ) da  $\beta$ -criptoxantina com o peso ( $r = -0,374$ ), IMC ( $r = -0,353$ ), PA ( $r = -0,355$ ), C-HDL ( $r = 0,299$ ), HbA1c ( $r = 0,225$ ), triglicéridos ( $r = -0,295$ ), GC em quilogramas ( $r = -0,231$ ) e com as pulsações ( $r = -0,211$ ). Em 2003, Suzuki *et al.* (519) descreveram uma associação inversa entre a concentração sérica de  $\beta$ -criptoxantina e o IMC ( $r = -0,207$ ,  $p < 0,01$ ) num estudo realizado em 216 adultos saudáveis. Já em 2006, no estudo CARDIA realizado por Andersen *et al.* (520) foi também concluído que existia uma forte associação inversa entre o IMC e a concentração de  $\beta$ -criptoxantina no soro. Os resultados destes dois estudos estão de acordo com o resultado obtido no nosso trabalho de investigação e de acordo com o conhecimento actual este é o primeiro estudo em que é descrita uma associação inversa entre os níveis plasmáticos de  $\beta$ -criptoxantina e o IMC numa população de adultos diabéticos tipo 2 e não diabéticos. A relação entre os triglicéridos e a  $\beta$ -criptoxantina foi também avaliada por Iwamoto *et al.* (521) num ensaio clínico aleatório em 17 participantes. Os participantes foram submetidos a um período de suplementação (3 semanas) com 4,7 mg/dia de  $\beta$ -criptoxantina, tendo-se verificado que após esse tempo os níveis séricos de triglicéridos passaram de 116 mg/dL para 100 mg/dL, mas apenas com uma tendência para a significância ( $p = 0,057$ ). Em 2008, Wang *et al.* (513) observaram uma associação positiva das concentrações séricas de  $\beta$ -criptoxantina com o C-HDL ( $\beta = 0,034$ ;  $p = 0,0004$ ) e inversa com HbA1c ( $\beta = -0,011$ ;  $p = 0,03$ ). Os resultados do nosso estudo foram semelhantes aos obtidos por Wang *et al.* (513) no que se refere à relação da  $\beta$ -criptoxantina com o C-HDL mas contrários em relação à associação verificada com a HbA1c. O facto do estudo de Wang *et al.* (513) não ter sido realizado em diabéticos do tipo 2 e apenas serem incluídas mulheres pode ser uma possível explicação para as diferenças encontradas. No entanto até ao presente não estão disponíveis na literatura científica estudos em diabéticos que estabeleçam este tipo de associações.

### 5.9. Associação dos polimorfismos genéticos da haptoglobina e do C677T da enzima MTHFR com os parâmetros bioquímicos

A Hp é uma proteína plasmática de fase aguda maioritariamente sintetizada no fígado (522). Actua como um antioxidante ligando-se à Hb livre, o que permite a sua estabilização e rápida eliminação da circulação através da ligação do complexo Hp-Hb ao receptor CD163 (523,524). O gene da Hp é polimórfico e tem três fenótipos possíveis: 1-1, 1-2 ou 2-2. Este polimorfismo é responsável pela expressão de proteínas com diferenças funcionais na protecção contra o *stress* oxidante (522,525). Diversos estudos longitudinais têm evidenciado que o fenótipo 2-2 da Hp está associado com as complicações cardiovasculares na diabetes (89,92,93,524,526,527). Assim, os indivíduos diabéticos com o genótipo Hp 2-2 parecem ter um maior risco de desenvolver complicações angiopáticas do que os diabéticos com os genótipos Hp 2-1 ou Hp 1-1. De acordo com o estudo de revisão de Asleh e Levy (528) a distribuição dos alelos da Hp não difere entre pessoas com e sem diabetes, no entanto em 2012, Shi *et al.* (529) realizaram um estudo em 584 diabéticos tipo 2 e 690 controlos, tendo verificado que a distribuição dos genótipos e dos alelos da Hp era significativamente diferente entre os dois grupos ( $p = 0,021$  e  $p = 0,007$ , respectivamente). O grupo dos diabéticos tipo 2 apresentou uma maior frequência do genótipo Hp 2-2 em relação ao grupo controlo (51,7% vs. 44,1%). Contrariamente no grupo controlo, as frequências da distribuição dos genótipos 2-1 e 1-1 foram superiores às do grupo dos diabéticos em 5,4% e 2,3%, respectivamente. Apesar de existir alguma evidência científica que associa a presença do genótipo Hp 2-2 com o risco de DMT2 e com as complicações vasculares na diabetes, não foram ainda realizados estudos em diabéticos do tipo 2 que avaliem a relação do polimorfismo genético da Hp com factores independentes do risco cardiovascular, como são a Hcy e a Cys. Segundo o conhecimento actual o único estudo publicado sobre este tema foi realizado em 2011 por Lioupis *et al.* (530) em 27 homens diabéticos e 43 não diabéticos, tendo como objectivo avaliar a relação dos depósitos de ferro na placa aterosclerótica da carótida com o genótipo Hp 2-2 e com factores comuns de risco cardiovascular. Os resultados obtidos permitiram concluir que os diabéticos com níveis elevados de Hcy e com o genótipo Hp 2-2 tinham maiores depósitos de ferro na placa aterosclerótica da carótida e que esses depósitos poderão estar associados com o aumento do *stress* oxidante, o que afecta a estabilidade da placa aterosclerótica. Os resultados do nosso estudo demonstraram que a probabilidade de ocorrência de hiperhomocisteinémia (OR = 4,19;  $p = 0,021$ ) e hipercisteinémia (OR = 4,55;  $p = 0,028$ ) nos diabéticos do tipo 2 com angiopatia e portadores do genótipo Hp 2-1 foi significativamente superior em relação aos diabéticos sem angiopatia com o mesmo genótipo de Hp. Foi também avaliado o efeito combinado dos genótipos 2-1 e 2-2 na probabilidade de ocorrência de níveis elevados de Hcy e Cys, tendo-se verificado que apenas para a hiperhomocisteinémia foi mantida a significância (OR = 4,33;  $p = 0,014$ ) entre os dois grupos e para a hipercisteinémia observou-se unicamente uma tendência para o efeito ser significativo (OR = 2,84;  $p = 0,062$ ). De acordo com os

resultados descritos, a presença do genótipo 2-1 no polimorfismo da Hp está associado com o aumento da predisposição para a ocorrência de hiperhomocisteinémia e hipercisteinémia nos diabéticos tipo 2 com angiopatia. Simultaneamente verificou-se que os diabéticos com angiopatia e portadores do genótipo Hp 2-1 ou Hp 2-2 tinham maior probabilidade de ter níveis elevados de Hcy do que os diabéticos sem angiopatia.

A MTHFR é uma enzima chave do metabolismo da Hcy que catalisa a conversão do 5,10-metiltetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato (531). Um dos mais frequentes polimorfismos desta enzima é a troca de uma citosina por uma timina na posição 677 do nucleótido (532). Nos indivíduos homozigóticos (com o genótipo 677TT) a actividade da enzima MTHFR *in vitro* é apenas 30% da verificada para o genótipo sem mutação (CC677). Já em relação aos heterozigóticos (com o genótipo C677T), 60% da actividade da MTHFR *in vitro* é mantida (531). Muitos estudos têm associado o polimorfismo C677T da MTHFR com as doenças cardiovasculares e com a Hcy (533-538). No entanto Clarke *et al.* (539) realizaram uma meta-análise onde concluíram que a elevação moderada da Hcy tem um efeito mínimo ou inexistente na doença arterial coronária e que as discrepâncias entre os resultados dos estudos epidemiológicos publicados resultam de erros metodológicos. Nos últimos anos o polimorfismo C677T da MTHFR tem vindo a ser também associado com o risco de aparecimento de diabetes do tipo 2 e com as complicações macro- e microvasculares (540-543). Alguns estudos têm avaliado a relação do polimorfismo C677T da MTHFR com a prevalência de hiperhomocisteinémia em diabéticos do tipo 2 (544-546). No entanto e de acordo com o nosso conhecimento não está disponível na literatura científica nenhum estudo epidemiológico que avalie simultaneamente a relação da hiperhomocisteinémia e a hipercisteinémia com o polimorfismo C677T da MTHFR em diabéticos do tipo 2. O único estudo publicado sobre este tema foi realizado por Kimura *et al.* (547) numa população de 464 doentes em hemodiálise, tendo os autores concluído que a mutação C677T da MTHFR era um preditor independente da concentração sérica de Cys neste tipo de doentes. No nosso estudo foi avaliada a relação da prevalência de hiperhomocisteinémia e hipercisteinémia com o polimorfismo C677T da MTHFR em diabéticos do tipo 2 com e sem complicações angiopáticas. Foi possível verificar que os diabéticos do tipo 2 com angiopatia e portadores dos genótipos C677CT ou 677TT tinham uma probabilidade de ter hiperhomocisteinémia cerca de cinco vezes superior (OR = 5,37;  $p = 0,040$ ) à verificada para os diabéticos do tipo 2 sem angiopatia. No entanto não foi estabelecida nenhuma associação entre o polimorfismo C677T da MTHFR e a hipercisteinémia nos diabéticos tipo 2 avaliados. De acordo com os nossos resultados o polimorfismo C677T da MTHFR está associado com a predisposição para o aumento dos níveis plasmáticos de Hcy e poderá ser considerado um factor de risco genético para o desenvolvimento de complicações angiopáticas nos diabéticos do tipo 2 Portugueses. Em 2003, Sun *et al.* (548) realizaram um estudo em 208 diabéticos do tipo 2 e 57 controlos no qual foi observado que a presença do alelo T estava fortemente associado com a presença de retinopatia diabética. Os autores

concluíram que o polimorfismo C677T da MTHFR estava associado com a hiperhomocisteinémia e que poderia ser um factor de risco para a microangiopatia em Chineses com diabetes do tipo 2. Um outro estudo epidemiológico descrito por Hermans *et al.* (544) permitiu concluir que o polimorfismo C677T da MTHFR predispunha para um maior risco da EAM em diabetes do tipo 2 portadores do alelo T (homozigóticos e heterozigóticos). Já em 2009, Luo *et al.* (545) desenvolveram um estudo do tipo casos e controlos em 70 diabéticos do tipo 2 com doença coronária, 71 diabéticos do tipo 2 sem doença coronária e 85 controlos. Os resultados obtidos no estudo permitiram aos autores concluir que a hiperhomocisteinémia e a presença do alelo T no polimorfismo C677T da MTHFR poderiam ser considerados factores de risco para os diabéticos do tipo 2 com doença coronária. Contrariamente, Russo *et al.* (549) realizaram um estudo de coorte prospectivo em 216 diabéticos do tipo 2 no qual concluíram que a hiperhomocisteinémia moderada e o genótipo TT da MTHFR não eram factores de risco significativos para o desenvolvimento da macroangiopatia. Os resultados do nosso estudo estão de acordo com os apresentados por Sun *et al.* (548), Hermans *et al.* (544) e Luo *et al.* (544), mas não com os apresentados por Russo *et al.* (549) e por Ukinç *et al.* (550). Um possível efeito combinado dos polimorfismos da Hp e da MTHFR na probabilidade de ocorrência de hiperhomocisteinémia e de hipercisteinémia foi também avaliado para os diabéticos do tipo 2 com e sem angiopatia. Os resultados obtidos indicaram que os diabéticos do grupo I portadores do genótipos Hp 2-2 e C677T tinham uma probabilidade de ter concentrações plasmáticas de Hcy cinco vezes mais elevadas (OR = 5,00; p = 0,045) do que os diabéticos do grupo II com os mesmos dois genótipos. Observou-se também que os diabéticos do tipo 2 com angiopatia e portadores dos genótipos Hp 2-1 e C677T tinham uma maior probabilidade de ter hiperhomocisteinémia (OR = 4,14; p = 0,004) do que os diabéticos sem angiopatia com os mesmos genótipos para a Hp e MTHFR. No presente trabalho de investigação foi observada uma associação entre os polimorfismos da Hp e C677T da MTHFR que potencia a probabilidade de ocorrência de hiperhomocisteinémia nos diabéticos tipo 2 com angiopatia.



## 6. CONCLUSÃO

No presente trabalho de investigação foram avaliadas e comparadas as concentrações médias de Hcy, Cys, MAD, luteína,  $\beta$ -criptoxantina e das vitaminas A, C, E, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> em diabéticos tipo 2 (com e sem angiopatia) e em controlos não diabéticos. Os resultados obtidos permitam concluir que a concentração média de Hcy foi superior nos diabéticos em relação aos não diabéticos. A média dos níveis séricos de Cys foi diferente entre os três grupos avaliados, sendo os diabéticos com angiopatia os que apresentaram a concentração média mais elevada e os não diabéticos a menor concentração média. O grau de *stress* oxidante foi elevado para toda a população, no entanto as concentrações médias de MAD no soro foram diferentes entre os três grupos avaliados (grupo I: 2,70  $\mu$ M vs. grupo II: 2,49  $\mu$ M vs. grupo III: 2,29  $\mu$ M). Em relação às vitaminas antioxidantes, os dois grupos de diabéticos apresentaram valores médios de AA inferiores ao valor obtido para o grupo dos não diabéticos. Para o  $\alpha$ -tocoferol, as concentrações médias foram superiores nos diabéticos em relação aos controlos. Já as concentrações séricas de retinol foram inferiores nos diabéticos sem angiopatia em relação aos diabético com angiopatia. As concentrações médias de luteína e  $\beta$ -criptoxantina no soro foram superiores no grupo dos não diabéticos em comparação com os dois grupos de diabéticos. Já as concentrações médias de PLF no plasma foram semelhantes entre os grupos. Para a vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico foi o grupo dos diabéticos com angiopatia que obteve as concentrações séricas mais elevadas. A relação da angiopatia e da DMT2 com a hiperhomocisteinémia, hipercisteinémia e o grau de *stress* oxidante foi avaliada, tendo-se verificado que a DMT2 aumentou o risco de hiperhomocisteinémia e de elevação dos níveis séricos de MAD. Observou-se também que o efeito combinado da presença de angiopatia e da DMT2 aumentava a probabilidade de ocorrência de hiperhomocisteinémia (grupo I: OR = 35,3 vs. grupo II: OR = 12,3) e de elevação dos níveis séricos de MAD (grupo I: OR = 5,33 vs. grupo II: OR = 4,20). A prevalência de baixos níveis de AA (grupo I: 55% vs. grupo II: 47% vs. grupo III: 22%) e PLF (grupo I: 33% vs. grupo II: 32% vs. grupo III: 38%) na população avaliada foi relevante. A relação causal da DMT2 e da presença de angiopatia com a diminuição dos níveis plasmáticos de AA e PLF foi também estudada. Assim, concluiu-se que a presença de DMT2 aumentou em cerca de 3 vezes a probabilidade de ocorrência de baixos níveis plasmáticos de AA. O efeito isolado da DMT2 pareceu ser determinante no aumento do risco de hipovitaminose C, no entanto a presença de angiopatia não aumentou o risco de ter hipovitaminose C. Embora a prevalência de hipovitaminose B<sub>6</sub> tenha sido superior a 30% em todos os grupos não foi observada uma relação causal entre a presença de DMT2 e de angiopatia com a diminuição dos níveis plasmáticos de PLF.

Em relação ao estado nutricional da população verificou-se que a prevalência de obesidade foi muito superior nos dois grupos de diabéticos (grupo I: 57,3% vs. grupo II: 45,4%) em relação ao grupo dos não diabéticos (grupo III: 16,8%) quando aplicado o critério de avaliação do IMC. Quando a metodologia aplicada foi a avaliação do PA, observou-se uma prevalência de

## Conclusão

obesidade muito elevada para todos os grupos (>50%), no entanto a diferença observada entre os dois grupos de diabéticos (grupos I e II: 70,7%) e o grupo dos controlos (grupo III: 51,0%) manteve-se. A prevalência de obesidade foi também avaliada por comparação com o valor máximo de percentagem de GC recomendado pela OMS e medido pelo método de BIA, tendo-se observado que a percentagem de participantes com obesidade eram muito elevada em todos os grupos (>75%). Os diabéticos do tipo 2 com angiopatia foram os que obtiveram a maior prevalência de obesidade (87,1%) e os indivíduos não diabéticos a menor (76,1%). Foram também aplicadas nove equações antropométricas para determinar a percentagem de GC na população em estudo. Os resultados obtidos em cada uma delas foram comparados com o método de BIA, tendo-se verificado uma maior concordância com a equação de Deurenberg (1998). Os resultados do nosso estudo permitiram concluir que o método do IMC subestimou a prevalência de obesidade na população avaliada quando comparado com os outros métodos aplicados. A composição corporal dos participantes foi avaliada pelo método de BIA, podendo concluir-se que as percentagens médias de GC (grupo I: 87,1% vs. grupo II: 83,6% vs. grupo III: 76,1%), MM (grupo I: 62,4% vs. grupo II: 62,3% vs. grupo III: 62,4%) e ACT (grupo I: 45,6% vs. grupo II: 45,6% vs. grupo III: 45,8%) observadas nos três grupos foram muito semelhantes. Por comparação com as recomendações da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, verificou-se que a prevalência de desidratação na população estudada foi muito elevada (>55%). A presença de desidratação moderada tem uma função importante no desenvolvimento de diversas doenças, nomeadamente na diabetes que por alteração da osmolaridade favorece a hiperglicémia e dificulta o controlo metabólico da doença. Deste modo será importante sensibilizar e educar a população diabética e não diabética a manter uma ingestão diária de líquidos adequada por forma a garantir uma correcta hidratação.

Os hábitos alimentares dos três grupos em estudo foram avaliados e comparados. A ingestão média diária de calorias e gordura total foram superiores nos diabéticos do tipo 2 com angiopatia em relação aos não diabéticos. A ingestão média de hidratos de carbono foi semelhante entre os grupos e a ingestão de proteína foi superior nos diabéticos em relação aos não diabéticos. A ingestão média diária de água foi para todos os grupos inferior aos valores recomendados pela *European Food Safety Authority* (grupo I: 1,244 L vs. grupo II: 1,235 L vs. grupo III: 1,024 L). Na caracterização dos hábitos alimentares dos três grupos avaliados foi também determinada a prevalência de inadequação da ingestão de macronutrientes e micronutrientes. Em relação à ingestão de hidratos de carbono, a prevalência de inadequação variou de 17,5% (grupo III) a 34,7% (grupo I). A percentagem de participantes com ingestão de fibra inferior ao valor recomendado foi superior a 55% em todos os grupos. Os diabéticos do tipo 2 com angiopatia foram os que apresentaram maior prevalência de inadequação de gordura (36%) e os diabéticos tipo 2 sem angiopatia os que obtiveram menor prevalência (22,7%). A inadequação de ingestão de EPA, DHA e ácidos gordos ómega-6 e ómega-3 foi muito elevada para todos os grupos (>70%). A prevalência de ingestão de sódio alimentar total

foi muito elevada para todos os grupos, sendo o grupo I aquele que apresentou maior prevalência e o grupo III a menor. Perante estes resultados pode concluir-se que a população estudada tem um risco acrescido de desenvolver ou agravar a progressão de DCV, especialmente os diabéticos do tipo 2 aos quais já estão associados outros factores de risco. No que se refere à prevalência de inadequação da ingestão de micronutrientes, o grupo dos não diabéticos foi o que apresentou uma prevalência mais elevada para um maior número de vitaminas (tiamina, riboflavina, B<sub>12</sub>, folatos e C) e minerais (cálcio, fósforo, potássio, iodo e zinco). O padrão de ingestão de vitaminas e minerais nos dois grupos de diabéticos tipo 2 avaliados foi muito semelhante. Recomenda-se que os participantes de todos os grupos com um défice de ingestão de micronutrientes enriqueçam a sua dieta com boas fontes alimentares dessas vitaminas e minerais e/ou iniciem um programa de suplementação alimentar mediante aconselhamento médico.

Para a população diabética estudada é possível concluir que concentrações plasmáticas de Hcy estão positivamente associadas com a Cys, MAD, retinol e  $\alpha$ -tocoferol, bem como, inversamente relacionadas com o AA, luteína,  $\beta$ -criptoxantina, vitamina B<sub>12</sub> e ácido fólico. Por sua vez, a Cys está relacionada de forma positiva com o MAD, retinol e  $\alpha$ -tocoferol e negativa com o AA, luteína e  $\beta$ -criptoxantina.

O estado nutricional e clínico da população foi relacionado com os níveis plasmáticos de Hcy e Cys. Os resultados obtidos no nosso estudo permitiram concluir que a Hcy e a Cys plasmáticas estão relacionadas com a obesidade, já que foram observadas associações positivas e significativas destes aminotióis com o peso, IMC, PA e GC em quilogramas. Conclui-se também que existe uma associação directa da Hcy e Cys com a PAS e os triglicéridos, bem como, uma associação inversa com o C-HDL.

