

# Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas

Vitamins and minerals with antioxidant properties and cardiometabolic risk: controversies and perspectives

Antonela Siqueira Catania<sup>1</sup>, Camila Risso de Barros<sup>1</sup>, Sandra Roberta G. Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (FSP/USP), São Paulo, SP, Brasil

## RESUMO

No processo celular de obtenção de energia, são gerados compostos chamados espécies reativas de oxigênio (ERO) que, em excesso, podem causar danos celulares. Estresse oxidativo resulta do desequilíbrio no estado de óxido-redução a favor da oxidação. Dos mecanismos de defesa antioxidante, participam enzimas endógenas e algumas vitaminas e minerais. A vitamina E encontra-se no plasma e na partícula de LDL, protegendo lipídeos da oxidação. Estudos observacionais relataram associação inversa entre ingestão de vitamina E e risco cardiometabólico (RCM). Entretanto, ensaios clínicos não comprovaram a eficácia de sua suplementação nos desfechos cardiometabólicos. A vitamina C participa do sistema de regeneração da vitamina E, mantendo o potencial antioxidante plasmático. Dados sobre os benefícios de sua suplementação na redução do risco cardiometabólico são inconclusivos. A atividade antioxidante dos carotenoides é responsável, em parte, por seu papel protetor contra doenças cardiovasculares e cânceres. A suplementação desse nutriente também não trouxe resultados consistentes no que se refere à redução do RCM. A participação do zinco e do selênio na defesa antioxidante vem sendo estudada mais recentemente, mas a sua suplementação em indivíduos com níveis séricos normais e ingestão adequada na dieta desses minerais não parece ser necessária. De um modo geral, há muita controvérsia sobre o papel desses micronutrientes no RCM. Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de substâncias antioxidantes provenientes da dieta ou dietas ricas em frutas e hortaliças diminui o RCM. Mais estudos são necessários antes de se recomendar o uso de antioxidantes isolados na forma de suplementos para tal finalidade. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009;53(5):550-9.

## Descritores

Vitaminas; minerais; antioxidantes; espécies reativas de oxigênio; perfil cardiometabólico; doenças crônicas não transmissíveis

## ABSTRACT

Oxygen reactive species (ROS) are generated during cellular processes. In excess, they may cause damages to the cell. Oxidative stress is an imbalance in the redox state that favors oxidation. Endogenous enzymes and some vitamins and minerals participate in the plasma antioxidant defense. Vitamin E is found in the plasma and in the LDL particle, avoiding lipid peroxidation. Observational studies reported an inverse association between vitamin E consumption and cardiometabolic (CM) risk. However, clinical trials were not able to prove the efficacy of its supplementation on CM endpoints. Vitamin C participates in the vitamin E regeneration system, keeping the plasma's antioxidant potential. Data about beneficial effects of its supplementation in CM risk reduction are inconclusive. The antioxidant activity of carotenoids is partially responsible for its protective role against cardiovascular diseases and cancer. Supplementation of this nutrient did not provide consistent findings in terms of CM risk reduction. Recently, zinc and selenium's participation in the antioxidant defense has been studied, yet its supplementation in individuals with normal levels and adequate ingestion of these nutrients does not seem necessary. In summary, the role of these micronutrients for CM risk is still very controversial. Epidemiological studies suggest that diets rich in antioxidants, or simply in fruit and vegetables intake, can reduce CM risk. Further studies are needed before recommending antioxidant supplements for this purpose. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009;53(5):550-9.