No presente estudo foi comprovada a presença de uma associação directa significativa das concentrações de Hcy no plasma com a ingestão diária de gordura polinsaturada, ácidos gordos ómega-3, ácido linolénico, lisina e metionina. No que se refere à Cys foram também comprovadas as associações positivas deste aminotiol com a ingestão de proteína, colesterol, ácidos gordos ómega-3, ácido linolénico, lisina e metionina.

No nosso estudo foi também avaliada a relação do *stress* oxidante e antioxidantes alimentares com o estado nutricional e clínico da população avaliada. Os resultados obtidos permitiram concluir que o MAD sérico está relacionado com a obesidade, visto que, foram observadas associações positivas entre os níveis de MAD no soro com os principais critérios de avaliação de obesidade (IMC, PA e percentagem de GC). Simultaneamente foi observada uma relação positiva do principal marcador do *stress* oxidante (MAD) com os triglicéridos, PAS e níveis de retinol e  $\alpha$ -tocoferol no soro. Foi comprovado para a população em estudo que a diminuição dos níveis plasmáticos de AA e séricos de luteína e  $\beta$ -criptoxantina favorece o aumento do *stress* oxidante. Foi também comprovado que as concentrações séricas de retinol estavam associadas aos níveis de  $\alpha$ -tocoferol no soro e ao PA dos participantes no estudo.

## *Conclusão*

Similarmente o  $\alpha$ -tocoferol foi também relacionado de forma positiva com um critério de avaliação da obesidade, o IMC e com as concentrações séricas de triglicéridos. Foi observada uma associação positiva dos níveis plasmáticos de AA com as concentrações séricas de luteína e  $\beta$ -criptoxantina e inversa com o IMC e o PA. Resultados semelhantes foram obtidos para a luteína e  $\beta$ -criptoxantina, já que as suas concentrações séricas foram inferiores em indivíduos que apresentavam maior IMC, PA e maior quantidade de GC. Foi também observado que os participantes com níveis mais elevados de C-HDL e menores de triglicéridos tinham maiores concentrações plasmáticas de AA e séricas de luteína e  $\beta$ -criptoxantina. A associação verificada permitiu concluir que os níveis adequados de AA no plasma e de luteína e  $\beta$ -criptoxantina no soro podem contribuir para prevenir o aparecimento e/ou progressão de DCV na população estudada, especialmente nos diabéticos tipo 2.

O polimorfismo da Hp foi relacionado com a hiperhomocisteinémia e a hipercisteinémia na angiopatia da DMT2, sendo possível concluir que a presença do genótipo Hp 2-1 está associado com o aumento da predisposição para a ocorrência de hiperhomocisteinémia e hipercisteinémia nos diabéticos tipo 2 com angiopatia. Simultaneamente poderá afirmar-se que os diabéticos com angiopatia e portadores do genótipo Hp 2-1 ou Hp 2-2 tiveram um risco cerca de quatro vezes superior de ter níveis elevados de Hcy do que os diabéticos sem angiopatia. A relação do polimorfismo C677T da MTHFR com a hiperhomocisteinémia e hipercisteinémia em diabéticos do tipo 2 com e sem angiopatia foi também avaliada. Os diabéticos com angiopatia portadores dos genótipos C677T ou 677TT têm um risco cerca de cinco vezes maior de ter hiperhomocisteinémia do que os diabéticos sem angiopatia. Conclui-se ainda que existe uma associação dos polimorfismos da Hp e C677T da MTHFR que potencia a probabilidade de ocorrência de hipercisteinémia nos diabéticos com angiopatia.

O presente trabalho de investigação foi o primeiro em Portugal que relacionou dados bioquímicos, antropométricos e nutricionais em diabéticos do tipo 2 e que permitiu uma caracterização global do risco de aparecimento e/ou progressão de complicações vasculares, por alteração dos níveis plasmáticos de Hcy e Cys, MAD, compostos antioxidantes e vitaminas cofactores do metabolismo da Hcy. A quantificação e avaliação dos níveis plasmáticos de Hcy, Cys, MAD e compostos antioxidantes em diabéticos do tipo 2 não é uma prática comum em Portugal. Assim, foi extremamente importante a realização deste estudo, já que, permitiu obter novos dados científicos que poderão ser utilizados em saúde pública. A elevação das concentrações de Hcy e Cys no plasma, bem como, de MAD no soro pode ser contrariada por modificação dos hábitos alimentares, sendo estes um pilar fundamental do tratamento da diabetes de tipo 2. Com este trabalho, foi demonstrada a importância dos valores plasmáticos de Hcy, Cys e de certos micronutrientes antioxidantes nas complicações macro- e microangiopáticas em diabéticos de tipo 2. A informação científica obtida no presente trabalho de investigação poderá ser utilizada em programas estratégicos de prevenção e controlo da DMT2 e na melhoria dos cuidados de saúde ao diabético do tipo 2.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com o objectivo de aumentar o conhecimento científico nesta área de investigação pretende-se no futuro estudar vários aspectos relevantes no âmbito da relação entre a nutrição e a genética na diabetes *mellitus* tipo 2.

Baixos níveis séricos de vitamina D parecem estar associados com o aumento do risco de doença cardiovascular e com a insulino-resistência na diabetes tipo 2. Deste modo, pretende-se estudar a relação da vitamina D com a Hcy nos diabéticos tipo 2 com e sem angiopatia, bem como, o efeito da diminuição dos níveis desta vitamina na secreção e sensibilidade à insulina.

Os nitratos são precursores do óxido nítrico (potente vasodilatador) e estão associados a vários mecanismos que aumentam o fluxo sanguíneo coronário, melhoram a disfunção endotelial e previnem a vasoconstrição das artérias coronárias. Pretende-se também dosear os níveis plasmáticos de nitratos e nitritos para avaliar o seu efeito na biodisponibilidade de óxido nítrico.

A vitamina B<sub>2</sub> é cofactor da enzima MTHFR que desempenha uma função importante na via de remetilação da Hcy. Concentrações plasmáticas de vitamina B<sub>2</sub> inferiores aos valores recomendados favorecem a presença de hiperhomocisteinémia. Assim, seria importante determinar os níveis plasmáticos de vitamina B<sub>2</sub> em diabéticos do tipo 2 com e sem angiopatia e avaliar uma possível associação desses níveis com a hiperhomocisteinémia, o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis de outras vitaminas envolvidas no metabolismo da Hcy.

Neste estudo foram avaliados os hábitos alimentares dos participantes pela aplicação de QFA validado para a população adulta Portuguesa (313). A variabilidade intraindividual da ingestão de nutrientes obtida a partir do referido questionário foi previamente avaliada durante o procedimento de validação, no entanto seria interessante comparar essa variabilidade intraindividual com a da população de diabéticos do tipo 2 avaliada no nosso estudo.

Será ainda importante estudar algumas variações polimórficas associadas à biodisponibilidade de Hcy e de vitaminas com função de cofactores no metabolismo da Hcy (B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e ácido fólico), variações genéticas de enzimas antioxidantes do eritrócito associadas com a MTHFR e com a biodisponibilidade de vitamina B<sub>2</sub> e polimorfismos de enzimas envolvidas na regeneração do AA no organismo.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Scheen AJ. Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clin Belg*. 2003; 58(6):335-341.
2. Kaku K. Pathophysiology of type 2 diabetes and its treatment policy. *JMAJ*. 2010; 53(1):41-46.
3. Stumvoll M, Goldstein BJ, Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005; 365(9467):1333-1346.
4. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acds Sci*. 2006; 103(7):2334-23349.
5. Spellman CW. Pathophysiology of type 2 diabetes: targeting islet cell dysfunction. *J Am Osteopath Assoc*. 2010; 110(2):S2-S7.
6. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diab Res Clin Prac*. 2011; 94(3):311-321.
7. King H, Aubert RE, herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025. *Diabetes Care*. 1998; 21(9):1414-1431.
8. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27(5):1047-1053.
9. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of heath examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2,7 million participants. *Lancet*. 2011; 378(9785):31-40.
10. Gardete CL, Boavida JM, Fragoso de Almeida JP, Massano CS, Dores J, Sequeira DJ, et al. Diabetes: Factos e Números 2012 - Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes. Sociedade Portuguesa de Diabetologia (Lisboa); 2/2013. Nº de relatório: 340224/12. Disponível em: URL: <http://www.spd.pt>.
11. Gardete-Correia L, Boavida JM, Raposo JF, Mesquita AC, Fona C, Carvalho R, Massano-Cardoso S. First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. *Diabet Med*. 2010; 27(8):879-881.
12. Stehouwer CDA, Lambert J, Donker AJM, Van Hinsbergh VWM. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res*. 1997; 34(1):55-68.
13. Stehouwer CDA, Schaper NC. The pathogenesis of vascular complications of diabetes *mellitus*: one voice or many?. *Eur J Clin Invest*. 1996; 26(7):535-543.
14. Škrha J. Pathogenesis of angiopathy in diabetes. *Acta Diabetol*. 2003; 40(2):S324-S29.
15. Kyselova Z, Stefek M, Bauer V. Pharmacological prevention of diabetic cataract. *J Diab Comp*. 2004; 18(2):129-140.
16. Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008; 52(6):940-950.
17. Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 419(1):1-15.
18. Bierhaus A, Hofman MA, Ziegler R, Nauroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes *mellitus*. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*. 1998; 37(3):586-600.
19. Rabbani N, Thornalley PJ. Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse: glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36(5):1045-1050.
20. Goldin A, Beckman JA, Schimidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006; 114(6):597-605.

21. Peppas M, Uribarri J, Vlassara H. glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. *Clin Diabetes*. 2003; 21(4):186-187.
22. Rahbar S. the discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1043:9-19.
23. Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and glycoxidation end products. *Diabetes Care*. 2006; 29(6):1420-1432.
24. Leslie RD, Beyan H, Sawtell P, Boehm BO, Spector TD, Snieder H. Level of an advanced glycation end product is genetically determined. A study of normal twins. *Diabetes*. 2003; 52(9):2441-2444.
25. Koschinsky T, He C, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(12):6476-6479.
26. Kilhovd BK, Berg TJ, Birkeland KI, Thorsby P, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation end products are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care*. 1999; 22(9):1543-1548.
27. Sharp PS, Rainbow S, Mukherjee S. Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects. *Diabet Med*. 2003; 20(7):575-579.
28. Luévano-Contreras C, Garay-Sevilla ME, Wrobel K, Malacara JM, Wrobel K. Dietary advanced glycation end products restriction diminishes inflammation markers and oxidative stress in patients with type 2 diabetes *mellitus*. *J Clin Biochem Nutr*. 2013; 52(1):22-26.
29. Vlassara H. Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1043:452-460.
30. Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppas M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1043:461-466.
31. Cai W, Gao QD, Zhu L, Peppas M, He C, Vlassara H. Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Mol Med*. 2002; 8(7):337-346.
32. Del Turco S, Basta G. An update on advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Biofactors*. 2012; 38(4):266-274.
33. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54(6):1615-1625.
34. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, et al. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*. 2006; 55(9):2401-2411.
35. Yau JW, Xie J, Lamoureux E, Klein R, Klein BE, Cotch MF, et al. Retinal microvascular calibre and risk of incident diabetes: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012; 95(2):265-274.
36. Stitt AW, Li YM, Gardiner TA, Bucala R, Archer DB, Vlassara H. Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol*. 1997; 150(2):523-531.
37. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001; 44(2):129-146.
38. Yamagishi Si, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, et al. Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1997; 272(13):8723-30.

39. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes *mellitus*: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(2):143-159.
40. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414(6865):813-820.
41. Basta G, Schimidt AM, de Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res*. 2004; 63(4):582-592.
42. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Tumova S, Rauvala H. RAGE-mediated cell signaling. *Methods Mol Biol*. 2013; 963:239-263.
43. Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, Demopoulos VJ. RAGE: a multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease. *Curr Med Chem*. 2010; 17(21):2232-2252.
44. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*. 1994; 269(13):9889-9897.
45. Voziyan PA, Hudson BG. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62(15):1671-1681.
46. Padival S, Nagaraj RH. Pyridoxamine inhibits maillard reactions in diabetic rat lenses. *Ophthalmic Res*. 2006; 38(5):294-302.
47. Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, et al. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes*. 2002; 51(9):2826-2832.
48. Alderson NL, Chachich ME, Frizzell N, Canning P, Metz TO, Januszewski AS, et al. Effect of antioxidants and ACE inhibition on chemical modification of proteins and progression of nephropathy in the streptozotocin diabetic rat. *Diabetologia*. 2004; 47(8):1385-1395.
49. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med*. 2003; 9(3):294-299.
50. Pomeroy F, Molinar Min A, La Selva M, Allione A, Molinatti GM, Porta M. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. *Acta Diabetol*. 2001; 38(3):135-138.
51. Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc*. 2004; 104(8):1287-91.
52. Rains JL, Sushil K, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50(5):567-575.
53. Styskal J, Van Remmen H, Richardson A, Salmon AB. Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models?. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(1):46-58.
54. Mehta JL, Rasouli N, Sinha AK, Molavi B. Oxidative stress in diabetes: A mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38(5-6):794-803.
55. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109(23):S27-S32.
56. Gui T, Shimokado A, Sun Y, Akasaka T, Muragaki Y. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators Inflamm*. 2012; 2012:693083.

57. Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res.* 2007; 73(3):470-480.
58. Pilz J, Meineke I, Gleiter CH. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000; 74(2):315-325.
59. Jacob RF, Mason RP. Lipid peroxidation induces cholesterol domain formation in model membranes. *J Biol Chem.* 2005; 280(47):39380-39387.
60. Benzie IFF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int J Food Sci Nut.* 1996; 47(3):233-261.
61. Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat Res.* 1988; 195(2):137-149.
62. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57(5):715S-724S.
63. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 9;338(1):668-676.
64. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci.* 2001; 37(3):293-303.
65. Burcham PC. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis.* 1998; 13(3):287-305.
66. Nair V, Cooper CS, Vietti DE, Turner GA. The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids.* 1986; 21(1):6-10.
67. Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem.* 2003; 278(33):31426-31433.
68. Tanaga K, Bujo H, Inoue M, Mikami K, Kotani K, Takahashi K, et al. Increased circulating malondialdehyde-modified LDL levels in patients with coronary artery diseases and their association with peak sizes of LDL particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(4):662-666.
69. Mateos R, Luis Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde by liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative. A marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 805(1):33-39.
70. Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova.* 2009; 32(1):169-174.
71. Wobeto VPA, Pinho PC, José Roberto M. Souza JRM, Zaccariotto TR, Zonati MF. Genótipos de haptoglobina e hipertensão refratária em pacientes com diabete melito tipo 2. *Arq Bras Cardiol.* 2011; 97(4):338-345.
72. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem.* 1996; 42(10):1589-1600.
73. Sadrzadeh SM, Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol.* 2004; 121:S97-S104.
74. Van Vlierberghe H, Langlois M, Delanghe J. Haptoglobin polymorphism and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta.* 2004; 345(1-2):35-42.
75. Wobeto VPA, Zaccariotto TR, Sonati MF. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance. *Genet Mol Biol.* 2008; 31(3):602-620.

76. Levy AP, Larson MG, Corey D, Lotan R, Vita JA, Benjamin EJ. Haptoglobin phenotype and prevalent coronary heart disease in the Framingham offspring cohort. *Atherosclerosis*. 2004; 172(2):361-365.
77. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SKA, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001; 409(6817):198-201.
78. Braeckman L, Bacquer DD, Delanghe J, Claeys L, Backer GD. Association between haptoglobin polymorphism, lipids, lipoproteins and inflammatory variables. *Atherosclerosis*. 1999; 143(2):383-388.
79. Wassel J. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab*. 2000; 46(11-12):547-552.
80. Awadallah SM, Atoum MF. Haptoglobin polymorphism in breast cancer patients from Jordan. *Clin Chim Acta*. 2004; 341(1-2):17-21.
81. Koda Y, Soejima M, Yoshioka N, Kimura H. The haptoglobin-gene deletion responsible for anhaploglobinemia. *Am J Hum Genet*. 1998; 62(2):245-252.
82. Bowman BH, Kurosky A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossover, and point mutation. *Adv Hum Genet*. 1982; 12:189-261.
83. Frank MM, Lache O, Enav BI, Szafrank T, Levy RM, Levy AP. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood*. 2001; 98(13):3693-3698.
84. Coelho C, Guerra A, Rego C, Breitenfeld L, Castro E, Rodrigues P, et al. Polimorfismos Genéticos da Enzima Conversora da Angiotensina-I (ECA), Haptoglobina (HP) e Angiotensinogénio (AGT) e Parâmetros de Sobrecarga Oxidante, em Adolescentes de 12-15 Anos de Idade. *Rev Port Cardiol*. 2006; 25(7-8):677-690.
85. Gogishvili AV, Kavtaradze VG, Mamaladze GT, Arutiunova MS, Takadze, GSH. Haptoglobin phenotype distribution in patients at high risk of developing myocardial infarct. *Kardiologia*. 1985; 25(2):55-58.
86. Stein JH, McBride P. Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease: Pathophysiology, screening and treatment off. *Arch Intern Med*. 1998; 158(12):1301-1306.
87. Delanghe JR, Duprez DA, De Buyzere ML, Bergeez BM, Claeys R, Leroux-roels GG, et al. Refractory hypertension is associated with the haptoglobin 2-2 phenotype. *J Cardiovasc Risk*. 1995; 2(2):131-136.
88. Levy AP, Skorecki K. Haptoglobin phenotype and vascular complications in patients with diabetes. *N Engl J Med*. 2000; 343(13):969-970.
89. Levy AP, Hochberg I, Jablonski K, Resnick HE, Lee ET, Best L, et al. Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: the Strong Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 40(11):1984-1990.
90. Nakhoul FM, Zoabi R, Kanter Y, Zoabi M, Skorecki K, Hochberg I, et al. Haptoglobin phenotype and diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2001; 44(5):602-604.
91. Asleh R, Marsh S, Shilkrut M, Binah O, Guetta J, Lejbkovicz F, et al. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Cir Res*. 2003(11); 92:1193-1200.
92. Roguin A, Koch W, Kastrati A, Aronson D, Schomig A, Levy AP. Haptoglobin genotype is predictive of major adverse cardiac events in the 1-year period after percutaneous transluminal coronary angioplasty in individuals with diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26(9):2628-2631.
93. Suleiman M, Aronson D, Asleh R, Kapeliovich MR, Roguin A, Meisel MR, et al. Haptoglobin polymorphism predicts 30-day mortality and heart failure in patients with diabetes and acute myocardial infarction. *Diabetes*. 2005; 54(9):2802-2806.
94. Costacou T, Ferrel RE, Orchard TJ. Haptoglobin genotype: a determinant of cardiovascular complication risk in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2008; 57(6):1702-1706.

95. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, et al. Diabetes and cardiovascular disease a statement for healthcare professionals from the american heart association. *Circulation*. 1999; 100(10):1134-1146.
96. Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia*. 2001; 44(2):S14-S21.
97. Donnelly R, Emslie-Smith AM, Gardner ID, Morris AD. Vascular complications of diabetes. *BMJ*. 2000; 320(7241):1062-1066.
98. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998; 339(4):229-234.
99. Laakso M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999; 48(5):937-942.
100. Yamagishi S, Matsui T, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Clinical utility of acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor in cardiometabolic disorders. *Curr Drug Metab*. 2009; 10(2):159-163.
101. Yamagishi S. Cardiovascular disease in recent onset diabetes *mellitus*. *J Cardiol*. 2011;57(3):257-262.
102. Bartol TG. The link between type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Adv Stud Med*. 2006; 6(10A):S921-S925.
103. Reaven GM. Banting Lecture: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37(12):1595-1607.
104. DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32(2):S157-S163.
105. Mclellan KCP, Barbalho SM, Cattalini M, Lerario AC. Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. *Rev Nutr Campinas*. 2007; 20(5):515-524.
106. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006; 64(4):355-365.
107. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000; 11(8):327-332.
108. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(6):2548-2556.
109. Hsueh WA, Law R. The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on progression of insulin resistance cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2003; 92(4A):3J-9J.
110. Hu FB, Stampfer MJ, Haffner SM, Solomon CG, Willett WC, Manson JE. Elevated risk of cardiovascular disease prior to clinical diagnosis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002; 25(7):1129-1134.
111. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes Care*. 1993; 16(2):434-444.
112. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Incorporating Nutrition Considerations into Development Policies and Programmes: Brief for Policy-makers and Programme Planners in Developing Countries. Rome: FAO; 2004 [citado em Junho de 2013]. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5343e/y5343e00.pdf>.
113. Acuña K, Cruz T. Avaliação do estado nutricional de adultos e idosos e situação nutricional da população brasileira. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004; 48(3):345-361.

114. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Assessment. Washington (DC): National Academy Press; 2000.
115. Verdú JM, González JL. Evaluación del estado nutricional. In: Serra Majem LI, Aranceta Bartrina JA, Verdú JM. Nutrición y salud pública. Barcelona: Masson; 1995; p. 73-89.
116. Vannucchi H, De Unamuno MRL, Julio Sergio Marchini JS. Avaliação do estado nutricional. Rev Med Ribeirão Preto. 1996; 29:5-18.
117. Fisberg RM, Marchioni DML, Colucci ACA. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009; 53(5):617-624.
118. Thompson FE, Subar AF. Dietary Assessment Methodology. In: Coulston AM, Boushey CJ, Ferruzzi MG. Nutrition in the prevention and treatment of disease. 3rd ed. Londres: Academic Press; 2008; p. 5-46.
119. Willett WC. Food frequency methods. In: Willett WC editors. Nutritional epidemiology. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1998; p. 74-100.
120. Baumgartner RN, Heymsfield SB, Roche AF. Human Body Composition and the Epidemiology of Chronic Disease. Obes Res. 1995; 3(1):73-95.
121. Rezende F, Rosado L, Franceschini S, Rosado G, Ribeiro R, Martins JCB. Revisão crítica dos métodos disponíveis para avaliar a composição corporal em grandes estudos populacionais e clínicos. Arch Latinoam Nutr. 2007; 57(4):327-334.
122. Carrasco F, Reyes E, Rimler O, Rios F. Exactitud del índice de masa corporal en la predicción de la adiposidad medida por impedanciometría bioeléctrica. Arch Latinoam Nutr. 2004; 54(3):280-286.
123. Klein S, Allison DB, Heymsfield SB, Kelley DE, Leibel RL, Nonas C, et al. Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, The Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. Am J Clin Nutr. 2007 May;85(5):1197-202.
124. Deurenberg P, Weststrate JA, Seidell JC. Body mass index as a measure of body fatness: age- and sex-specific prediction formulas. Br J Nutr. 1991; 65(2):105-114.
125. Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y. Health percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. Am J Clin Nutr. 2000; 72(3):694-701.
126. Brodie D, Moscrip V, Hutcheon R. Body composition measurement: a review of hydrodensitometry, anthropometry, and impedance methods. Nutrition. 1998; 14(3):296-310.
127. Dewit O, Fuller NJ, Fewtrell MS, Elia M, Wells JC. Whole body air displacement plethysmography compared with hydrodensitometry for body composition analysis. Arch Dis Child. 2000; 82(2):159-164.
128. Williams CA, Bale P. Bias and limits of agreement between hydrodensitometry, bioelectrical impedance and skinfold calipers measures of percentage body fat. Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 1998; 77(3):271-277.
129. Bottaro MF, Heyward VH, Bezerra RFA, Wagner DR. Skinfold method vs dual-energy x-ray absorptiometry to assess body composition in normal and obese women. J Exer Physiol. 2002; 5(2):11-18.
130. Peterson MJ, Czerwinski SA, Siervogel RM. Development and validation of skinfold-thickness prediction equations with a 4-compartment model. Am J Clin Nutr. 2003; 77(5):1186-1191.
131. Nevill AM, Metsios GS, Jackson AS, Wang J, Thornton J, Gallagher D. Can we use the Jackson and Pollock equations to predict body density/fat of obese individuals in the 21st century?. Int J Body Compos Res. 2008; 6(3):114-121.

132. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gómez J M, et al. Bioelectrical impedance analysis - part I: review of principles and methods. *Clin Nutr.* 2004; 23:1226-1243.
133. Chris J. Bates CJ, Thurnham DI, Bingham SA, Margetts BM. Biochemical markers of nutrient intake. In: Margetts BM, Nelson M. *Design Concepts in Nutritional Epidemiology.* 2nd ed. Nova Iorque: Oxford University Press; 1997; p. 170-240.
134. Blanck HM, Bowman BA, Cooper GR, Myers GL, Miller DT. Laboratory issues: use of nutritional biomarkers. *J Nutr.* 2003; 133(3):S888-S894.
135. Misra A, Khurana L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(11):S9-S30.
136. Barclay AW, Flood VM, Rochtchina E, Mitchell P, Brand-Miller JC. Glycemic index, dietary fiber, and risk of type 2 diabetes in a cohort of older Australians. *Diabetes Care.* 2007; 30(11):2811-2813.
137. Abbatecola AM, Evans W, Paolisso G. PUFA supplements and type 2 diabetes in the elderly. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(36):4126-4134.
138. Salmerón J, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, et al. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(6):1019-1026.
139. Hodge AM, English DR, O'Dea K, Giles GG. Glycemic index and dietary fiber and the risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004; 27(11):2701-2706.
140. McLellan KCP, Barbalho SM, Cattalini M, Lerario AC. Diabetes *mellitus* do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. *Rev Nutr Campinas.* 2007; 20(5):515-524.
141. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, et al. Prevention of type 2 diabetes *mellitus* by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Eng J Med.* 2001; 344(18):1343-1350.
142. Buse JB, Ginsberg HN, Bakris GL, Clark NG, Costa F, Eckel R, et al. Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes *mellitus*: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Circulation.* 2007; 115(1):114-126.
143. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001; 285:2486-2497.
144. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: executive summary. *Circulation.* 2005; 112:2735-2752.
145. Franz MJ, Bantle JP, Beebe CA, Brunzell JD, Chiasson JL, Garg A, et al. Nutrition principles and recommendations in diabetes. *Diabetes Care.* 2004; 27(1):S36-S46.
146. de Souza RJ, Swain JF, Appel LJ, Sacks FM. Alternatives for macronutrient intake and chronic disease: a comparison of the OmniHeart diets with popular diets and with dietary recommendations. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(1):1-11.
147. Pereira RF, Franz MJ. Prevention and treatment of cardiovascular disease in people with diabetes through lifestyle modification: current evidence-based recommendations *Diabetes Spectr.* 2008; 21(3):189-193.
148. Walker C, Reamy BV. Diets for cardiovascular disease prevention: what is the evidence?. *Am Fam Physician.* 2009; 79(7):571-578.
149. Arora SK, McFarlane SI. The case for low carbohydrate diets in diabetes management. *Nutr Metab (Lond).* 2005; 2:16-24.

150. American Diabetes Association, Bantle JP, Wylie-Rosett J, Albright AL, Apovian CM, Clark NG, et al. Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2008; 31(1):S61-S78.
151. Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation*. 2006; 114(1):82-96.
152. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2013. *Diabetes Care*. 2013; 6(1):S11-S66.
153. Klein S, Sheard NF, Pi-Sunyer X, Daly A, Wylie-Rosett J, Kulkarni K, et al. Weight Management Through Lifestyle Modification for the Prevention and Management of Type 2 Diabetes: Rationale and Strategies. *Diabetes Care*. 2004; 27(8):2067-2073.
154. Salas-Salvadó J, Martínez-González MÁ, Bulló M, Ros E. The role of diet in the prevention of type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011; 21(2):B32-B48.
155. Cernea S, Hâncu N, Raz I. Diet and coronary heart disease in diabetes. *Acta Diabetol*. 2003;40(2):S389-S400.
156. Pi-Sunyer X, Blackburn G, Brancati FL, Bray GA, Bright R, Clark JM. The Look AHEAD Research Group. Reduction in weight and cardiovascular disease risk factors in individuals with type 2 diabetes. One-year results of the Look AHEAD trial. *Diabetes Care*. 2007; 30(6):1374-1383.
157. Shenkin A. Micronutrients in health and disease. *Postgrad Med J*. 2006; 82(971):559-567.
158. Dragsted LO, Pedersen A, Hermetter A, Basu S, Hansen M, Haren GR, et al. The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidative defense in healthy nonsmokers. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79(6):1060-1072.
159. Muraki I, Imamura F, Manson JE, Hu FB, Willett WC, van Dam RM, et al. Fruit consumption and risk of type 2 diabetes: results from three prospective longitudinal cohort studies. *BMJ*. 2013; 347:f5001.
160. Seyffarth AS. Os alimentos: calorias, macronutrientes e micronutrientes. In: Sociedade Brasileira de Diabetes editors. *Manual do Nutrição*. São Paulo, 2007, p. 5-8.
161. Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr Campinas*. 1999; 12(2):123-130.
162. Brewer MS. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2011; 10(4):221-247.
163. Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(4):840-860.
164. Blomhoff R. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2005; 16(1):47-54.
165. Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, Bøhn SK, Holte K, Jacobs DR Jr, et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr*. 2006; 84(1):95-135.
166. Tanaka K, Hashimoto T, Tokumaru S, Iguchi H, Kojo S. Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *J Nutr*. 1997; 127(10):2060-2064.
167. Gey KF. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. *Biofactors*. 1998; 7(1/2):113-174.
168. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4(2):89-96.
169. Zimmermann AM, Kirsten VR. Food with antioxidant function in chronic diseases: a clinical approach. *Disc Scientia*. 2008; 9(1):51-68.

170. García-Closas R, Berenguer A, José Tormo M, José Sánchez M, Quirós JR, Navarro C, et al. Dietary sources of vitamin C, vitamin E and specific carotenoids in Spain. *Br J Nutr.* 2004; 91(6):1005-1011.
171. Wang Y, Chun OK, Song WO. Plasma and dietary antioxidant status as cardiovascular disease risk factors: a review of human studies. *Nutrients.* 2013; 5(8):2969-3004.
172. Cuerda C, Luengo LM, Valero MA, Vidal A, Burgos R, Calvo FL, et al. Antioxidantes y diabetes *mellitus*: revisión de la evidencia. *Nutr Hosp.* 2011; 26(1):68-78.
173. Boshtam M, Rafiei M, Golshadi ID, Ani M, Shirani Z, Rostamshirazi M. Long term effects of oral vitamin E supplement in type II diabetic patients. *Int J Vitam Nutr Res.* 2005; 75(5):341-6.
174. Giannini C, Lombardo F, Currò F, Pomilio M, Bucciarelli T, Chiarelli F, et al. Effects of high-dose vitamin E supplementation on oxidative stress and microalbuminuria in young adult patients with childhood onset type 1 diabetes *mellitus*. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007; 23(7):539-546.
175. Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Louis SR, Alwahaibi N, Mohamed J. Palm vitamin E reduces oxidative stress, and physical and morphological alterations of erythrocyte membranes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Oxid Antioxid Med Sci* 2012; 1(1):59-68.
176. Aguirre R, May JM. Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C. *Pharmacol Ther.* 2008; 119(1):96-103.
177. Ozkanlar S, Akcay F. Antioxidant vitamins in atherosclerosis-animal experiments and clinical studies. *Adv Clin Exp Med.* 2012; 21(1):115-123.
178. Hampl JS, Taylor CA, Johnston CS. Vitamin C deficiency and depletion in the United States: the third national health and nutrition examination survey, 1988 to 1994. *Am J Public Health.* 2004; 94(5):870-875.
179. Cook NR, Albert CM, Gaziano JM, Zaharris E, MacFadyen J, Danielson E, et al. A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study. *Arch Intern Med.* 2007; 167(15):1610-1618.
180. Sesso HD, Buring JE, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyen J, et al. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the physicians' health study II randomized trial. *JAMA.* 2008; 300(18):2123-2133.
181. Ye Y, Li J, Yuan Z. Effect of Antioxidant Vitamin Supplementation on Cardiovascular Outcomes: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One.* 2013; 8(2):e56803.
182. Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(6):1265-1271.
183. Rodríguez-Bernaldo de Quirós A, Costa HS. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *J Food Comp Anal.* 2006; 19(2-3):97-111.
184. Lichtenstein AH. Nutrient supplements and cardiovascular disease: a heartbreaking story. *J Lipid Res.* 2009; 50:S429-S433.
185. Yang Y, Chan SW, Hu M, Walden R, Tomlinson B. Effects of some common food constituents on cardiovascular disease. *ISRN Cardiol.* 2011; 2011:397136.
186. Honarbakhsh S, Schachter M. Vitamins and cardiovascular disease. *Br J Nutr.* 2009; 101(8):1113-1131.
187. Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res.* 2007; 55(3):207-216.
188. Johnson EJ. The role of carotenoids in human health. *Nutr Clin Care.* 2002; 5(2):56-65.

189. Chiu HJ, Fischman DA, Hammerling U. Vitamin A depletion causes oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and PARP-1-dependent energy deprivation. *FASEB J.* 2008; 22(11):3878-3887.
190. Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD. *Dietary Reference Intakes: the Essential Guide to Nutrient Requirements.* Washington, DC: The National Academies Press; 2006 [citado em Junho de 2013]. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/11537.html>.
191. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. *Human vitamin and mineral Requirements.* Roma: Food and Nutrition Division; 2001 [citado em Junho de 2013]. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/y2809e/y2809e00.pdf>.
192. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; (2):CD007176.
193. Riccioni G, Bucciarelli T, Mancini B, Corradi F, Di Ilio C, Mattei PA, et al. Antioxidant vitamin supplementation in cardiovascular diseases. *Ann Clin Lab Sci.* 2007; 37(1):89-95.
194. Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry.* 2000; 39(42):13005-13011.
195. Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherotrombotic disease. *Lab Invest.* 2001; 81(5):645-646.
196. Bydlowski SP, Magnanelli AC, Chamone DAF. Hiper-homocisteinemia e Doenças Vaso-Oclusivas. *Arq Bras Cardiol.* 1998; 71(1):69-76.
197. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr.* 1992; 55(1):131-138.
198. Christopher R, Nagaraja D, Shankar SK. Homocysteine and cerebral stroke in developing countries. *Curr Med Chem.* 2007; 14(22):2393-2401.
199. Brustolin S, Giugliani R, Félix TM. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43(1):1-7.
200. De Bree A, Verschuren WMM, Kromhout D, Kluijtmans LAJ, Blom HJ. Homocysteine determinantes and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacological reviews.* 2002; 54(4):599-618.
201. Rassoul F, Richter V, Janke C, Purschwitz K, Klötzer B, Geisel J, Herrmann W. Plasma homocysteine and lipoprotein profile in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Angiology.* 2000; 51(3):189-196.
202. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocysteine. *J Bras Patol Med Lab.* 2004; 40(5):311-320.
203. El-Khairy L, Ueland PM, Refsum H, Graham IM, Vollset SE. Plasma total cysteine as a risk factor for vascular disease. *Circulation.* 2001; 103(21):2544-2549.
204. Pezzini A, Del Zotto E, Padovani A. Homocysteine and cerebral ischemia: pathogenic and terapeutical implications. *Curr Med Chem.* 2007; 14(3):249-263.
205. Herrmann W, Herrmann M, Obeid R. Hyperhomocysteinemia: a critical review of old and new aspects. *Curr Drug Metab.* 2007; 8(1):17-31.
206. Parnetti L, Caso L, Amici S, Lanari A, Gallai V, Bottiglieri T. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for cerebrovascular disease. *Clin Exp Hypertens.* 2002; 24(7-8):501-509.
207. Nair KG, Ashavaid TF, Nair SR, Eghlim FF. The genetic basis of hiperhomocysteinemia. *Indian Heart J.* 2000; 52(7):S16-S17.
208. Gambhir DS, Gambhir JK. Clinical spectrum and diagnosis of homocysteinemia. *Indian Heart J.* 2000; 52(7):S27-S30.

209. Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, Selhub J, Davignon J, Genest J. Plasma total homocysteine in health subjects: sex-specific relation with biological trials. *Am J Clin Nutr.* 1996; 64(4):587-593.
210. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin states and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA.* 1993; 270(22):2693-2698.
211. von Eckardstein A; Malinow MR; Upson B; Heinrich J; Schulte H; Schönfeld R; Köhler E; Assmann G. Effects of age, lipoproteins and hemostatic parameter on the role of homocysteinemia as a cardiovascular risk factor in men. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14(3):460-464.
212. Fonseca V, Gubas SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *End Rev.* 1999; 20(5):738-759.
213. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Zeimbekis A, Zampelas A, Papademetriou L, et al. The associations between smoking, physical activity, dietary habits and plasma homocysteine levels in cardiovascular disease-free people: the 'ATTICA' study. *Vasc Med.* 2004; 9(2):117-123.
214. Vollset SE, Nygård O, Refsum H, Ueland PM. Coffee and homocysteine. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(2):403-404.
215. Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006; 46(2):101-23.
216. Lee WJ, Zhu BT. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis.* 2006; 27(2):269-277.
217. Lawrence de Koning AB, Werstuck GH, Zhou J, Austin RC. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clin Biochem.* 2003; 36(6):431-441.
218. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1969; 56(1):111-28
219. Wilcken DEL, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest.* 1976; 57(4):1079-1082.
220. Munshi MN, Stone A, Fink L, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes *mellitus* and macrovascular disease. *Metabolism.* 1996; 45(1):133-135.
221. McCully KS, Wilson RH. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis.* 1975; 22(2):215-227.
222. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med.* 1999; 131(5):363-375.
223. Morelli VM, Lourenço DM, D'Almeida V, Franco RF, Miranda F, Zago MA, et al. Kerbaux Hyperhomocysteinemia increases the risk of venous thrombosis independent of the C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Brazilian patients. *Blood Coag Fibrinolysis.* 2002; 13(3):271-275.
224. Christen WG, Ajani UA, Glynn RJ, Hennekens CH. Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease. *Arch Intern Med.* 2000; 160(4):422-434.
225. Bautista LE, Arenas IA, Penuela A, Martínez LX. Total plasma homocysteine level and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective cohort studies. *J Clin Epidemiol.* 2002; 55(9):882-887.
226. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA.* 2002; 288(16):2015-2022.

227. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ*. 2002; 325(7374):1202-1206.
228. Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost*. 2005; 3(2):292-299.
229. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Indian Heart J*. 2000; 52(7):S18-S26.
230. Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocysteinemia, vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med*. 1974; 291(11):537-543.
231. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocysteine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest*. 1976; 58(3):731-741.
232. França LHG, Pereira AH, Perini SC, Aveline CC, Argenta R, Mollerke RO, Soares ME, et al. Aterogênese em artéria ilíaca comum de suínos submetidos à homocisteinemia induzida pela ingestão de metionina. *J Vasc Bras*. 2006; 5(1):11-16.
233. Stahlke Junior HJ, França LHG, Stahlke PH, Stahlke PS. Hiper-homocisteinemia causando aterogênese na aorta de coelhos-modelo experimental. *J Vasc Bras*. 2004; 3:20-30.
234. Venâncio LS, Burini RC, Yoshida WB. Tratamento dietético da hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica. *J Vasc Bras*. 2010; 9(1):28-41.
235. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012; 10(1):4-18.
236. Lentz SR. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug;3(8):1646-54.
237. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Diff*. 2004; 11(1):S56-S64.
238. Hayden MR, Tyagi SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes *mellitus*, and atheroscleropathy: The pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutr J*. 2004; 3:4:1-23.
239. Vignini A, Nanetti L, Bacchetti T, Ferretti G, Curatola G, Mazzanti L. Modification induced by homocysteine and low-density lipoprotein on human Aortic Endothelial Cells: an in vitro study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(9):4558-4561.
240. Zinellu A, Zinellu E, Sotgia S, Formato M, Cherchi GM, Deiana L, et al. Factors affecting S-homocysteinylated LDL Apoprotein B. *Clin Chem*. 2006; 52(11):2054-2059.
241. Ferretti G, Bacchetti T, Rabini RA, Vignini A, Nanetti L, Moroni C, et al. Homocysteinylated LDL from subjects with Type 1 diabetes: effect on oxidative damage of human endothelial cells. *Diabet Med*. 2006; 23(7):808-813.
242. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, Vignini A, Nanetti L, Curatola G. Effect of homocysteinylated LDL on lipid peroxidation of human endothelial cells. *J Cell Biochem*. 2004; 92(2):351-360.
243. Poddar R, Sivasubramanian N, Dibello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation*. 2001; 103(22):2717-2723.
244. Ballal RS, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine: update on a new risk factor. *Cleve Clin J Med*. 1997; 64(10):543-549.
245. Dionisio N, Jardín I, Salido GM, Rosado JA. Homocysteine, intracellular signaling and thrombotic disorders. *Curr Med Chem*. 2010; 17(27):3109-3119.
246. Shontz RD, Xu Z, Patel KP, Rozanski GJ. Inhibition of K<sup>+</sup> currents by homocysteine in rat ventricular myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2001; 12(2):183-184.

247. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1987; 262(21):10098-10103.
248. Hogg N. The effect of cysteine on the auto-oxidation of homocysteine. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(1-2):28-33.
249. Welch GN, Upchurch GR, Loscalzo J. Homocysteine, oxidative stress, and vascular disease. *Hosp Pract.* 1997(6); 32:81-92.
250. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to coppercatalyzed endothelial cell injury from homocysteine. *J Clin Invest.* 1986; 77(4):1370-1376.
251. Parthasarathy S. Oxidation of low-density lipoprotein by thiol compounds leads to its recognition by the acetyl LDL receptor. *Biochim Biophys Acta.* 1987; 917(2):337-340.
252. Nishiuch Y, Sasaki M, Nakayasu M, Oikawa A. Cytotoxicity of cysteine inculture media. *In Vitro.* 1976; 12(9):635-638
253. Sheu FS, Zhu W, Fung PC. Direct observation of trapping and release of nitric oxide by glutathione and cysteine with electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biophys J.* 2000; 78(3):1216-1226.
254. Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem.* 1995; 41(3):340-342.
255. Saez G, Thornalley PJ, Hill HAO, Hems R, Bannister JV. The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1982; 719(1):24-31.
256. Vertioef P, Stampfer MJ, Buring JE, Gaziano JM, Allen RH, Stabler SP, et al. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, and folate. *Am J Epidemiol.* 1996; 143(9):845-859.
257. Araki A, Sako Y, Fukushima Y, Matsumoto M, Asada T, Kita T. Plasma sulfhydryl-containing amino acids in patients with cerebral infarction and in hypertensive subjects. *Atherosclerosis.* 1989; 79(2-3):139-146.
258. Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, Lønning PE, Ueland PM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15(2):232-240.
259. Mills BJ, Weiss MM, Lang CA, Liu MC, Ziegler C. Blood glutathione and cysteine changes in cardiovascular disease. *J Lab Clin Med.* 2000; 135(5):396-401.
260. Jacob N, Bruckert E, Giral P, Foglietti MJ, Turpin G. Cysteine is a cardiovascular risk factor in hyperlipidemic patients. *Atherosclerosis.* 1999; 146(1):53-59
261. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Jakobs C, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ. Hyperhomocysteinemia Increases Risk of Death, Especially in Type 2 Diabetes: 5-Year Follow-Up of the Hoorn Study. *Circulation.* 2000; 101(13):1506-1511.
262. Buysschaert M, Dramais AS, Wallemacq PE, Hermans MP. Hyperhomocysteinemia in type 2 diabetes: relationship to macroangiopathy, nephropathy, and insulin resistance. *Diabetes Care.* 2000; 23(12):1816-1822.
263. Goldstein M, Leibovitch I, Yeffimov I, Gavendo S, Sela B-A, Loewenstein A. Hyperhomocysteinemia in patients with diabetes *mellitus* with and without diabetic retinopathy. *Eye.* 2004; 18(5):460-465.
264. de Luis DA, Fernandez N, Arranz ML, Aller R, Izaola O, Romero E. Total homocysteine levels relation with chronic complications of diabetes, body composition, and other cardiovascular risk factors in a population of patients with diabetes *mellitus* type 2. *J Diabetes Complications.* 2005; 19(1):42-46.

265. Ndrepepa G, Kastrati A, Braun S, Koch W, Kölling K, Mehilli J, et al. Circulating homocysteine levels in patients with type 2 diabetes *mellitus*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008; 18(1):66-73.
266. Becker A, Kostense P, Bos G, Heine R, Dekker J, Nijpels G, et al. Hyperhomocysteinemia is associated with coronary events in type 2 diabetes. *J Intern Med*. 2003(3); 253:293-300.
267. Alfthan G, Pekkanen J, Jauhiainen M, Pitkaniemi J, Karvonen M, Tuomilehto J. Relation of serum homocysteine and lipoprotein (a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. *Atherosclerosis*. 1994; 106(1):9-19.
268. Evans R, Shaten B, Hempel, Kuller L. Homocyst(e)ine and Risk of Cardiovascular Disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Thromb Vas Biol*. 1997; 17(10):1947-1953.
269. Passaro A, Calzoni F, Volpato S, Nora ED, Pareschi PL, Zamboni PF, et al. Effect of metabolic control on homocysteine levels in type 2 diabetic patients: a 3-year follow-up. *J Intern Med*. 2003; 254(3):264-271.
270. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 1998; 338(15):1042-1049.
271. Seshadri N, Robinson K. Homocysteine, B Vitamins and coronary artery disease. *Med Clin North Am*. 2000; 84(1):215-237.
272. Pietrzik K, Brönstrup A. Causes and consequences of hyperhomocyst(e)inemia. *Int J Vitam Nutr Res*. 1997; 67(5):389-395.
273. Hoogeveen EK, Kohl B, Zumbach MS, Borcea V, Bierhaus A, Henkels M, et al. Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in IDDM. *Diabetes Care*. 1998; 21(5):841-848.
274. Bellamy MF, McDowell IFW, Ramsey MW, Brownlee M, Bones C, Newcombe RG, et al. Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation*. 1998; 98(18):1848-1852.
275. Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation*. 1999; 99(9):1156-1160.
276. Pimentel GD, Moreto F, Corrente JE, Portero-McLellan C, Burini RC. Associação do padrão de ingestão lipídica com a qualidade da dieta, resistência insulínica e homocisteinemia em adultos. *Acta Med Port*. 2011; 24(5):719-726.
277. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Rosner BA, et al. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*. 1997; 337(21):1491-1499.
278. Berstad P, Konstantinova SV, Refsum H, Nurk E, Vollset SE, Tell GS, et al. Dietary fat and plasma total homocysteine concentrations in 2 adult age groups: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85(6):1598-1605.
279. Graham IM, O'Callaghan P. Vitamins, homocysteine and cardiovascular risk. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2002; 16(5):383-389
280. Venâncio LS. Indicadores nutricionais e níveis de homocisteína em pacientes com doença arterial periférica [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2002.
281. Merchant AT, Hu FB, Spiegelman D, Willet WC, Rimm EB, Ascherio A. The use of B vitamin supplements and peripheral arterial disease risk in men are inversely related. *J Nutr*. 2003; 133(9):2863-2867.
282. Riddell LI, Chisholm A, Williama S, Mann JI. Dietary strategies for lowering homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71(6):1448-1454.
283. Omenn GS, Beresford SAA, Motulsky AG. Preventing coronary heart disease: B vitamins and homocysteine. *Circulation*. 1998; 97(5):421-424.

284. U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services. Dietary Guidelines for Americans, 2010. 7th Edition, Washington, DC: U.S. Government Printing Office; 2010.
285. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, et al. Clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 1997; 336(16):1117-1124.
286. Appel LJ, Sacks FM, Carey VJ, Obarzanek E, Swain JF, Miller ER, et al. The effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial. *JAMA.* 2005; 294(19):2455-2464.
287. Obarzanek E, Sacks FM, Vollmer WM, Bray GA, Miller ER, Lin PH, et al. Effects on blood lipids of a blood pressure-lowering diet: the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) trial. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74(1):80-89.
288. Bazzano LA, Serdula MK, Liu S. Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2003; 5(6):492-499.
289. Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA, et al. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(21):1577-1584.
290. Bermejo LM, Aparicio A, Andrés P, López-Sobaler AM, Ortega RM. The influence of fruit and vegetable intake on the nutritional status and plasma homocysteine levels of institutionalised elderly people. *Public Health Nutr.* 2007; 10(3):266-272.
291. Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Meyboom S, Thomas CM, Duran M, et al. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr.* 1999; 126(6):1135-1139.
292. Hermsdorff HHM, Zulet MA, Puchau B, Martínez Ja. Fruit and vegetable consumption and proinflammatory gene expression from peripheral blood mononuclear cells in young adults: a translational study. *Nutr Metab.* 2010; 7(42):1-11.
293. Hatzis CM, Bertias GK, Linardakis M, Scott JM, Kafatos AG. Dietary and other lifestyle correlates of serum folate concentrations in a healthy adult population Crete, Greece: a cross-sectional study. *Nutr J.* 2006; 5:1-10.
294. World Medical Association. Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Escócia, 2000 [citado em Junho de 2013]. Disponível em: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/06d0331/06D-0331-EC20-Attach-1.pdf>.
295. INSA, IP, INE, IP. Instituto Nacional de Estatística. 4º Inquérito Nacional de Saúde-2005/2006. Lisboa, 2009 [citado em Junho de 2013]. Disponível em: [http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Documents/Epidemiologia/INS\\_05\\_06.pdf](http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Documents/Epidemiologia/INS_05_06.pdf).
296. IPAQ scientific group. Guidelines for Data Processing and Analysis of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ). Geneva, 2005 [citado em Junho de 2013]. Disponível em: <http://www.ipaq.ki.se/scoring.pdf>.
297. Querton L, Buysschaert M, Hermans MP. Hypertriglyceridemia and residual dyslipidemia in statin-treated, patients with diabetes at the highest risk for cardiovascular disease and achieving very-low low-density lipoprotein-cholesterol levels. *J Clin Lipidol.* 2012; 6(5):434-442.
298. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign, USA: Human Kinetics Books, 1991.
299. De Onis M, Onyango AW, Den Broeck JV, Chumlea WC, Martorell R. Measurement and standardization protocols for anthropometry used in the construction of a new international growth reference. *Food Nutr Bull.* 2004; 25(1):S27-S35.

300. World Health Organization. Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation. Geneva, WHO; 2011 [citado em Junho de 2013]. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501491\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501491_eng.pdf).
301. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gómez JM, et al. Bioelectrical impedance analysis - part II: utilization in clinical practice. *Clin Nutr.* 2004; 23(6):1430-1453.
302. Lohman TG. Applicability of body composition techniques and constants for children and youth. *Exerc Sport Sci Rev.* 1986; 14:325-357.
303. Boileau RA, Lohman TG, Slaughter MH. Exercise body composition in children and youth. *Scand J Sports Sci.* 1985; 7:17-27.
304. Faulkner JA. *Physiology of swimming and diving.* Baltimore: Academic Press, 1968:415-446.
305. Deurenberg P, Weststrate JA, Seidell JC. Body mass index as a measure of body fatness: age- and sex-specific prediction formulas. *Br J Nutr.* 1991; 65(2):105-114.
306. Deurenberg P, Yap M, Van Staveren WA. Body mass index and percent body fat. A meta analysis among different ethnic groups. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998; 22(12):1164-1171.
307. Gallagher D, Visser M, Sepulveda D, Pierson RN, Harris T, Heymsfield SB. How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex and ethnic groups. *Am J Epidemiol.* 1996; 143(3):228-239.
308. Jackson AS. Research design and analysis of data procedures for predicting body density. *Med Sci Sports Exercise.* 1984; 16(6):616-620.
309. Jackson AS, Stanforth PR, Gagnon J, et al. The effect of sex, age and race on estimating percentage body fat from body mass index: the Heritage Family Study. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002; 26(6):789-796.
310. Durnin JVG, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr.* 1974; 32(1):77-97.
311. Siri WE. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. In *Techniques for Measuring Body Composition*, Washington DC: J Brozek and A Henschel, 1961:223-234.
312. World Health Organization. *Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry.* Technical Report Series No. 854. World Health Organization, Geneva. 1995. [citado em Junho de 2013]. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_854.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_854.pdf).
313. Lopes C. Reprodutibilidade e validação do questionário semi-quantitativo de frequência alimentar. In: *Alimentação e enfarte agudo do miocárdio: um estudo caso-controlo de base comunitário.* [PhD]. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2000.
314. Vioque J, Gonzales L. Validity of a food frequency questionnaire (preliminary results). *Eur J Cancer Prev.* 1991; 1(1):S19.
315. Rombo MM, Silveira D, Martins I, Cruz A. Modelos fotográficos para inquéritos alimentares. Centro de Estudos de Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (ed.), Lisboa:7 Mares - Comunicação Empresarial, SA, 1996.
316. Porto A, Oliveira L. *A Tabela da Composição dos Alimentos (TCA).* Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Departamento de Alimentação e Nutrição, 2006.
317. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. *Dietary reference applications in dietary planning.* Washington: National Academy Press; 2003.
318. Gueguen S, Herbeth B, Siest G, Leroy P. An isocratic liquid chromatographic method with diode-array detection for the simultaneous determination of  $\alpha$ -tocopherol, retinol, and five carotenoids in human serum. *J Chromatogr Sci.* 2002; 40(2):69-76.

319. Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Determination of nine carotenoids, retinol, retinyl palmitate and  $\alpha$ -tocoferol in control human serum using two internal standards. *Food Chem.* 1992; 45:205-213.
320. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004; p. 19.
321. Hart DJ, Scott KJ. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem.* 1995; 54(1):101-111.
322. Lyan B, Azais-Braesco V, Cardinault N, Tyssandier V, Borel P, Alexandre-Gouabau MC, Grolier P. Simple method for clinical determination of 13 carotenoids in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatographic method. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001; 751(2):297-303.
323. Center for Drug Evaluation and Research. (1996). *Guidance for Industry Q2b: Validation of Analytical Procedures: Methodology*. Rockville: US FDA Federal Register.
324. Center for Drug Evaluation and Research. (1994). *Reviewer guidance: validation of chromatographic methods*. Rockville: US FDA Federal Register.
325. Center for Drug Evaluation and Research. (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. Rockville: US FDA Federal Register.
326. Linke RP. Typing and subtyping of haptoglobin from native serum using disc gel electrophoresis in alkaline buffer: application to routine screening. *Analyt Biochem.* 1984; 141(1):55-61.
327. Bicho MC, Silva AP, Natos A, Silva RM, Bicho MD. Sex steroid hormones influence the risk for cervical cancer: modulation by haptoglobin genetic polymorphism. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009; 191(2):85-89.
328. Bland JM, Altman DG. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet.* 1995; 346(8982):1085-1087.
329. Lohman T G, Skinfolds and body density and their relation to body fatness: a review. *Hum Biol.* 1981; 53(2):181-225.
330. Kris-Etherton PM, Grieger JA, Etherton TD. Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostag Leukotr Ess.* 2009; 81(2-3):99-104.
331. WHO. *Guideline: Sodium intake for adults and children*. Geneva, World Health Organization; 2012 [citado em Junho de 2013]. Disponível em: [http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sodium\\_intake\\_printversion.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sodium_intake_printversion.pdf).
332. Garcia AJ, Apitz-Castro R. Plasma total homocysteine quantification: an improvement of the classical high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection of the thiol-SBD derivatives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002; 779(2):359-363.
333. Yoshida Y, Ohiwa Y, Shimamura M, Izumi T, Yoshida S, Takahashi K, et al. Optimum Conditions for Derivatization of Glutathione, Cysteine and Cysteinylglycine in Human Plasma with Ammonium 7-Fluorobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole-4-Sulfonate for Accurate Quantitation by High-Performance Liquid Chromatography. *J Health Sci.* 2003; 49(6):527-530.
334. Gautier FC, Berneron C, Douce PJ. Determination of homocysteine in plasma by liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 1999; 13(3):239-243.
335. Toyo'oka T, Imai K. Fluorescence analysis of thiols with ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulphonate. *Analyst.* 1984; 109(8):1003-1007.

336. Daskalakis I, Lucock MD, Anderson A, Wild J, Schorah CJ, Levene MI. Biomed. Determination of Plasma Total Homocysteine and Cysteine Using HPLC with Fluorescence Detection and an Ammonium 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulphonate (SBD-F) Derivatization Protocol Optimized for Antioxidant Concentration, Derivatization Reagent Concentration, Temperature and Matrix pH. *Biomed Chromatogr.* 1996; 10(5):205-212.
337. Brattstrom L, Wilcken DE. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect?. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(2):315-23.
338. Dixon ZR, Shie FS, Warden BA, Burri BJ, Neidlinger TR. The effect of a low carotenoid diet on malondialdehyde-thiobarbituric acid (MDA-TBA) concentrations in women: a placebo-controlled double-blind study. *J Am Coll Nutr.* 1998; 17(1):54-58.
339. Kratz A, Ferraro M, Sluss PM, Lewandrowski KB. Laboratory reference values. *N Engl J Med.* 2004; 351(15):1548-1563.
340. Granado F, Olmedilla B, Blanco I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British J Nutr.* 2003; 90(3):487-502.
341. Iverson C, Christiansen S, Flanagin A, et al. *AMA Manual of Style: a guide for authors and editors.* 10nd ed. New York: Oxford University Press; 2007.
342. Leklem JE. Vitamin B-6: A status report. *J Nutr.* 1990; 120(11):S1503-S1507.
343. Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on Cobalamin, Folate, and Homocysteine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003; 1:62-81.
344. Franzblau AN. *A primer of statistics for non-statisticians.* New York: Harcourt, Brace; 1958.
345. Monteiro AB, Filho JF. Análise da composição corporal - uma revisão de métodos. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum.* 2002; 4:80-92.
346. Segal KR, Burastero S, Chun A, Coronel P, Pierson RN Jr, Wang J. Estimation of extracellular and total body water by multiple-frequency bioelectrical-impedance measurement. *Am J Clin Nutr.* 1991; 54(1):26-29.
347. Lainscaka M, Keberb I, Ankerc SD. Body composition changes in patients with systolic heart failure treated with beta blockers: A pilot study. *Int J Cardiol.* 2006; 106(3):319-322.
348. Beeson WL, Batech M, Schultz E, Salto L, Firek A, DeLeon M, Balcazar H, Cordero-MacIntyre Z. Comparison of body composition by bioelectrical impedance analysis and dual-energy X-ray absorptiometry in Hispanic diabetics. *Int J Body Compos Res.* 2010; 8(2):45-50.
349. Ritz P, Sallé A, Audran M, Rohmer V. Comparison of different methods to assess body composition of weight loss in obese and diabetic patients. *Diab Res Clin Pract.* 2007; 77(3):405-411.
350. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for water. *EFSA J.* 2010; 8(3):1459-1507. [citado em Junho de 2013]. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1459.pdf>.
351. Gomes MB, Neto DG, Mendonça E, Tambascia MA, Fonseca RM, Réa RR, et al. Prevalência de Sobrepeso e Obesidade em Pacientes Com Diabetes *Mellitus* do Tipo 2 no Brasil: Estudo Multicêntrico Nacional. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50(1):136-144.
352. Daousi C, Casson IF, Gill GV, MacFarlane IA, Wilding JPH, Pinkney JH. Prevalence of obesity in type 2 diabetes in secondary care: association with cardiovascular risk factors. *Postgrad Med J.* 2006; 82(966):280-284.
353. Kamath A, Shivaprakash G, Adhikari P. Body mass index and Waist circumference in Type 2 Diabetes *mellitus* patients attending a diabetes clinic. *Int J Biol Med Res.* 2011; 2(3):636-638.
354. Poljičanin T, Pavlić-Renar I, Metelko Ž. Obesity in type 2 diabetes: prevalence, treatment trends and dilemmas. *Coll Antropol.* 2011; 35(3):829–834.

355. Meeuwssen S, Horgan GW, Elia M. The relationship between BMI and percent body fat, measured by bioelectrical impedance, in a large adult sample is curvilinear and influenced by age and sex. *Clin Nutr.* 2010; 29(5):560-566.
356. Englyst NA, Crookb MA, Lumbb P, Stearsc AJ, Masding MG, Woottonc SA, et al. Percentage of body fat and plasma glucose predict plasma sialic acid concentration in type 2 diabetes *mellitus*. *Metabolism Clinical and Experimental.* 2006; 55(9):1165-1170.
357. Gómez-Ambrosi J, Silva C, Galofré JC, Escalada J, Santos S, Gil MJ, et al. Body adiposity and type 2 diabetes: increased risk with a high body fat percentage even having a normal BMI. *Obesity.* 2011; 19(7):1439-1444.
358. Jiménez LG, Martín-Moreno JM. Cuestionario de frecuencia de consumo alimentario. In: Serra Majem LI, Aranceta Bartrina JA, Verdú JM. *Nutrición y salud pública.* Barcelona: Masson; 1995; p. 120-125.
359. Castro SR. Alimentação mediterrânica e o controlo glicémico da diabetes *mellitus* tipo 2. Porto: Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto; 2006. [citado em Junho de 2013]. Disponível em: [http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/54782/2/107072\\_06-30T\\_TL\\_01\\_P.pdf](http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/54782/2/107072_06-30T_TL_01_P.pdf).
360. Lopes C, Oliveira A, Santos AC, Ramos E, Gaio AR, Severo M, Barros H. Consumo alimentar no Porto. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2006. [citado em Junho de 2013]. Disponível em: [www.consumoalimentarporto.med.up.pt](http://www.consumoalimentarporto.med.up.pt).
361. Carlsen MH, Lillegaard ITL, Karlsen A, Blomhoff R, Drevon CA, Andersen LF. Evaluation of energy and dietary intake estimates from a food frequency questionnaire using independent energy expenditure measurement and weighed food records. *Nutr J.* 2010; 9:37-45.
362. Dooren C, Kramer G. Food patterns and dietary recommendations in Spain, France and Sweden. Gouda: LiveWELL for Life; 2012. [citado em Junho de 2013]. Disponível em: [http://www.scp-knowledge.eu/sites/default/files/knowledge/attachments/LiveWell%20for%20Life\\_2012\\_Food%20patterns%20and%20dietary%20recommendations%20in%20Spain,%20France%20and%20Sweden.pdf](http://www.scp-knowledge.eu/sites/default/files/knowledge/attachments/LiveWell%20for%20Life_2012_Food%20patterns%20and%20dietary%20recommendations%20in%20Spain,%20France%20and%20Sweden.pdf).
363. van Rossum CTM, Franssen HP, Verkaik-Kloosterman J, Buurma-Rethans EJM, Ocké MC. Dutch National Food Consumption Survey 2007-2010. Colophon; 2011. [citado em Junho de 2013]. Disponível em: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/350050006.pdf>.
364. Murphy SP, Poos MI. Dietary Reference Intakes: summary of applications in dietary assessment. *Public Health Nutr.* 2002; 5(6A):843-849.
365. Slater B, Marchioni DL, Fisberg RM. Estimando a prevalência da ingestão inadequada de nutrientes. *Rev Saúde Pública.* 2004; 38(4):599-605.
366. Baz-Hecht M, Goldfine AB. The impact of vitamin D deficiency on diabetes and cardiovascular risk. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010; 17(2):113-119.
367. Kulie T, Groff A, Redmer J, Hounshell J, Schragger S. Vitamin D: an evidence-based review. *J Am Board Fam Med.* 2009; 22:698-706.
368. Feldstein CA. Salt intake, hypertension and diabetes *mellitus*. *J Hum Hypertens.* 2002; 16(1):S48-S51.
369. Whelton PK, Appel LJ, Espeland MA, Applegate WB, Ettinger WH Jr, Kostis JB, et al. Sodium reduction and weight loss in the treatment of hypertension in older persons: a randomized controlled trial of nonpharmacologic interventions in the elderly (TONE). TONE Collaborative Research Group. *JAMA.* 1998; 279(11):839-846.
370. Tokgöz S, Bilgi C, Çakir E, Erbil MK, Kutluay T. A modified method for the determination of plasma total homocysteine by high performance liquid chromatography. *J Med Sci.* 2003; 33:71-76.