## Keywords

Vitamins; minerals; antioxidants; oxygen reactive species; cardiometabolic profile; chronic non-transmittable disease

Correspondência para:  
Sandra Roberta G. Ferreira  
Departamento de Nutrição,  
Faculdade de Saúde Pública da  
Universidade de São Paulo  
Av. Doutor Arnaldo, 715, 2<sup>a</sup> andar  
01246-904 – São Paulo, SP, Brasil  
sandrafv@usp.br

Recebido em 26/Mar/2009  
Aceito em 2/Jun/2009

## INTRODUÇÃO

No processo celular de obtenção de energia (cadeia respiratória) ocorre uma sequência de reações geradoras de eletronegatividade, sendo o oxigênio oceptor final de elétrons. Dessa sequência oxidativa resultam compostos como o ânion superóxido, o radical hidroperoxila, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila que, de forma conjunta, são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO). O termo radical livre é empregado quando um átomo ou uma molécula apresentam um ou mais elétrons não pareados, constituindo-se espécies instáveis, com meia-vida muito curta e que reagem rapidamente com diversos alvos celulares (1). Entre os ERO, somente o ânion superóxido e os radicais hidroperoxila e hidroxila podem ser realmente considerados radicais livres.

Reações oxidativas ocorrem, portanto, fisiologicamente no organismo humano, porém, são contrabalançadas pela ação de antioxidantes tanto endógenos como provenientes da dieta. O desequilíbrio no estado de óxido-redução, em favor das reações pró-oxidativas, causando dano celular é chamado de estresse oxidativo (2). O organismo é dotado de mecanismos para manter o equilíbrio entre compostos pró- e antioxidantes. Quando há insuficiência do potencial antioxidante em contrabalançar aumentos na formação de ERO, há danos oxidativos celulares. Dos mecanismos de defesa antioxidante para prevenir ou reduzir os efeitos do estresse oxidativo, participam enzimas endógenas (superóxido dismutase – SOD, catalase e glutathione peroxidase) e outras substâncias disponíveis na dieta, como os carotenoides, o alfa-tocoferol, o ácido ascórbico e compostos fenólicos, entre outras. O sistema enzimático representa a primeira defesa antioxidante endógena contra as ERO. No entanto, para impedir os danos celulares decorrentes de estresse oxidativo persistente, o aporte exógeno de substâncias com potencial antioxidante é de fundamental interesse.

A aterosclerose está intimamente relacionada ao estresse oxidativo, uma vez que, entre seus principais determinantes, estão a hiperlipidemia e a hiperglicemia, condições nas quais ocorrem modificações na lipoproteína de baixa densidade (LDL), favorecendo sua captação pelos receptores *scavengers* de macrófagos sub-endoteliais. Essas modificações na LDL estão entre os eventos mais precoces na formação da placa aterosclerótica (3). No diabetes melito (DM) também é bastante conhecido o papel do estresse oxidativo, que contribui para a inflamação e disfunção endotelial que,

cronicamente, lesam vasos da macro e microcirculação, favorecendo a instalação das complicações crônicas dessa doença (4). O estresse oxidativo está envolvido, ainda, na fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica; um dos mecanismos que poderiam induzir elevação dos níveis pressóricos parece ser a *up-regulation* dos receptores AT1 renais de angiotensina II, que promove retenção de sódio (5), além da redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, com posterior aumento na geração de nitrotirosina e outros produtos nitrados.

Com base no conhecimento de que níveis elevados de estresse oxidativo são lesivos ao organismo e que existem, na natureza, substâncias com propriedades antioxidantes, a literatura passou a investigar o potencial papel de substâncias antioxidantes exógenas em reduzir a reatividade das ERO e, conseqüentemente, os danos orgânicos. Resultados provenientes de diversos estudos *in vitro* (6), bem como estudos com suplementação de antioxidantes em modelos animais (7,8), motivaram pesquisas voltadas para a prevenção e controle de doenças crônicas prevalentes nas populações.

Considerando-se que a doença cardiovascular (DCV) está entre as principais causas mundiais de mortalidade e que o processo oxidativo contribui sobremaneira para o aumento do risco cardiometabólico (RCM), medidas com potencial antioxidante surgem como uma estratégia promissora no controle de fatores de risco. Estudos conduzidos em animais relataram efeito benéfico da suplementação com substâncias antioxidantes no controle de fatores de RCM (8,9). Na mesma linha, encontraram-se evidências epidemiológicas de uma relação inversa entre o consumo de antioxidantes e a ocorrência de eventos cardiovasculares (10). No entanto, estudos de intervenção com suplementos vitamínicos têm falhado em comprovar essa hipótese e, em alguns casos, verificaram efeitos adversos dessas substâncias na mortalidade cardiovascular (11).