371. Rizzo V, Montalbetti L, Valli M, Bosoni T, Scoglio E, Moratti R. Study of factors affecting the determination of total plasma 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate (SBD)-thiol derivatives by liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 1998; 706(2):209-215.
372. Fermo I, Arcelloni C, Mazzola G, D'Angelo A, Paroni R. High-performance liquid chromatographic method for measuring total plasma homocysteine levels. *J Chromatogr B*. 1998; 719(1-2):31-36.
373. Krijt J, Vacková M, Kožch V. Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: advantages of using Tris(2-carboxyethyl)phosphine as reductant compared with Tri-n-butylphosphine. *Clin Chem*. 2001; 47(10):1821-1828.
374. Frick B, Schröcksnadel K, Neurauter G, Wirleitner B, Artner-Dworzak E, Fuchs D. Rapid measurement of total plasma homocysteine by HPLC. *Clin Chim Acta* 2003; 331(1-2):19-23.
375. Carducci C, Birarelli M, Nola M, Antonozzi I. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of homocysteine in plasma samples. *J Chromatogr A*. 1999; 846(1-2):93-100.
376. Bidlingmeyer BA, Broske AD. The Role of Pore Size and Stationary Phase Composition in Preventing Aqueous-Induced Retention Time Loss in Reversed-Phase HPLC. *J Chromatogr Sci*. 2004; 42(2):100-106.
377. Talwar D, Quasim T, McMillan DC, Kinsella J, Williamson C, O'Reilly DS. Optimisation and validation of a sensitive high-performance liquid chromatography assay for routine measurement of pyridoxal 5-phosphate in human plasma and red cells using pre-column semicarbazide derivatisation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003; 792(2):333-343.
378. Bailey AL, Wright AJA, Southon S. High performance liquid chromatography method for the determination of pyridoxal-5-phosphate in human plasma: How appropriate are cut-off values for vitamin B6 deficiency? *Eur J Clin Nutr*. 1999; 53(6):448-455.
379. Giorgi MG, Howland K, Martin C, Bonner AB. A Novel HPLC Method for the Concurrent Analysis and Quantitation of Seven Water-Soluble Vitamins in Biological Fluids (Plasma and Urine): A Validation Study and Application. *ScientificWorldJournal*. 2012; Article ID 359721, 8 pages. doi:10.1100/2012/359721.
380. Bisp MR, Mustafa Vakur Bora MV, Heinsviga E-M, Kallb MA, Nexø E. Determination of Vitamin B6 Vitamers and Pyridoxic Acid in Plasma: Development and Evaluation of a High-Performance Liquid Chromatographic Assay. *Anal Biochem*. 2002; 305(1):82-89.
381. Deitricka CL, Katholia RE, Huddlestonc DJ, Hardiek K, Burrus L. Clinical adaptation of a high-performance liquid chromatographic method for the assay of pyridoxal 5'-phosphate in human plasma. *J Chromatogr B*. 2001(2); 751:383-387.
382. Karlsen A, Blomhoff R, Gundersen TE. Stability of whole blood and plasma ascorbic acid. *Eur J Clin Nutr*. 2007; 61(10):1233-1236.
383. Valente A, Sanches-Silva A, Albuquerque TG, Costa HS. Development of an orange juice in-house reference material and its application to guarantee the quality of vitamin C determination in fruits, juices and fruit pulps. *Food Chem*. 2013; In press 2013.
384. Valente A, Albuquerque TG, Sanches-Silva A, Costa HS. Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. *Food Res Int*. 2011; 44:2237-2242.
385. Karlsen A, Blomhoff R, Gundersen TE. High-throughput analysis of Vitamin C in human plasma with the use of HPLC with monolithic column and UV-detection. *J Chromatogr B*. 2005; 824(1-2):132-138.
386. Kand'ár R, Žáková P. Determination of ascorbic acid in human plasma with a view to stability using HPLC with UV detection. *J Sep Sci*. 2008; 31(20):3503-3508.

387. Li X, Franke AA. Fast HPLC–ECD analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and uric acid. *J Chromatogr B*. 2009; 877(10):853-856.
388. Moselhy HF, Reid RG, Yousef S, Boyle SP. A Specific, Accurate and Sensitive Measure of Total Plasma Malondialdehyde by HPLC. *J Lipid Res*. 2013; 54(3):852-858.
389. Pasupathi P, Chandraseker V, Kumar US. Evaluation of oxidative stress, enzymatic and non enzymatic antioxidants and metabolic thyroid status in patients with diabetes *mellitus*. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2009; 3(3):160-165.
390. Zortea K, Fernandes BS, Guimaraes LR, Francesconi LP, Lersch C, Gama CS, et al. Reduced serum non-enzymatic antioxidant defense and lipid peroxidation in schizophrenic patients on a hypocaloric diet. *Neurosci Lett*. 2012; 512(1):43-47.
391. Karacay O, Sepici- Dincel A, Kacaaltincaba D, Sahin D, Yalvac S, Akyol H, et al. A quantitative evaluation of total antioxidant status and oxidative stress markers in pre eclampsia and gestational diabetic patients in 24-36 weeks of gestation. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010; 89(3):231-238.
392. Antunes MV, Lazzaretti C, Gamaro GD, Linden R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Braz J Pharm Sci*. 2008; 44(2):279-287.
393. Londero D, Lo Greco P. Automated high-performance liquid chromatographic separation with spectrofluorometric detection of a malondialdehyde thiobarbituric acid adduct in plasma. *J Chromatogr A*. 1996; 729(1-2):207-210.
394. Agarwal R, Chase SD. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B*. 2002; 775(1):121-126.
395. Lee B-L, New A-L, Ong C-N. Simultaneous determination of tocotrienols, tocopherols, retinol, and major carotenoids in human plasma. *Clin Chem*. 2003; 49(12):2056-2066.
396. Karppia J, Nurmia T, Olmedilla-Alonso B, Granado-Lorenciob F, Nyysönenena K. Simultaneous measurement of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and six carotenoids in human plasma by using an isocratic reversed-phase HPLC method. *J Chromatogr B*. 2008; 867(2):226-232.
397. Koubaa N, Nakbi A, Smaoui M, Abid N, Chaaba R, Abid M, et al. Hyperhomocysteinemia and elevated ox-LDL in Tunisian type 2 diabetic patients: role of genetic and dietary factors. *Clin Biochem*. 2007; 40(13-14):1007-1014.
398. Gariballa S, Afandi B, Haltem MA, Yassin J, Alessa A. Effect of antioxidants and B-Group vitamins on risk of Infections in patients with type 2 diabetes *mellitus*. *Nutrients*. 2013; 5(3):711-724.
399. Gu W, Lu J, Yang G, Dou J, Mu Y, Meng J, et al. Plasma homocysteine thiolactone associated with risk of macrovasculopathy in Chinese patients with type 2 diabetes *mellitus*. *Adv Ther*. 2008; 25(9):914-924.
400. Tappia PS, Xu Y-J, Rodriguez-Leyva D, Aroutiounova N, Dhalla NS. Cardioprotective effects of cysteine alone or in combination with taurine in diabetes. *Physiol Res*. 2013; 62(2):171-178.
401. Salemi G, Gueli MC, D'Amelio M, Saia V, Mangiapane P, Aridon P, et al. Blood levels of homocysteine, cysteine, glutathione, folic acid, and vitamin B<sub>12</sub> in the acute phase of atherothrombotic stroke. *Neurol Sci*. 2009; 30(4):361-364.
402. Aldebasi Y, Mohieldein A, Almansour Y, Almoteri B. Imbalance of Oxidant/Antioxidant Status and Risk Factors for Saudi Type 2 Diabetic Patients with Retinopathy. *BJMMR*. 2011; 1(4):371-384.

403. Paşaoğlu H, Sancak B, Bukan N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes *mellitus*. *Tohoku J Exp Med*. 2004; 203(3):211-218.
404. Winterbone MS, Sampson MJ, Saha S, Hughes JC, Hughes DA. Pro-oxidant effect of  $\alpha$ -tocopherol in patients with Type 2 Diabetes after an oral glucose tolerance test - a randomised controlled trial. *Cardiovasc Diabetol*. 2007; 6(8):1-6.
405. Olmedilla B, Granado F, Gil-Martinez E, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Reference values for retinol, tocopherol, and main carotenoids in serum of control and insulindependent diabetic Spanish subjects. *Clin Chem*. 1997; 43(6):1066-1071.
406. Ylönen K, Alfthan G, Groop L, Saloranta C, Aro A, Virtanen SM, et al. Dietary intakes and plasma concentrations of carotenoids and tocopherols in relation to glucose metabolism in subjects at high risk of type 2 diabetes: the Botnia Dietary Study. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77(6):1434-41.
407. Abahusain MA, Wright J, Dickerson JWT, de Vol EB. Retinol,  $\alpha$ -tocopherol and carotenoids in diabetes. *Eur J Clin Nutr*. 1999; 53(8):630-635.
408. Merzouk S, Hichami A, Madani S, Merzouk H, Berrouiguet AY, Prost J, et al. Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetic subjects with multiple complications. *Gen. Physiol. Biophys*. 2003; 22(1):15-27.
409. Yamada H, Yamada K, Waki M, Umegaki K. Lymphocyte and plasma vitamin C levels in type 2 diabetic patients with and without diabetes complications. *Diabetes Care*. 2004; 27(10):2491-2492.
410. Chen H, Karne RJ, Hall G, Campia U, Panza JA, Cannon III RO, et al. High-dose oral vitamin C partially replenishes vitamin C levels in patients with type 2 diabetes and low vitamin C levels but does not improve endothelial dysfunction or insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290(1):H137-H145.
411. Carter P, Gray LJ, Talbot D, Morris DH, Khunti K, Davies MJ. Fruit and vegetable intake and the association with glucose parameters: a cross-sectional analysis of the Let's Prevent Diabetes Study. *Eur J Clin Nutr*. 2013; 67(1):12-17.
412. Coyne T, Ibiebele TI, Baade PD, Dobson A, McClintock C, Dunn S, et al. Diabetes *mellitus* and serum carotenoids: findings of a population-based study in Queensland, Australia. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82(3):685-693.
413. Olmedilla B, Granado F, Southon S, Wright AJA, Blanco I, Gil-Martinez E, et al. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries *Br J Nutr*. 2001; 85(2):227-238.
414. Jansen MCJF, Kappel AV, Ocké MC, Veer PV, Boshuizen HC, E Riboli E, et al. Plasma carotenoid levels in Dutch men and women, and the relation with vegetable and fruit consumption *Eur J Clin Nutr*. 2004; 58(10):1386-1395.
415. Mangels AR, Holden JM, Beecher GR, Forman MR, Lanza E. Carotenoid content of fruits and vegetables: An evaluation of analytic data. *J Am Diet Assoc*. 1993; 93(3):284-296.
416. Strain JJ, Dowe L, Ward M, Pentieva K, McNulty H. B-vitamins, homocysteine metabolism and CVD. *Proc Nutr Soc*. 2004; 63(4):597-603.
417. Ahn HJ, Min KW, Cho Y-O. Assessment of vitamin B<sub>6</sub> status in Korean patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Nutr Res Pract*. 2011; 5(1):34-39.
418. Satyanarayana A, Balakrishna N, Pitla S, Reddy PY, Mudili S, Lopamudra P, et al. Status of B-Vitamins and homocysteine in diabetic retinopathy: association with vitamin-B<sub>12</sub> deficiency and hyperhomocysteinemia. *PLoS ONE*. 2011; 6(11):e26747.
419. Aghamohammadi V, Gargari BP, Aliasgharzadeh A. Effect of Folic Acid Supplementation on homocysteine, serum total antioxidant capacity, and malondialdehyde in patients with type 2 diabetes *mellitus*. *J Am Coll Nutr*. 2011; 30(3):210-215.

420. Pflipsen MC, Oh RC, Saguil A, Seehusen DA, Seaquist D, Topolski R. The prevalence of vitamin B<sub>12</sub> deficiency in patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *J Am Board Fam Med.* 2009; 22(5):528-534.
421. De Chiara B, Sedda V, Parolini M, Campolo J, DeMaria R, Caruso R, et al. Plasma total cysteine and cardiovascular risk burden: action and interaction. *Sci World J.* 2012; 303654.
422. Crabtree MJ, Hale AB, Channon KM. Dihydrofolate reductase protects endothelial nitric oxide synthase from uncoupling 3 in tetrahydrobiopterin deficiency. *Free Radic Biol Med.* 2011; 50(11):1639-1646.
423. Miyazawa T, Nakagawa K, Shimasaki S, Nagai R. Lipid glycation and protein glycation in diabetes and atherosclerosis. *Amino Acids.* 2012; 42(4):1163-1170.
424. Yu HG, Park S-P, Kim K, Kim Y, Seo J-M, Park K, et al. Preventive effect of pyridoxal 5'-Phosphate on the diabetic retinopathy of streptozotocin-induced diabetic rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46: E-Abstract 362.
425. Stitt A, Gardiner TA, Anderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, et al. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes.* 202; 51(9):2826-2832.
426. Ellis JM, Folkers K, Minadeo M, VanBuskirk R, Xia LJ, Tamagawa H. A deficiency of vitamin B6 is a plausible molecular basis of the retinopathy of patients with diabetes *mellitus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;179(1):615-619.
427. Wierzbicki AS. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diab Vasc Dis Res.* 2007; 4(2):143-150.
428. Lippi G, Plebani M. Hyperhomocysteinemia in health and disease: where we are now, and where do we go from here ?. *Clin Chem Lab Med.* 2012; 50(12):2075-2080.
429. Hoffman M. Hypothesis: hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress. *Med Hypotheses.* 2011; 77(6):1088-1093.
430. Elshorbagy AK, Nurk E, Gjesdal CG, Tell GS, Ueland PM, Nygård O, et al. Homocysteine, cysteine, and body composition in the Hordaland Homocysteine Study: does cysteine link amino acid and lipid metabolism?. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(3):738-746.
431. Jain SK. L-cysteine supplementation as an adjuvant therapy for type-2 diabetes. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012; 90(8):1061-1064.
432. Sekhar RV, McKay SV, Patel SG, Guthikonda AP, Reddy VT, Balasubramanyam A, et al. Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. *Diabetes Care.* 2011; 34(1):162-167.
433. Ozdemir G, Ozden M, Maral H, Kuskay S, Cetinalp P, Tarkun I. Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. *Ann Clin Biochem.* 2005; 42(2):99-104.
434. Jialal I, Devaraj S. Antioxidants and atherosclerosis: don't throw out the baby with the bath water. *Circulation.* 2003; 107(7):926-928.
435. Moats C, Rimm EB. Vitamin intake and risk of coronary disease: observation versus intervention. *Curr Atheroscler Rep.* 2007; 9(6):508-514.
436. Costacou T, Zgibor JC, Evans RW, Tyurina YY, Kagan VE, Orchard TJ. Antioxidants and coronary artery disease among individuals with type 1 diabetes: findings from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *J Diabetes Complications.* 2006; 20(6):387-394.
437. Sarmiento RA, Silva FM, Sbruzzi G, Schaan BD, Almeida JC. Antioxidant micronutrients and cardiovascular risk in patients with diabetes: A systematic review. *Arq Bras Cardiol.* 2013; pii: S0066-782X2013005000056.

438. Brazionis L, Walker KZ, Itsiopoulos C, O'Dea K. Plasma retinol: a novel marker for cardiovascular disease mortality in Australian adults. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012; 22(10):914-920.
439. Gariballa S, Afandi B, AbuHaltem M, Yassin J, Habib H, Ibrahim W. Oxidative damage and inflammation in obese diabetic Emirati subjects supplemented with antioxidants and B-vitamins: a randomized placebo-controlled trail. *Nutrition Nutr Metab (Lond).* 2013; 10(1):21-27.
440. Floegel A, Chung S-J, von Ruesten A, Yang M, Chung CE, Song WO, et al. Antioxidant intake from diet and supplements and elevated serum C-reactive protein and plasma homocysteine concentrations in US adults: a cross-sectional study. *Pub Health Nutr.* 2011; 14(11):2055-2064.
441. Cascalheira JF, Parreira MC, Viegas AN, Faria MC, Domingues FC. Serum homocysteine: relationship with circulating levels of cortisol and ascorbate. *Ann Nutr Metab.* 2008; 53(1):67-74.
442. Donaldson MS. A carotenoid health index based on plasma carotenoids and health outcomes. *Nutrients.* 2011; 3(12):1003-1022.
443. Brazionis L, Rowley K, Itsiopoulos C, O'Dea K. Plasma carotenoids and diabetic retinopathy. *Br J Nutr.* 2009; 101(2):270-277.
444. Samman S, Sivarajah G, Man JC, Ahmad ZI, Petocz P, Caterson ID. A mixed fruit and vegetable concentrate increases plasma antioxidant vitamins and folate and lowers plasma homocysteine in men. *J Nutr.* 2003; 133(7):2188-2193.
445. Sosin MD, Patel JV, Bhatia GS, Hughes EA, Davis RC, Lip GY. Effects of white European, African Caribbean and South Asian ethnicity on homocysteine levels in patients with systolic heart failure. *Int J Cardiol.* 2008; 129(1):69-75.
446. Al-Maskari MY, Waly MI, Ali A, Al-Shuaibi YS, Ouhtit A. Folate and vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia promote oxidative stress in adult type 2 diabetes. *Nutrition.* 2012; 28(7-8):e23-26.
447. Rafnsson SB, Saravanan P, Bhopal RS, Yajnik CS. Is a low blood level of vitamin B12 a cardiovascular and diabetes risk factor?. A systematic review of cohort studies. *Eur J Nutr.* 2011; 50(2):97-106.
448. Sudchada P, Saokaew S, Sridetch S, Incampa S, Jaiyen S, Khaithong W. Effect of folic acid supplementation on plasma total homocysteine levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012; 98(1):151-158.
449. Shargorodsky M, Boaz M, Pasternak S, Hanah R, Matas Z, Fux A, et al. Serum homocysteine, folate, vitamin B12 levels and arterial stiffness in diabetic patients: which of them is really important in atherogenesis?. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009; 25(1):70-75.
450. Casais P, Alberto MF, Salviú MJ, Meschengieser SS, Aixalá M, Lazzari MA. Pilot study of homocysteine and cysteine in patients with thrombosis in different vascular sites. Epidemiology and response to folate. *Thromb Res.* 2009;123(4):592-596.
451. Rekha S, ML P, Pooja G, Pushpalata S, SM N, Y P. Correlation of plasma homocysteine levels with BMI and insulin resistance, amongst obese, overweight, and non obese infertile women. *Inter J Sci Res Pub.* 2012; 2(5):1-6.
452. Shin KA. Association between obesity factors and homocysteine levels with the metabolic syndrome. *Korean J Clin Lab Sci.* 2012; 44(3):147-154.
453. Vayá A, Rivera L, Hernández-Mijares A, Fuentea M, Eva Solá E, Romagnolic M, et al. Homocysteine levels in morbidly obese patients. Its association with waist circumference and insulin resistance. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2012; 52(1):49-56.

454. Elshorbagy AK, Smith AD, Kozich V, Refsum H. Cysteine and Obesity. *Obesity*. 2012; 20(3):473-481.
455. Sutton-Tyrrell K, Bostom A, Selhub J, Zeigler-Johnson C. High homocysteine levels are independently related to isolated systolic hypertension in older adults. *Circulation*. 1997; 96(6):1745-1749.
456. Marti F, Vollenweider P, Marques-Vidal P-M, Mooser V, Waeber G, Paccaud F, et al. Hyperhomocysteinemia is independently associated with albuminuria in the populationbased CoLaus study. *BMC Public Health*. 2011; 11:733-741.
457. Sen U, Tyagi SC. Homocysteine and hypertension in diabetes: does PPAR $\gamma$  have a regulatory role?. *PPAR Res*. 2010; 2010:806538.
458. Stehouwer CD, van Guldener C. Does homocysteine cause hypertension?. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41(11):1408-1411.
459. Sundström J, Sullivan L, D'Agostino RB, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH, et al. Plasma homocysteine, hypertension incidence, and blood pressure tracking: the Framingham Heart Study. *Hypertension*. 2003; 42:1100-1105.
460. Altorf-van der Kuil W, Engberink MF, De Neve M, van Rooij FJ, Hofman A, van't Veer P, et al. Dietary amino acids and the risk of hypertension in a Dutch older population: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr*. 2013; 97(2):403-410.
461. Radtke KK, Coles LD, Mishra U, Orchard PJ, Holmay M, Cloyd JC. Interaction of N-acetylcysteine and cysteine in human plasma. *J Pharm Sci*. 2012; 101(12):4653-4659.
462. Vasdev S, Singal P, Gill V. The antihypertensive effect of cysteine. *Int J Angiol*. 2009; 18(1):7-21.
463. Pechánová O, Zicha J, Kojsová S, Dobesová Z, Jendeková L, Kunes J. Effect of chronic N-acetylcysteine treatment on the development of spontaneous hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 2006; 110(2):235-242.
464. Song D, Hutchings S, Pang CC. Chronic N-acetylcysteine prevents fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Eur J Pharmacol*. 2005; 508(1-3):205-210.
465. Rauchová H, Pechánová O, Kunes J, Vokurková M, Dobesová Z, Zicha J. Chronic N-acetylcysteine administration prevents development of hypertension in N(omega)-nitro-L-argininemethyl ester-treated rats: the role of reactive oxygen species. *Hypertens Res*. 2005; 28(5):475-482.
466. Kurl S, Tuomainen TP, Laukkanen JA, Nyssönen K, Lakka T, Sivenius J, et al. Plasma vitamin C modifies the association between hypertension and risk of stroke. *Stroke*. 2002; 33(6):1568-1573.
467. Xiao Y, Zhang Y, Lv X, Su D, Li D, Xia M, et al. Relationship between lipid profiles and plasma total homocysteine, cysteine and the risk of coronary artery disease in coronary angiographic subjects. *Lipids Health Dis*. 2011; 10:137-143.
468. Ni M, Zhang XH, Jiang SL, Zhang Y. Homocysteinemia as an independent risk factor in the Chinese population at a high risk of coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2007; 100(3):455-8.
469. Taskinen M-R, Sullivan DR, Ehnholm C, Whiting M, Zannino D, R. John Simes, et al. Relationships of HDL cholesterol, ApoA-I, and ApoA-II with homocysteine and creatinine in patients with type 2 diabetes treated with fenofibrate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29(6):950-995.
470. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: A Statement for Healthcare. *Circulation*. 1999; 99(1):178-182.

471. Turner-McGrievy GM, Barnard ND, Cohen J, Jenkins DJ, Gloede L, Green AA. Changes in nutrient intake and dietary quality among participants with type 2 diabetes following a low-fat vegandiet or a conventional diabetes diet for 22 weeks. *J Am Diet Assoc.* 2008; 108(10):1636-1645.
472. Wheeler ML, Dunbar SA, Jaacks LM, Karmally W, Mayer-Davis EJ, Wylie-Rosett J, Yancy WS Jr. Macronutrients, food groups, and eating patterns in the management of diabetes: a systematic review of the literature, 2010. *Diabetes Care.* 2012; 35(2):434-445.
473. Garlick PJ. Toxicity of Methionine in Humans. *J. Nutr.* 2006; 136(6):S1722-S1725.
474. Troen AM, Lutgens E, Smith DE, Rosenberg IH, Selhub J. The atherogenic effect of excess methionine intake. *PNAS.* 2003; 100(25): 15089-15094.
475. Haulrik N, Toubro S, Dyerberg J, Stender S, Skov AR, Astrup A. Effect of protein and methionine intakes on plasma homocysteine concentrations: a 6-mo randomized controlled trial in overweight subjects. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(6):1202-1206.
476. Ward M, McNulty H, McPartlin J, Strain JJ, Weir DG, Scott JM. Effect of supplemental methionine on plasma homocysteine concentrations in healthy men: a preliminary study. *Int J Vitam Nutr Res.* 2001; 71(1):82-86.
477. Guttormsen AB, Schneede J, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsun HM. Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiol compounds are related to food intake in healthy human subjects. *J Nutr.* 1994; 124(10):1934-1941.
478. Chiarelli F, Pomilio M, Mohn A, Tumini S, Vanelli M, Morgese G, et al. Homocysteine levels during fasting and after methionine loading in adolescents with diabetic retinopathy and nephropathy. *J Pediatr.* 2000; 137(3):386-392.
479. Ventura P, Panini R, Emiliani S, Salvioli G. Plasma homocysteine after insulin infusion in type II diabetic patients with and without methionine intolerance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2004; 112(1):44-51.
480. Lever M, Slow S, McGregor DO, Dellow WJ, George PM, Stephen T, et al. Variability of plasma and urine betaine in diabetes *mellitus* and its relationship to methionine load test responses: an observational study. *Cardiovasc Diabetol.* 2012; 11:34-41.
481. Dauchet L, Amouyel P, Hercberg S, Dallongeville J. Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *J Nutr.* 2006; 136(10):2588-2593.
482. Cooper AJ, Forouhi NG, Ye Z, Buijsse B, Arriola L, Balkau B, et al. Fruit and vegetable intake and type 2 diabetes: EPIC-InterAct prospective study and meta-analysis. *Eur J Clin Nutr.* 2012; 66(10):1082-1092.
483. Hamer M, Chida Y. Intake of fruit, vegetables, and antioxidants and risk of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *J Hypertens.* 2007; 25(12):2361-2369.
484. Carter P, Gray LJ, Troughton J, Khunti K, Davies MJ. Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes *mellitus*: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2010; 341:c4229.
485. Bogers RP, Dagnelie PC, Bast A, van Leeuwen M, van Klaveren JD, van den Brandt PA. Effect of increased vegetable and fruit consumption on plasma folate and homocysteine concentrations. *Nutrition.* 2007; 23(2):97-102.
486. Diakoumopoulou E, Tentolouris N, Kirlaki E, Perrea D, Kitsou E, Psallas M, et al. Plasma homocysteine levels in patients with type 2 diabetes in a Mediterranean population: relation with nutritional and other factors. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005;15(2):109-117.
487. Chang N, Kim J-M, Kim H, Cho YW. Plasma total homocysteine and macrovascular complications are associated with food and nutrient intake in patients with Type II diabetes *mellitus*. *Nutr Res Pract.* 2007; 2:79-83.

488. Zarini G, Gomez GP, Nath S, Huffman FG. High Fruit and Vegetable Intakes are Associated with Lower Homocysteine Levels in Cuban-Americans. *FASEB J.* 2008; 22:702-728.
489. World Health Organization, Food and Agriculture Organization. Fruit and vegetables for health: Report of a Joint FAO/WHO Workshop. Japan: Kobe; 2004.
490. Mayne ST. Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr.* 2003; 133:S933-S940.
491. Nakhjavani M, Esteghamati A, Nowroozi S, Asgarani F, Rashidi A, Khalilzadeh O. Type 2 diabetes *mellitus* duration: an independent predictor of serum malondialdehyde levels. *Singapore Med J.* 2010; 51(7):582-585.
492. Polidori MC, Cherubini A, Stahl W, Senin U, Sies H, Mecocci P. Plasma carotenoid and malondialdehyde levels in ischemic stroke patients: relationship to early outcome. *Free Radic Res.* 2002; 36(3):265-268.
493. Duman BS, Oztürk M, Yilmazeri S, Hatemi H. Thiols, malonaldehyde and total antioxidant status in the Turkish patients with type 2 diabetes *mellitus*. *Tohoku J Exp Med.* 2003; 201(3):147-155.
494. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 9(6):813-839.
495. Kaefer M, De Carvalho JA, Piva SJ, da Silva DB, Becker AM, Sangoi MB, et al. Plasma malondialdehyde levels and risk factors for the development of chronic complications in type 2 diabetic patients on insulin therapy. *Clin Lab.* 2012; 58(9-10):973-978.
496. Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002; 26(9):1159-1164.
497. Lodovici M, Bigagli E, Bardini G, Rotella CM. Lipoperoxidation and antioxidant capacity in patients with poorly controlled type 2 diabetes. *Toxicol Ind Health.* 2009; 25(4-5):337-341.
498. Altomare E, Vendemiale G, Chicco D, Procacci V, Cirelli F. Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabete Metab.* 1992; 18(4):264-271.
499. Qing Z, Xin-nan S, Yong-ting L, Yan W, Jia-yi M. Relationship between serum lutein and oxidative stress in patients with type 2 diabetes *mellitus*. *Fundan Univ J Med Sci.* 2010; 37(3):343-346.
500. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol.* 2005; 4(1):1-5.
501. Karasu Ç. Glycooxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: effects of antioxidant treatment. *Open Cardiovasc Med J.* 2010; 4:240-256.
502. Ansley DM, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *J Pathol.* 2013; 229(2):232-241.
503. Vassort G, Turan B. Protective role of antioxidants in diabetes-induced cardiac dysfunction. *Cardiovasc Toxicol.* 2010; 10(2):73-86.
504. Psaltopoulou T, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysochoou C, Detopoulou P, Skoumas J, et al. Dietary antioxidant capacity is inversely associated with diabetes biomarkers: the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010; 21(8):561-567.
505. Johnston CS, Beezhold BL, Mostow B, Swan PD. Plasma vitamin C is inversely related to body mass index and waist circumference but not to plasma adiponectin in nonsmoking adults. *J Nutr.* 2007; 137(7):1757-1762.
506. Garcia OP, Ronquillo D, Caamaño Mdel C, Camacho M, Long KZ, Rosado JL. Zinc, vitamin A, and vitamin C status are associated with leptin concentrations and obesity in Mexican women: results from a cross-sectional study. *Nutr Metab (Lond).* 2012; 9(1):59-67.

507. Hallfrisch J, Singh VN, Muller DC, Baldwin H, Bannon ME, Andres R. High plasma vitamin C associated with high plasma HDL- and HDL2 cholesterol. *Am J Clin Nutr.* 1994; 60(1):100-105.
508. McRae MP. Vitamin C supplementation lowers serum low-density lipoprotein cholesterol and triglycerides: a meta-analysis of 13 randomized controlled trials. *J Chiropr Med.* 2008; 7(2):48-58.
509. Schünemann HJ, Grant BJ, Freudenheim JL, Muti P, Browne RW, Drake JA, et al. The relation of serum levels of antioxidant vitamins C and E, retinol and carotenoids with pulmonary function in the general population. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163(5):1246-1255.
510. Bovier ER, Lewis RD, Hammond BRJ. The relationship between lutein and zeaxanthin status and body fat. *Nutrients.* 2013; 5(3):750-757.
511. Waters D, Clark RM, Greene CM, Contois JH, Fernandez ML. Change in plasma lutein after egg consumption is positively associated with plasma cholesterol and lipoprotein size but negatively correlated with body size in postmenopausal women. *J Nutr.* 2007; 137(4):959-963.
512. Renzi LM, Hammond BR Jr, Dengler M, Roberts R. The relation between serum lipids and lutein and zeaxanthin in the serum and retina: results from cross-sectional, case-control and case study designs. *Lipids Health Dis.* 2012; 11:33-42.
513. Wang L, Gaziano JM, Norkus EP, Buring JE, Sesso HD. Associations of plasma carotenoids with risk factors and biomarkers related to cardiovascular disease in middle-aged and older women. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(3):747-754.
514. Hozawa A, Jacobs DR Jr, Steffes MW, Gross MD, Steffen LM, Lee DH. Circulating carotenoid concentrations and incident hypertension: the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *J Hypertens.* 2009; 27(2):237-242.
515. Zou Z, Xu X, Huang Y, Xiao X, Ma L, Sun T, et al. High serum level of lutein may be protective against early atherosclerosis: the Beijing atherosclerosis study. *Atherosclerosis.* 2011; 219(2):789-793.
516. Chug-Ahuja JK, Holden JM, Forman MR, Mangels AR, Beecher GR, Lanza E. The development and application of a carotenoid database for fruits, vegetables, and selected multicomponent foods. *J Am Diet Assoc.* 1993; 93(3):318-323.
517. Takayanagi K, Morimoto S, Shirakura Y, Mukai K, Sugiyama T, Tokuji Y, et al. Mechanism of visceral fat reduction in Tsumura Suzuki obese, diabetes (TSOD) mice orally administered  $\beta$ -cryptoxanthin from Satsuma mandarin oranges (*Citrus unshiu* Marc). *J Agric Food Chem.* 2011; 59(23):12342-1251.
518. Montonen J, Knekt P, Järvinen R, Reunanen A. Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004; 27(2):362-366.
519. Suzuki K, Ito Y, Ochiai J, Kusuhara Y, Hashimoto S, Tokudome S, et al. Relationship between obesity and serum markers of oxidative stress and inflammation in Japanese. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2003; 4(3):259-266.
520. Andersen LF, Jacobs DR Jr, Gross MD, Schreiner PJ, Dale Williams O, Lee DH. Longitudinal associations between body mass index and serum carotenoids: the CARDIA study. *Br J Nutr.* 2006; 95(2):358-365.
521. Iwamoto M, Imai K, Ohta H, Shirouchi B, Sato M. Supplementation of highly concentrated  $\beta$ -cryptoxanthin in a satsuma mandarin beverage improves adipocytokine profiles in obese Japanese women. *Lipids Health Dis.* 2012; 11:52-55.
522. Levy AP, Asleh R, Blum S, Levy NS, Miller-Lotan R, Kalet-Litman S, et al. Haptoglobin: basic and clinical aspects. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 12(2):293-304.

523. Moreno PR, Purushothaman KR, Purushothaman M, Muntner P, Levy NS, Fuster V, et al. Haptoglobin genotype is a major determinant of the amount of iron in the human atherosclerotic plaque. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52(13):1049-1051.
524. Costacou T, Levy AP. Haptoglobin genotype and its role in diabetic cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res*. 2012; 5(4):423-435.
525. Dayan L, Levy AP, Blum S, Miller-Lotan R, Melman U, Alshiek J, et al. Haptoglobin genotype and endothelial function in diabetes *mellitus*: a pilot study. *Eur J Appl Physiol*. 2009; 106(4):639-644.
526. Milman U, Blum S, Shapira C, Aronson D, Miller-Lotan R, Anbinder Y, et al. Vitamin E supplementation reduces cardiovascular events in a subgroup of middle-aged individuals with both type 2 diabetes *mellitus* and the haptoglobin 2-2 genotype: a prospective double-blinded clinical trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(2):341-347.
527. Blum S, Vardi M, Levy NS, Miller-Lotan R, Levy AP. The effect of vitamin E supplementation on cardiovascular risk in diabetic individuals with different haptoglobin phenotypes. *Atherosclerosis*. 2010; 211(1):25–27.
528. Asleh R, Levy AP. In vivo and in vitro studies establishing haptoglobin as a major susceptibility gene for diabetic vascular disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2005; 1(1):19-28.
529. Shi X, Sun L, Wang L, Jin F, Sun J, Zhu X, et al. Haptoglobin 2-2 genotype is associated with increased risk of type 2 diabetes *mellitus* in northern Chinese. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012; 16(6):563-568.
530. Lioupis C, Barbatis C, Drougou A, Koliaraki V, Mamalaki A, Klonaris C, et al. Association of haptoglobin genotype and common cardiovascular risk factors with the amount of iron in atherosclerotic carotid plaques. *Atherosclerosis*. 2011; 216(1):131-138.
531. Arsene D, Găină G, Bălescu C, Ardeleanu C. C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms as factors involved in ischemic stroke. *Rom J Morphol Embryol*. 2011; 52(4):1203-1207.
532. Schwahn B, Rozen R. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am J Pharmacogenomics*. 2001;1(3):189-201.
533. Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Skoumas J, Choumerianou D, et al. An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. *Int J Cardiol*. 2005; 100(3):409-414.
534. Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G. Meta-analysis of MTHFR 677C→T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate?. *BMJ*. 2005; 331(7524):1053-1058.
535. Rummel T, Suormala T, Häberle J, Koch HG, Berning C, Perrett D, et al. Intermediate hyperhomocysteinaemia and compound heterozygosity for the common variant c.677C>T and aMTHFR gene mutation. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30(3):401.
536. Ayala C, García R, Cruz E, Prieto K, Bermúdez M. Niveles de homocisteína y polimorfismos de los genes de la MTHFR y la CBS en pacientes colombianos con trombosis venosa superficial y profunda. *Biomedica*. 2010; 30(2):259-267.
537. Dragani A, Falco A, Santilli F, Basili S, Rolandi G, Cerasa L, et al. Oxidative stress and platelet activation in subjects with moderate hyperhomocysteinaemia due to MTHFR 677 C→T polymorphism. *Thromb Haemost*. 2012; 108(3):533-42.
538. Abudureheman K, Mahemuti A, Xia YN, Hu XM. Association between gene polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine in Uygur patients with venous thromboembolism. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2012; 40(12):1030-1036.

539. Clarke R, Bennett DA, Parish S, Verhoef P, Dötsch-Klerk M, Lathrop M, et al. Homocysteine and coronary heart disease: Metaanalysis of MTHFR case-control studies, avoiding publication bias. *PLoS Med.* 2012; 9(2):e1001177.
540. Errera FI, Silva ME, Yeh E, Maranduba CM, Folco B, Takahashi W, et al. Effect of polymorphisms of the MTHFR and APOE genes on susceptibility to diabetes and severity of diabetic retinopathy in Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39(7):883-888.
541. Movva S, Alluri RV, Venkatasubramanian S, Vedicherla B, Vattam KK, Ahuja YR, et al. Association of methylene tetrahydrofolate reductase C677T genotype with type 2 diabetes *mellitus* patients with and without renal complications. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2011; 15(4):257-261.
542. Yang S, Zhang J, Feng C, Huang G. MTHFR 677T variant contributes to diabetic nephropathy risk in Caucasian individuals with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Metabolism.* 2013; 62(4):586-94.
543. Chang WW, Zhang L, Yao YS, Su H, Jin YL, Chen Y. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and susceptibility to diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients: a meta-analysis. *Ren Fail.* 2013; 35(7):1038-1043.
544. Hermans MP, Gala JL, Buysschaert M. The MTHFR CT polymorphism confers a high risk for stroke in both homozygous and heterozygous T allele carriers with type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2006; 23(5):529-536.
545. Luo D, Yan S, Cheng X, Song Y. Levels of homocysteine and polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in patients with type 2 diabetes *mellitus* and coronary heart disease. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2009; 38(1):39-42.
546. Sun JZ, Xu Y, Lu H, Zhu Y. Polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene association with homocysteine and ischemic stroke in type 2 diabetes. *Neurol India.* 2009; 57(5):589-593.
547. Kimura H, Gejyo F, Suzuki S, Takeda T, Miyazaki R, Yoshida H. A C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene modifies serum cysteine in dialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2000; 36(5):925-933.
548. Sun J, Xu Y, Zhu Y, Lu H, Deng H, Fan Y, et al. The relationship between MTHFR gene polymorphisms, plasma homocysteine levels and diabetic retinopathy in type 2 diabetes *mellitus*. *Chin Med J (Engl).* 2003; 116(1):145-147.
549. Russo GT, Di Benedetto A, Magazzù D, Giandalia A, Giorda CB, Ientile R, et al. Mild hyperhomocysteinemia, C677T polymorphism on methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of macroangiopathy in type 2 diabetes: a prospective study. *Acta Diabetol.* 2011; 48(2):95-101.
550. Ukinc K, Ersoz HO, Karahan C, Erem C, Eminagaoglu S, Hacıhasanoglu AB, et al. Methyltetrahydrofolate reductase C677T gene mutation and hyperhomocysteinemia as a novel risk factor for diabetic nephropathy. *Endocrine.* 2009; 36(2):255-261.



# **ANEXO I**

Folheto informativo - diabéticos





As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em Portugal. Uma alimentação equilibrada é importante na sua prevenção.

## CONHEÇA O SEU ESTADO NUTRICIONAL E QUAIS OS NÍVEIS DE VITAMINAS E ALGUNS FACTORES DE RISCO CARDIOVASCULAR



Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P.