Nesta revisão, são exploradas as relações entre as principais vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes (vitaminas E e C, A, zinco e selênio) e os fatores de RCM. As controvérsias, as evidências e as perspectivas de uso terapêutico desses micronutrientes também são discutidas.

## VITAMINAS E E C

A vitamina E é a principal vitamina lipossolúvel presente no plasma e na partícula de LDL, podendo se apresentar em quatro isoformas: alfa, beta, gama e delta-toco-

ferol, e destas o alfa-tocoferol é a forma biologicamente mais ativa e a mais estudada até o momento (12). Os tocoferóis convertem radicais livres em espécies mais estáveis por meio da doação de um átomo de hidrogênio, gerando produtos eletricamente estáveis ou menos reativos. É importante notar que, ao proteger os lipídeos da oxidação, a vitamina E se converte em um radical tocoferil, precisando ser regenerada para recuperar seu potencial antioxidante. Do sistema de regeneração da vitamina E, participam o ácido ascórbico, a enzima glutathione-reduzida e a coenzima Q10. Sugeriu-se que a ação desse sistema deve ser estudada em conjunto com a ação da vitamina E para resultados mais consistentes sobre o potencial antioxidante do plasma (13).

Uma vez firmada a participação da LDL oxidada no processo aterosclerótico, intensificou-se o interesse pela suplementação com vitamina E na prevenção da DCV. Buscando avaliar essa hipótese, estudos epidemiológicos observacionais conduzidos na década de 1990 relataram associação inversa entre a ingestão de vitamina E e o risco cardiovascular. Entre esses, destaca-se o *Nurse's Health Study*, no qual cerca de 90 mil mulheres, de 34 a 59 anos, sem DCV, foram acompanhadas por oito anos, tendo-se observado que aquelas que consumiram suplementos de vitamina E ( $\geq 100$  UI) por mais de dois anos apresentaram menor risco de doença coronariana (risco relativo de 0,59), após ajustes para idade, tabagismo, outros fatores de risco cardiovascular e nutrientes com propriedades antioxidantes (14). Na mesma linha, cerca de 40 mil profissionais da saúde do sexo masculino saudáveis foram acompanhados por quatro anos, e menor risco de doença coronariana foi observado naqueles que tiveram maior consumo de vitamina E (60 *versus* 7,5 UI por dia) (15).

Essa perspectiva promissora de prevenção não foi reforçada pelos ensaios clínicos controlados e aleatorizados que testaram a eficácia da suplementação com vitamina E na redução de eventos cardiovasculares. Uma metanálise de sete estudos evidenciou ausência de efeito benéfico ou clinicamente relevante dessa suplementação sobre os principais desfechos cardiovasculares (16). O *Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Trial* revelou, ainda, aumento significativo da mortalidade por acidente vascular cerebral (AVC) hemorrágico decorrente do uso do alfa-tocoferol em homens tabagistas que buscavam a prevenção de câncer de pulmão (17). Em concordância com esses resultados, no *Physicians Health Study*, a suplementação com vitamina E (400 UI em dias alternados) aumentou em 1,74 vez o

risco de AVC hemorrágico em homens (18). Uma possível explicação para esse achado baseia-se na capacidade da vitamina E de inibir a função plaquetária, independentemente de sua ação antioxidante (19). Adicionalmente, outros dois importantes estudos de intervenção relataram efeitos adversos da vitamina E no aumento da ocorrência de insuficiência cardíaca (20,21).

No que diz respeito à prevenção do diabetes melito tipo 2 com suplementação de vitamina E, resultados de grandes estudos também não comprovaram o possível efeito benéfico desse micronutriente. No *Women's Health Study*, 40 mil mulheres acima de 45 anos e sem DM receberam 600 UI de vitamina E ou placebo em dias alternados e foram acompanhadas por dez anos. A redução de risco de 5% encontrada naquelas que tomaram vitamina E não foi significativa (22).