Departamento de Alimentação e Nutrição  
Avenida Padre Cruz, 1649-016 Lisboa  
Tel.: 217519267 / 964528378  
Email: ana.valente@insa.min-saude.pt

Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal  
Rua do Salitre, 118-120, 1250-203 Lisboa

## QUAL DESTES CORAÇÕES É O SEU?

**NÃO SABE?**

*Nós também não, mas podemos fazer uma avaliação nutricional completa e informá-lo de como a sua alimentação pode influenciar o risco de Doença Cardiovascular*

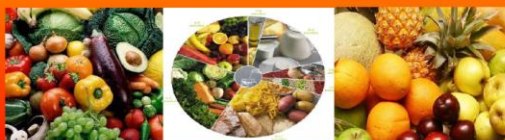


Estudo de avaliação da alimentação na doença cardiovascular em diabéticos tipo 2

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte em Portugal.

Os diabéticos do tipo 2 têm um risco de morte por DCV de 2 a 3 vezes maior ao de um não diabético.

Estudos recentes indicam que valores elevados de homocisteína, uma substância presente no sangue, podem aumentar o risco de DCV, especialmente nos diabéticos. A quantidade de homocisteína no sangue é influenciada pela alimentação. Um baixo consumo de certas vitaminas aumenta a homocisteína enquanto que uma alimentação rica em frutos e outros vegetais diminui a sua concentração e o risco de DCV.



O Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. (INSA) em colaboração com a Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal (APDP), vai realizar um estudo sobre a influência da alimentação na concentração de determinados compostos (homocisteína, malondialdeído, vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, C, A, E, folatos e carotenóides) e a sua relação com a doença cardiovascular em diabéticos do tipo 2.

No estudo será feita uma avaliação nutricional, **GRATUITA** que incluirá as seguintes medições: peso, altura, cintura, anca, massa gorda, massa magra, água corporal e pressão arterial. O participante deverá também preencher um questionário geral e um questionário e diário alimentares. Para além disso, serão feitas análises ao sangue para medir a homocisteína e outras substâncias relacionadas com a alimentação.

Todos estes resultados serão relacionados com outras informações fornecidas pelo seu médico da APDP. Todos os participantes serão informados por escrito dos resultados do estudo.



**COLABORE!**

A participação neste estudo vai ajudá-lo a si e a outras pessoas com diabetes tipo 2



# **ANEXO II**

Folheto informativo - controlos





As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em Portugal. Uma alimentação equilibrada é importante para sua prevenção.

## CONHEÇA O SEU ESTADO NUTRICIONAL E QUAIS OS NÍVEIS DE VITAMINAS E ALGUNS FACTORES DE RISCO CARDIOVASCULAR



Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. (INSA)

Unidade de Investigação & Desenvolvimento  
Departamento de Alimentação e Nutrição  
Avenida Padre Cruz, 1649-016 Lisboa  
Tel.: 217519267 / 964528378  
Email: ana.valente@insa.min-saude.pt

Universidade Internacional para a Terceira Idade (UITI)

Rua das Flores, 85-1.º, 1200-194 Lisboa, Portugal

## QUAL DESTES CORAÇÕES É O SEU?

**NÃO SABE?**

*Nós também não, mas podemos fazer uma avaliação nutricional completa e informá-lo de como a sua alimentação pode influenciar o risco de Doença Cardiovascular*

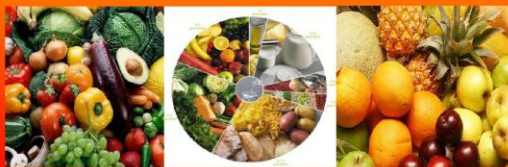


Estudo tem como objectivo avaliar a influência da alimentação na doença cardiovascular em adultos saudáveis

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte em Portugal.

A elevada prevalência nacional dos factores de risco das doenças cardiovasculares obriga a que se tenha uma especial atenção à sua efectiva prevenção, detecção e correcção.

Estudos recentes indicam que valores elevados de homocisteína, uma substância presente no sangue, podem aumentar o risco de DCV. A quantidade de homocisteína no sangue é influenciada pela alimentação. Um baixo consumo de certas vitaminas aumenta a homocisteína enquanto que uma alimentação rica em frutos e outros vegetais diminui a sua concentração e o risco de DCV.



O Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA em colaboração com a UITI, vai realizar um estudo sobre a influência da alimentação na concentração de determinados compostos (homocisteína, malondialdeído, vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, C, A, E, folatos e carotenóides) e a sua relação com a doença cardiovascular em adultos saudáveis.

No estudo será feita uma avaliação nutricional, **GRÁTUITA** que incluirá as seguintes medições: peso, altura, cintura, anca, massa gorda, massa magra, água corporal e pressão arterial. O participante deverá também preencher um questionário geral e um questionário e diário alimentares. Para além disso, serão feitas análises ao sangue para medir vários compostos como a homocisteína e outras substâncias relacionadas com a alimentação.

Todos os participantes serão informados por escrito dos resultados do estudo.



Ao participar ficará informado sobre o seu estado nutricional e irá compreender melhor como a alimentação pode influenciar o risco de DCV

**COLABORE!**

A participação neste estudo é uma oportunidade única



# **ANEXO III**

Consentimento informado - diabéticos



## **HOMOCISTEÍNA, STRESS OXIDATIVO E DOENÇA CARDIOVASCULAR EM DIABÉTICOS DO TIPO 2: IMPACTO DA ALIMENTAÇÃO**

### **INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE E CONSENTIMENTO INFORMADO**

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em Portugal. Vários estudos clínicos indicam que valores elevados de homocisteína no sangue, podem aumentar o risco de doença cardiovascular. A alimentação pode influenciar a quantidade de homocisteína presente no sangue. A escolha de uma alimentação saudável pode levar à diminuição da homocisteína no sangue e a um menor risco de doença cardiovascular. No entanto, poucos têm sido os estudos dedicados à relação entre a homocisteína no sangue e as complicações cardiovasculares nos doentes diabéticos do tipo 2.

Neste sentido, o Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. (INSA) em colaboração com a Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal (APDP), vai realizar um estudo sobre a influência da alimentação na concentração de determinados compostos (homocisteína, malondialdeído, vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, C, A, E, folatos e carotenóides) e a sua relação com o aparecimento e/ou desenvolvimento de doenças cardiovasculares em doentes diabéticos do tipo 2.

Pretendemos que aceite participar na seguinte avaliação nutricional:

1. Recolha de dados sobre: peso, altura, cintura, anca, massa gorda (por dois métodos: pregas cutâneas e Bioimpedância), massa magra e água corporal.
2. Preenchimento de um questionário geral, um questionário de frequência alimentar e de um diário alimentar.

A avaliação nutricional será realizada por um nutricionista treinado que também irá medir a sua tensão arterial. Solicitamos ainda que autorize a colheita de 10 ml de sangue para que possamos realizar as análises laboratoriais das seguintes substâncias: homocisteína, malondialdeído, vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, C, A, E, folatos e carotenóides. O sangue colhido será também utilizado para conhecer as concentrações de algumas enzimas envolvidas no metabolismo das substâncias referidas anteriormente.

A sua ficha clínica, medicação e as últimas análises de rotina realizadas na APDP são necessárias para o estudo, pelo que pedimos que nos autorize o acesso às mesmas. No total iremos ocupar cerca de 1 hora do seu tempo, sem qualquer risco ou despesas adicionais.

A confidencialidade dos dados recolhidos será assegurada de acordo com a legislação em vigor.

## INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE E CONSENTIMENTO INFORMADO

### Página de Assinaturas

Para participar neste estudo, e para autorizar a utilização e revelação da sua informação clínica e pessoal, esta página terá de ser assinada e datada por si ou por um seu representante legal.

Ao assinar esta página, está a confirmar o seguinte:

- Leu todas as informações deste documento de Informação e Consentimento;
- Teve tempo para pensar;
- Todas as suas perguntas foram respondidas satisfatoriamente;
- Concorda em participar voluntariamente neste estudo de investigação;
- Concorda em seguir os procedimentos do estudo e proporcionar as informações necessárias ao responsável do estudo e aos seus colaboradores;
- Sabe que pode decidir livremente terminar a sua participação no estudo em qualquer altura;
- Concorda que o responsável do estudo e os seus colaboradores utilizem a sua informação clínica pessoal, de acordo com o descrito neste documento;
- Recebeu uma cópia deste documento de Informação e Consentimento.

Número de participante:

Número de doente na APDP:

#### Participante:

\_\_\_\_\_  
Nome

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Data

#### Investigador Responsável:

\_\_\_\_\_  
Nome

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Data

# **ANEXO IV**

Consentimento informado - controlos



## HÁBITOS ALIMENTARES, HIPERHOMOCISTEINÉMIA E DOENÇA CARDIOVASCULAR

### INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE E CONSENTIMENTO INFORMADO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em Portugal. Vários estudos clínicos indicam que valores elevados de homocisteína no sangue, podem aumentar o risco de doença cardiovascular. A alimentação pode influenciar a quantidade de homocisteína presente no sangue. A escolha de uma alimentação saudável pode levar à diminuição da homocisteína no sangue e a um menor risco de doença cardiovascular. No entanto, poucos têm sido os estudos dedicados à relação entre a homocisteína no sangue e as complicações cardiovasculares.

Neste sentido, o Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. (INSA) em colaboração com a Universidade Internacional para a Terceira Idade (UITI), irá realizar um estudo sobre a influência da alimentação na concentração de determinados compostos (homocisteína, malondialdeído, vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, C, A, E, folatos e carotenóides) e a sua relação com o aparecimento de doenças cardiovasculares em adultos saudáveis.

Pretendemos que aceite participar na seguinte avaliação nutricional:

1. Recolha de dados sobre: peso, altura, cintura, anca, massa gorda (por dois métodos: pregas cutâneas e Bioimpedância), massa magra e água corporal.
2. Preenchimento de um questionário geral, um questionário de frequência alimentar e de um diário alimentar.

A avaliação nutricional será realizada por um nutricionista treinado que também irá medir a sua tensão arterial. Solicitamos ainda que autorize a colheita de 10 ml de sangue para que possamos realizar as análises laboratoriais das seguintes substâncias: homocisteína, malondialdeído, vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, C, A, E, folatos e carotenóides.

Os seus dados clínicos e as últimas análises de rotina realizadas no âmbito da medicina do trabalho são necessárias para o estudo, pelo que pedimos que nos autorize o acesso às mesmas. No total iremos ocupar cerca de 1 hora do seu tempo, sem qualquer risco ou despesas adicionais.

A confidencialidade dos dados recolhidos será assegurada de acordo com a legislação em vigor.

Condições de participação: Podem participar no estudo pessoas com idades compreendidas entre 40 e 75 anos e que não tenham tido nenhuma das seguintes patologias: Diabetes e Doença Cardiovascular (Enfarte Agudo do Miocárdio, Acidente Vascular Cerebral - AVC ou doença arterial periférica).

## INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE E CONSENTIMENTO INFORMADO

### Página de Assinaturas

Para participar neste estudo, e para autorizar a utilização e revelação da sua informação clínica e pessoal, esta página terá de ser assinada e datada por si ou por um seu representante legal.

Ao assinar esta página, está a confirmar o seguinte:

- Leu todas as informações deste documento de Informação e Consentimento;
- Teve tempo para pensar;
- Todas as suas perguntas foram respondidas satisfatoriamente;
- Concorda em participar voluntariamente neste estudo de investigação;
- Concorda em seguir os procedimentos do estudo e proporcionar as informações necessárias ao responsável do estudo e aos seus colaboradores;
- Sabe que pode decidir livremente terminar a sua participação no estudo em qualquer altura;
- Concorda que o responsável do estudo e os seus colaboradores utilizem a sua informação clínica pessoal, de acordo com o descrito neste documento;
- Recebeu uma cópia deste documento de Informação e Consentimento.

Número de participante:

<b>Participante:</b>	
_____	
Nome	
_____	_____
Assinatura	Data

<b>Investigador Responsável:</b>	
_____	
Nome	
_____	_____
Assinatura	Data

# **ANEXO V**

Questionário geral aplicado aos diabéticos



## QUESTIONÁRIO GERAL

### INSTRUÇÕES PARA O ENTREVISTADOR

O cabeçalho deverá ser preenchido pelo entrevistador antes do início da entrevista.

As questões deverão ser colocadas de modo a não influenciar as respostas do entrevistado.

As perguntas de resposta aberta deverão ser respondidas o mais resumidamente possível.

Sempre que apareça "ex: (P. 1.4)" numa das hipóteses de resposta, deverá passar para a pergunta com o número indicado.

Na pergunta n.º 5.4 deverá utilizar o livro de modelos fotográficos para que o entrevistado identifique a capacidade (volume) dos copos de bebida habitualmente ingerida.

Antes de classificar o nível de actividade física, deverá identificar as actividades físicas descritas pelo entrevistado, em pesadas ou moderadas, de acordo com as tabelas existentes na bibliografia de referência e tendo em conta as respostas obtidas nas perguntas 11.1, 11.2 e 11.3.

NOME: \_\_\_\_\_

MORADA: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

CONTACTO:

GÉNERO: F  M

N.º ID:

IDADE:

1. HABILITAÇÕES LITERÁRIAS	RESPOSTA
1.1 Que estudos que tem?	<input type="text"/>
Não sabe ler nem escrever                      ⇄                      1	
Só sabe ler e escrever                            ⇄                      2	
Ensino primário (1º ao 4º ano)                  ⇄                      3	
Ensino básico (5º ao 9º ano)                    ⇄                      4	
Ensino secundário (10º ao 12º ano)          ⇄                      5	
Ensino Superior                                    ⇄                      6	
Não sabe    ⇄                      7	

2. ESTADO CIVIL	RESPOSTA
2.1 Qual o seu estado civil ?	<input type="text"/>
Solteiro    ⇄                      1	
Casado    ⇄                      2	
Viúvo     ⇄                      3	
Separado ou divorciado                        ⇄                      4	
Não sabe    ⇄                      7	

3. ESTADO DE SAÚDE	RESPOSTA
3.1 Sofre de alguma doença que não a diabetes?	<input type="text"/>
Sim    ⇄                      1	
Não                      (P. 4.1)                      ⇄                      2	
Não sabe                      (P. 4.1)                      ⇄                      7	
3.2 Qual o nome? _____	

ENTREVISTADOR: \_\_\_\_\_

DATA: \_\_\_\_\_

4. HÁBITOS TABÁGICOS				RESPOSTA
4.1	Fuma?			<input type="text"/>
	Diariamente	⇒	1	
	Ocasionalmente	⇒	2	
	Não fuma (P. 4.4)	⇒	3	
	Não sabe	⇒	7	
4.2	Desde que idade fuma? (idade aproximada)			<input type="text"/>
	Não sabe	⇒	7	
4.3	Que quantidade fuma diariamente?			<input type="text"/>
	Não sabe	⇒	7	
4.4	Já alguma vez fumou?			<input type="text"/>
	Diariamente	⇒	1	
	Ocasionalmente	⇒	2	
	Nunca fumou (P. 5.1)	⇒	3	
	Não sabe	⇒	7	
4.5	Quantos cigarros fumava por dia?			<input type="text"/>
	Não sabe	⇒	7	
4.6	Com que idade deixou de fumar? (idade aproximada)			<input type="text"/>
	Não sabe	⇒	7	

5. CONSUMO DE ALCOOL				RESPOSTA
5.1	Toma bebidas alcoólicas?			<input type="text"/>
	Sim	⇒	1	
	Não (P. 6.1)	⇒	2	
	Não sabe (P. 6.1)	⇒	7	

ENTREVISTADOR (sigla): \_\_\_\_\_

N.º ID: \_\_\_\_\_

5. CONSUMO DE ÁLCOOL	RESPOSTA
<p>5.2 No último mês tomou alguma das seguintes bebidas?</p> <p>a) Vinho b) Cerveja c) Bagaço/Aguardente/Brandy/Gin/Licores, etc.</p> <p>Sim                    ⇨                    1 Não                    ⇨                    2 Não sabe            ⇨                    7</p>	<p>a) <input type="text"/></p> <p>b) <input type="text"/></p> <p>c) <input type="text"/></p>
<p>5.3 Com que frequência toma essa(s) bebida(s)?</p> <p>Diariamente                    ⇨                    1 Mais de duas vezes por semana    ⇨                    2 Uma a duas vezes por semana    ⇨                    3 Uma vez por mês                    ⇨                    4 Raramente                    ⇨                    5 Não sabe                    ⇨                    7</p>	<p>a) <input type="text"/></p> <p>b) <input type="text"/></p> <p>c) <input type="text"/></p>
<p>5.4 Quando bebe, quantos copos toma, em média, dessa(s) bebida(s)? (mostrar livro de modelos fotográficos)</p> <p>Vinho                    n.º de copos                    <input type="text"/>                                   capacidade do copo                    <input type="text"/></p> <p>Cerveja                    n.º de copos                    <input type="text"/>                                   capacidade do copo                    <input type="text"/></p> <p>Bagaço/Aguardente/Brandy/Gin/Licores, etc.    n.º de copos                    <input type="text"/>                                   capacidade do copo                    <input type="text"/></p> <p>Não sabe                    ⇨                    7                    <input type="text"/></p>	<p><input type="text"/></p> <p><input type="text"/></p> <p><input type="text"/></p> <p><input type="text"/></p> <p><input type="text"/></p> <p><input type="text"/></p>

6. SUPLEMENTAÇÃO	RESPOSTA
<p>6.1 Toma produto(s) que compra na ervanária, parafarmácia ou hipermercado (medicamentos, ervas, suplementos alimentares, vitaminas, etc)?</p> <p>Sim                    (P. 6.4)                    ⇨                    1 Não                    ⇨                    2 Não sabe                    ⇨                    7</p>	<p><input type="text"/></p>

ENTREVISTADOR (sigla): \_\_\_\_\_ N.º ID: \_\_\_\_\_





9. ANTECEDENTES PESSOAIS DE DOENÇA CARDIOVASCULAR				RESPOSTA
9.1	Sofre ou sofreu de algum tipo de doença do coração (ex. angina de peito, enfarte, acidente vascular cerebral, doença vascular periférica, etc.)?			<input type="text"/>
	Sim	⇒	1	
	Não (P. 10.1)	⇒	2	
	Não sabe	⇒	7	
9.2	Qual?			
<input type="text"/>				

10. ANTECEDENTES FAMILIARES DE DOENÇA CARDIOVASCULAR				RESPOSTA
10.1	Tem algum familiar que sofre de doença do coração?			<input type="text"/>
	Sim	⇒	1	
	Não (P. 11.1)	⇒	2	
	Não sabe	⇒	7	
10.2	Qual o seu grau de parentesco com esse familiar?			<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
	Pai/Mãe	⇒	1	
	Filho(a)	⇒	2	
	Irmão(a)	⇒	3	
	Neto(a)	⇒	4	
	Tio/Primo/Sobrinho	⇒	5	
	Não sabe	⇒	7	

11. ACTIVIDADE FÍSICA				RESPOSTA
11.1	Pratica alguma(s) actividade(s) física(s) regularmente?			<input type="text"/>
	Sim	⇒	1	
	Não FIM	⇒	2	
	Não sabe FIM	⇒	7	
11.2	Qual / Quais?			
<input type="text"/>				
<input type="text"/>				

ENTREVISTADOR (sigla): _____	N.º ID: _____
------------------------------	---------------

## 11. ACTIVIDADE FÍSICA

11.3 Com que frequência pratica essa(s) actividade(s)?

≥ 5 dias/semana e ≥ 30 min/sessão ⇒ 1

≥ 3 dias/semana e ≥ 20 min/sessão ⇒ 2

≥ 5 dias/semana e ≥ 150 min/semana ⇒ 3

≥ 5 dias/semana ou ≥ 150 min/semana ⇒ 4

Outra frequência ⇒ 5

Qual?


Não sabe ⇒ 7

### CLASSIFICAÇÃO DA ACTIVIDADE FÍSICA DO PARTICIPANTE

A preencher pelo entrevistador

**MUITO ACTIVO** ⇒ 1

SE {  
 Actividades pesadas: ≥ 5 dias/semana e ≥ 30 min/sessão  
 OU  
 Actividades pesadas: ≥ 3 dias/semana e ≥ 20 min/sessão  
 +  
 Actividade moderada e/ou caminhada: ≥ 5 dias/semana e ≥ 30 min/sessão

**ACTIVO** ⇒ 2

SE {  
 Actividades pesadas: ≥ 3 dias/semana e ≥ 20 min/sessão  
 OU  
 Actividades moderadas/caminhadas: ≥ 5 dias/semana e ≥ 30 min/sessão  
 OU  
 Qualquer tipo de actividades que somadas: ≥ 5 dias/semana e ≥ 150 min/semana

**POUCO ACTIVO** ⇒ 3

SE {  
 Atinge pelo menos um dos critérios descritos:  
 Frequência de 5 dias/semana ou duração: 150 min/semana  
 Não atinge nenhum dos critérios descritos

# **ANEXO VI**

Questionário geral aplicado aos controlos



### INSTRUÇÕES PARA O ENTREVISTADOR

O cabeçalho deverá ser preenchido pelo entrevistador antes do início da entrevista.

As questões deverão ser colocadas de modo a não influenciar as respostas do entrevistado.

As perguntas de resposta aberta deverão ser respondidas o mais resumidamente possível.

Sempre que apareça "ex: (P. 1.4)" numa das hipóteses de resposta, deverá passar para a pergunta com o número indicado.

Na pergunta n.º 5.4 deverá utilizar o livro de modelos fotográficos para que o entrevistado identifique a capacidade (volume) dos copos de bebida habitualmente ingerida.

Antes de classificar o nível de actividade física, deverá identificar as actividades físicas descritas pelo entrevistado, em pesadas ou moderadas, de acordo com as tabelas existentes na bibliografia de referência e tendo em conta as respostas obtidas nas perguntas 11.1, 11.2 e 11.3.

NOME: \_\_\_\_\_

MORADA: \_\_\_\_\_

CONTACTO:

GÉNERO: F  M

N.º ID:

IDADE:

1. HABILITAÇÕES LITERARIAS		RESPOSTA
1.1 Que estudos que tem?		<input type="text"/>
Não sabe ler nem escrever	⇨ 1	
Só sabe ler e escrever	⇨ 2	
Ensino primário (1º ao 4º ano)	⇨ 3	
Ensino básico (5º ao 9º ano)	⇨ 4	
Ensino secundário (10º ao 12º ano)	⇨ 5	
Ensino Superior	⇨ 6	
Não sabe	⇨ 7	

2. ESTADO CIVIL		RESPOSTA
2.1 Qual o seu estado civil ?		<input type="text"/>
Solteiro	⇨ 1	
Casado	⇨ 2	
Viúvo	⇨ 3	
Separado ou divorciado	⇨ 4	
Não sabe	⇨ 7	

3. ESTADO DE SAÚDE		RESPOSTA
3.1 Sofre de alguma doença crónica?		<input type="text"/>
Sim	⇨ 1	
Não (P. 4.1)	⇨ 2	
Não sabe (P. 4.1)	⇨ 7	
3.2 Qual o nome? _____		

ENTREVISTADOR: \_\_\_\_\_

DATA: \_\_\_\_\_

4. HABITOS TABÁGICOS				RESPOSTA
4.1	Fuma?			<input type="text"/>
	Diariamente	⇒	1	
	Ocasionalmente	⇒	2	
	Não fuma (P. 4.4)	⇒	3	
	Não sabe	⇒	7	
4.2	Desde que idade fuma? (idade aproximada)			<input type="text"/>
	Não sabe	⇒	7	
4.3	Que quantidade fuma diariamente?			<input type="text"/>
	Não sabe	⇒	7	
4.4	Já alguma vez fumou?			<input type="text"/>
	Diariamente	⇒	1	
	Ocasionalmente	⇒	2	
	Nunca fumou (P. 5.1)	⇒	3	
	Não sabe	⇒	7	
4.5	Quantos cigarros fumava por dia?			<input type="text"/>
	Não sabe	⇒	7	
4.6	Com que idade deixou de fumar? (idade aproximada)			<input type="text"/>
	Não sabe	⇒	7	

5. CONSUMO DE ALCOOL				RESPOSTA
5.1	Toma bebidas alcoólicas?			<input type="text"/>
	Sim	⇒	1	
	Não (P. 6.1)	⇒	2	
	Não sabe (P. 6.1)	⇒	7	

ENTREVISTADOR (sigla): \_\_\_\_\_

N.º ID: \_\_\_\_\_

5. CONSUMO DE ALCÓOL	RESPOSTA
<p>5.2 No último mês tomou alguma das seguintes bebidas?</p> <p>a) Vinho b) Cerveja c) Bagaço/Aguardente/Brandy/Gin/Licores, etc.</p> <p style="text-align: right;">Sim      ⇨      1 Não      ⇨      2 Não sabe      ⇨      7</p>	<p>a) <input type="text"/></p> <p>b) <input type="text"/></p> <p>c) <input type="text"/></p>
<p>5.3 Com que frequência toma essa(s) bebida(s)?</p> <p>Diariamente      ⇨      1 Mais de duas vezes por semana      ⇨      2 Uma a duas vezes por semana      ⇨      3 Uma vez por mês      ⇨      4 Raramente      ⇨      5 Não sabe      ⇨      7</p>	<p>a) <input type="text"/></p> <p>b) <input type="text"/></p> <p>c) <input type="text"/></p>
<p>5.4 Quando bebe, quantos copos toma, em média, dessa(s) bebida(s)? (mostrar livro de modelos fotográficos)</p> <p>Vinho      n.º de copos      <input type="text"/> capacidade do copo      <input type="text"/></p> <p>Cerveja      n.º de copos      <input type="text"/> capacidade do copo      <input type="text"/></p> <p>Bagaço/Aguardente/Brandy/Gin/Licores, etc.      n.º de copos      <input type="text"/> capacidade do copo      <input type="text"/></p> <p>Não sabe      ⇨      7</p>	<p><input type="text"/></p> <p><input type="text"/></p> <p><input type="text"/></p> <p><input type="text"/></p> <p><input type="text"/></p> <p><input type="text"/></p>

6. SUPLEMENTAÇÃO	RESPOSTA
<p>6.1 Toma produto(s) que compra na ervanária, parafarmácia ou hipermercado (medicamentos, ervas, suplementos alimentares, vitaminas, etc)?</p> <p>Sim      (P. 6.4)      ⇨      1 Não      ⇨      2 Não sabe      ⇨      7</p>	<p><input type="text"/></p>

ENTREVISTADOR (sigla): \_\_\_\_\_ N.º ID: \_\_\_\_\_



7. MEDICAÇÃO		RESPOSTA
7.1 Toma ou tomou recentemente, medicamentos para o tratamento de alguma doença crónica?		<input type="text"/>
Sim	⇄ 1	
Não (P. 8.1)	⇄ 2	
Não sabe	⇄ 7	
7.2 Qual/Quais o(s) nome(s)?		
7.3 Com que frequência toma ou tomava esses medicamentos?		<input type="text"/>
Diariamente	⇄ 1	
Uma vez por semana	⇄ 2	
Várias vezes por semana	⇄ 3	
Uma vez por mês	⇄ 4	
Raramente	⇄ 5	
Não sabe	⇄ 7	
7.4 Que quantidade toma ou tomava de cada vez?		
Obsevações:		

8. HÁBITOS ALIMENTARES		RESPOSTA
8.1 Pratica ou praticou recentemente algum tipo de dieta alimentar?		<input type="text"/>
Sim	⇄ 1	
Não (P. 9.1)	⇄ 2	
Não sabe	⇄ 7	
8.2 Qual?		

ENTREVISTADOR (sigla): \_\_\_\_\_ N.º ID: \_\_\_\_\_

9. ANTECEDENTES PESSOAIS DE DOENÇA CARDIOVASCULAR		RESPOSTA
9.1	Sofre ou sofreu de algum tipo de doença do coração (ex. angina de peito, enfarte, acidente vascular cerebral, doença vascular periférica, etc.)?	<input type="text"/>
	Sim ⇒ 1	
	Não (P. 10.1) ⇒ 2	
	Não sabe ⇒ 7	
9.2	Qual?	<input type="text"/>

10. ANTECEDENTES FAMILIARES DE DOENÇA CARDIOVASCULAR		RESPOSTA
10.1	Tem algum familiar que sofre de doença do coração?	<input type="text"/>
	Sim ⇒ 1	
	Não (P. 11.1) ⇒ 2	
	Não sabe ⇒ 7	
10.2	Qual o seu grau de parentesco com esse familiar?	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
	Pai/Mãe ⇒ 1	
	Filho(a) ⇒ 2	
	Irmão(a) ⇒ 3	
	Neto(a) ⇒ 4	
	Tio/Primo/Sobrinho ⇒ 5	
	Não sabe ⇒ 7	

11. ACTIVIDADE FÍSICA		RESPOSTA
11.1	Pratica alguma(s) actividade(s) física(s) regularmente?	<input type="text"/>
	Sim ⇒ 1	
	Não FIM ⇒ 2	
	Não sabe FIM ⇒ 7	
11.2	Qual / Quais?	<input type="text"/>

ENTREVISTADOR (sigla): \_\_\_\_\_ N.º ID: \_\_\_\_\_

## 11. ACTIVIDADE FÍSICA

11.3 Com que frequência pratica essa(s) actividade(s)?

- |                                     |   |   |
|-------------------------------------|---|---|
| ≥ 5 dias/semana e ≥ 30 min/sessão   | ⇒ | 1 |
| ≥ 3 dias/semana e ≥ 20 min/sessão   | ⇒ | 2 |
| ≥ 5 dias/semana e ≥ 150 min/semana  | ⇒ | 3 |
| ≥ 5 dias/semana ou ≥ 150 min/semana | ⇒ | 4 |
| Outra frequência                    | ⇒ | 5 |

Qual?


Não sabe ⇒ 7

### CLASSIFICAÇÃO DA ACTIVIDADE FÍSICA DO PARTICIPANTE

A preencher pelo entrevistador

**MUITO ACTIVO** ⇒ **1**

SE {  
 Actividades pesadas: ≥ 5 dias/semana e ≥ 30 min/sessão  
 OU  
 Actividades pesadas: ≥ 3 dias/semana e ≥ 20 min/sessão  
 +  
 Actividade moderada e/ou caminhada: ≥ 5 dias/semana e ≥ 30 min/sessão

**ACTIVO** ⇒ **2**

SE {  
 Actividades pesadas: ≥ 3 dias/semana e ≥ 20 min/sessão  
 OU  
 Actividades moderadas/caminhadas: ≥ 5 dias/semana e ≥ 30 min/sessão  
 OU  
 Qualquer tipo de actividades que somadas: ≥ 5 dias/semana e ≥ 150 min/semana

**POUCO ACTIVO** ⇒ **3**

SE {  
 Atinge pelo menos um dos critérios descritos:  
 Frequência de 5 dias/semana ou duração: 150 min/semana  
 Não atinge nenhum dos critérios descritos

# **ANEXO VII**

Registro de dados antropométricos e fisiológicos



NOME:

MORADA:

CONTACTO:  N.º ID:  GÉNERO:

IDADE:  DATA:

ANA VALENTE - Departamento de Alimentação e Nutrição, Unidade de Investigação & Desenvolvimento

1. Peso (Kg):

2. Altura (m):

3. IMC (Kg/m<sup>2</sup>):

4. Perímetro abdominal (cm):

	1º medição	2º medição
	<input type="text"/>	<input type="text"/>
		Média
		<input type="text" value="#DIV/0!"/>

Valores de referência: H ≤ 101 cm e M ≤ 89 cm

5. Tensão arterial:

	1º medição	2º medição
Máxima (mmHg):	<input type="text"/>	<input type="text"/>
		Média
		<input type="text" value="#DIV/0!"/>

	1º medição	2º medição
Mínima (mmHg):	<input type="text"/>	<input type="text"/>
		Média
		<input type="text" value="#DIV/0!"/>

Valores de referência: Máx. = 120 mmHg e Min. = 80 mmHg

6. Bioimpedância tetrapolar:

B. Fat (%)	<input type="text"/>	RMR Kal	<input type="text"/>	Water (Lt)	<input type="text"/>
B. Fat (kg)	<input type="text"/>	TDE Kcal	<input type="text"/>	Water (%)	<input type="text"/>
T. Fat (%)	<input type="text"/>	T. WGT (kg)	<input type="text"/>	T WTR%	<input type="text"/>
BMI	<input type="text"/>	Lean (kg)	<input type="text"/>		
Impedance	<input type="text"/>	Lean (%)	<input type="text"/>		

N.º ID:

7. Pregas cutâneas

a) Prega abdominal (mm):

1º medição	2º medição	Média
<input type="text"/>	<input type="text"/>	#DIV/0!

b) Prega tricipital (mm):

1º medição	2º medição	Média
<input type="text"/>	<input type="text"/>	#DIV/0!

c) Prega subescapular (mm):

1º medição	2º medição	Média
<input type="text"/>	<input type="text"/>	#DIV/0!

d) Prega suprailíaca (mm):

1º medição	2º medição	Média
<input type="text"/>	<input type="text"/>	#DIV/0!

Formúla de Faulkner (1968):

$$(\%) \text{ gordura corporal} = \sum(\text{tricipital} + \text{subescapular} + \text{suprailíaca} + \text{abdominal}) * 0,153 + 5,783$$

Formúla de Faulkner (1968):

$$(\%) \text{ gordura corporal} = \text{\#DIV/0!}$$

Classificação da (%) de gordura corporal:  
 (comparar com valores recomendados)

Excelente	<input type="text"/>
Bom	<input type="text"/>
Médio	<input type="text"/>
Pobre	<input type="text"/>

# **ANEXO VIII**

Trabalhos de investigação realizados no  
âmbito deste estudo



## 1. Artigos originais publicados em revistas indexadas (*com peer-review*)

Valente A, Sanches-Silva A, Albuquerque TG, Costa HS. Development of an orange juice in-house reference material and its application to guarantee the quality of vitamin C determination in fruits, juices and fruit pulps. Food Chem. In press 2013. Factor de Impacto: 3,33.

Valente A, Bronze MR, Bicho M, Duarte R, Costa HS. Validation and clinical application of an UHPLC method for simultaneous analysis of total homocysteine and cysteine in human plasma. J Sep Sci. 2012; 35(24):3427-3433. Factor de Impacto: 2,591; N<sup>o</sup> citações: 5.

Valente A, Albuquerque TG, Sanches-Silva A, Costa, HS. Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. Food Res Int. 2011; 44:2237-2242. Factor de Impacto: 3,15; N<sup>o</sup> citações: 24.

## 2. Artigos originais publicados em revistas não indexadas

Valente A, Bicho M, Duarte R, Raposo JF, Costa HS. Avaliação da ingestão de micronutrientes em diabéticos do tipo 2. Observações Boletim Epidemiológico. 2013; 3(2):17-18.

## 3. Resumos originais publicados em revistas indexadas (*com peer-review*)

Valente A, Bicho M, Albuquerque TG, Duarte R, Raposo JF, Costa HS. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids daily intake among diabetic and nondiabetic subjects: relation to cardiovascular disease. Proceedings of the Nutrition Society. 2013; 72(OCE1):E53. Factor de Impacto: 3,674.

Valente A, Bicho M, Albuquerque TG, Duarte R, Raposo JF, Costa HS. Vitamins with anti-inflammatory properties in diabetic and nondiabetic subjects. Proceedings of the Nutrition Society. 2013; 72(OCE1):E48. Factor de Impacto: 3,674.

Valente A, Bicho M, Duarte R, Raposo JF, Costa HS. Assessment of body water composition in Portuguese type 2 diabetic patients with and without angiopathy by bioelectrical impedance analysis. Public Health Nutrition. 2010; 13(9A):200. Factor de Impacto: 2,075.

Valente A, Bicho, M Duarte, R, Raposo JF, Costa HS. Vitamin B<sub>6</sub> status in Portuguese type 2 diabetic patients with and without retinopathy. Public Health Nutrition. 2010; 13(9A):232. Factor de Impacto: 2,075.

Moura L, Valente A, Marques-Vidal P, Costa HS. Validation of a microbiological assay for analysis of total serum vitamin B<sub>12</sub> using a colistin-sulphate-resistant organism. Annals of Nutrition and Metabolism. 2007; 51(suppl 1):282. Factor de Impacto: 1,83.

Valente A, Marques-Vidal P, Costa, H.S. An improved and validated high-performance liquid chromatography method for measuring malondialdehyde levels in human serum. Annals of Nutrition and Metabolism. 2007; 51(suppl 1):284. Factor de Impacto: 1,83.

Valente A, Marques-Vidal P, Costa HS. Optimization and validation of a rapid high-performance liquid chromatographic methods for measuring total plasma homocysteine and cysteine levels. Public Health Nutrition. 2006; 9(7A):218. Factor de Impacto: 2,12.

#### **4. Comunicações orais em encontros científicos Nacionais e Internacionais**

Valente A, Bicho M, Duarte R, Raposo JF, Costa HS. "Methionine and polyunsaturated fatty acids intake assessed by food frequency questionnaire in relation with plasma homocysteine and cysteine in type 2 diabetic patients", X Congresso de Nutrição e Alimentação & II Congresso Ibero-Americano de Nutrição, Lisboa, 13 de Maio de 2011.

Valente A, Bicho M, Duarte R, Raposo JF, Costa HS. "Níveis plasmáticos de vitamina B<sub>6</sub> e controlo metabólico em diabéticos do tipo 2 com e sem retinopatia", Encontros do DAN, 29 de Outubro de 2010.

Valente A, Bicho M, Duarte R, Raposo JF, Costa HS. "Vitamin B<sub>6</sub> status in Portuguese type 2 diabetic patients with and without retinopathy", II World Congress of Public Health Nutrition, Porto, 23-25 de Setembro de 2010.

#### **5. Comunicações em painel em encontros científicos Nacionais e Internacionais**

Valente A, Bicho M, Albuquerque TG, Duarte R, Raposo JF, Costa HS. "Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids daily intake among diabetic and nondiabetic subjects: relation to cardiovascular disease", 6<sup>th</sup> International Immunonutrition Workshop, Palma de Maiorca, 15-17 de Outubro, 2012.

Valente A, Bicho M, Albuquerque TG, Duarte R, Raposo JF, Costa HS. "Vitamins with anti-inflammatory properties in diabetic and nondiabetic subjects", 6<sup>th</sup> International Immunonutrition Workshop, Palma de Maiorca, 15-17 de Outubro, 2012.

Valente A, Bicho M, Duarte R, Raposo JF, Costa HS. Avaliação da ingestão de vitaminas e minerais em diabéticos do tipo 2, XI Congresso de Nutrição e Alimentação, Porto, 24-25 de Maio, 2012.

Valente A, Bicho M, Gonçalves C, Marinho C, Duarte R, Costa HS. "Haptoglobin polymorphism, lipoperoxidation and antioxidante vitamins in type 2 diabetic patients with and without angiopathy", 1<sup>ST</sup>European Conference on Heart, Vessels & Diabetes, Lisboa, 9-11 Dezembro, 2010.

Valente A, Bicho M, Duarte R, Raposo JF, Costa HS. "Assessment of body water composition in Portuguese type 2 diabetic patients with and without angiopathy by bioelectrical impedance analysis", II World Congress of Public Health Nutrition, Porto, 23-25 de Setembro, 2010.

Valente A, Albuquerque TG, Duarte R, Bicho M, Costa HS. "Avaliação antropométrica de uma população de diabéticos do tipo 2 em Portugal", IX Congresso de Nutrição e Alimentação, Lisboa, 20 e 21 de Maio, 2010.

Valente AS, Duarte R, Carvalho R, Raposo JF, Costa HS. "Prevalence of hyperhomocysteinaemia in a portuguese type 2 diabetic population: relationship with body

fat composition", The 3rd World Congress on Controversies to consensus in Diabetes, Obesity and Hypertention, Praga, 13 -16 de Maio, 2010.

Valente A, Costa HS. "Optimization and validation of a HPLC method to measure malondialdehyde in human serum: application to portuguese type 2 diabetic patients", 6º Encontro Nacional de Cromatografia, Funchal, 14-16 de Dezembro, 2009.

Valente AS, Duarte R, Carvalho R, Raposo, JF, Costa, HS. "Plasma ascorbic acid levels and angiopathic complication in Portuguese type 2 diabetic patients", 20<sup>th</sup> World Diabetes Congress, Montreal, 8-22 de Outubro, 2009.

Valente A, Costa HS. "Hábitos alimentares, hiperhomocisteinémia e doença cardiovascular em diabéticos do tipo 2", 1ª visita temática para profissionais de saúde, Lisboa, 21 de Maio, 2009.

Valente A, Costa HS. "Hyperhomocysteinaemia, body mass index and cardiovascular complications in Portuguese patients with type 2 diabetes: relation to diet", 5<sup>th</sup> World Congress on the Prevention of Diabetes and its Complications, Helsínquia, 1-4 de Junho, 2008.

Valente A, Costa HS. "A Validated UPLC method to measure ascorbic acid levels in Portuguese type 2 diabetic patients", 5<sup>th</sup> World Congress on the Prevention of Diabetes and its Complications, Helsínquia, 1-4 de Junho, 2008.

Valente A, Marques-Vidal P, Costa HS. "A validated HPLC method for measuring malondialdehyde levels in human serum", 10<sup>th</sup> European Nutrition Conference, Paris, 10-13 de Julho, 2007.

Valente A, Costa HS. "Validation of liquid chromatographic methods", Dia do Jovem Investigador, Lisboa, 18 de Maio, 2006.

Valente A, Marques-Vidal P, Costa HS. "Optimization and validation of a rapid high-performance liquid chromatographic methods for measuring total plasma homocysteine and cysteine levels", I World Congress of Public Health Nutrition, Barcelona, 28-30 de Setembro, 2006.