Neste ponto vale ressaltar que uma diferença fundamental entre os estudos observacionais e os de intervenção foi o alvo da prevenção: ao passo que os primeiros seguiram indivíduos saudáveis por longos períodos de tempo, os intervencionais investiram na prevenção secundária, avaliando se a suplementação reduziria eventos em pacientes de alto RCM. Um estudo observacional, derivado da coorte de *Framingham*, levantou a hipótese de que, em indivíduos saudáveis, a vitamina E poderia reduzir o risco cardiovascular, mas naqueles pacientes com DCV preexistente ela não teria efeito ou poderia até mesmo ser prejudicial (23). Dados recentes sugerem que a vitamina E em altas doses aumenta a atividade da enzima CYP3A, acelerando a degradação e a eliminação de drogas que estariam sendo utilizadas para proteção cardiovascular em indivíduos de alto risco (24). Essa poderia ser uma explicação para os resultados contraditórios relatados na literatura. No entanto, o estudo de *Framingham* concluiu que a presença de DCV no momento basal do estudo não influenciou a associação entre uso de suplemento de vitamina E e o risco de eventos cardiovasculares ou mortalidade por todas as causas (23). Além disso, uma revisão recente sugeriu que estudos de maior qualidade metodológica apontaram para um aumento da mortalidade com a suplementação, ao passo que aqueles de menor rigor metodológico sugeriram efeitos benéficos (25).

Em paralelo às investigações sobre potenciais benefícios da vitamina E no perfil de risco cardiovascular, deve-se também atentar para o possível papel protetor da vitamina C, ou ácido ascórbico. Esta é considerada um antioxidante “primário” ou “preventivo”, uma vez que reage com o oxigênio antes do início do processo

oxidativo e participa do sistema de regeneração da vitamina E, sendo, portanto, de fundamental importância para manter o potencial antioxidante do plasma. Apesar de suas propriedades benéficas, há circunstâncias em que a vitamina C pode atuar como pró-oxidante *in vitro* (26) e, inclusive, promover a glicação de proteínas (27). Dessa forma, seu papel na prevenção do DM tipo 2 e DCV permanece controverso.

Um estudo prospectivo recente acompanhou adultos de origem europeia por 12 anos e demonstrou forte associação inversa entre as concentrações séricas de vitamina C e o risco de DM tipo 2 (28); nesse mesmo estudo, o consumo de frutas e vegetais também associou-se a um menor risco de DM tipo 2. Sabe-se que pacientes portadores de síndrome metabólica ou DM tipo 2 apresentam concentração sérica reduzida da vitamina C, porém altas doses de suplementação (800 mg por dia) não foram capazes de restaurar completamente as concentrações séricas da vitamina, tampouco melhorar a disfunção endotelial e a resistência à insulina nestes indivíduos (29). Outros autores relataram, ainda, uma associação positiva entre a ingestão de suplementos de vitamina C e a mortalidade cardiovascular em mulheres diabéticas na pós-menopausa seguidas por 15 anos. Especulou-se que essa vitamina poderia ser deletéria por atuar como um pró-oxidante na presença de ferro livre em excesso, por glicar proteínas ou estimular a peroxidação lipídica (30). Vale ressaltar que essa associação não foi encontrada em mulheres não diabéticas no momento basal do estudo.

A favor do papel antioxidante da vitamina C, alguns estudos mostraram sua capacidade de reduzir biomarcadores do estresse oxidativo. A suplementação com vitamina C por dois meses reduziu em 22% o F2-isoprostano em indivíduos que apresentaram elevada concentração desse marcador no plasma. Foi proposto que, nestes casos, a suplementação com vitamina C seria benéfica para reduzir o estresse oxidativo (31). Também em pacientes com níveis de proteína C reativa elevada ( $\geq 1,0$  mg/L), indicativa de risco cardiovascular aumentado, a ingestão diária de 1 g de vitamina C por dois meses foi capaz de reduzir em 25,3% a concentração desse marcador inflamatório (32). Porém, acompanhamento em prazo mais longo é necessário para assegurar uma real redução de eventos cardiovasculares induzidos pela intervenção.

De modo semelhante ao observado em relação à vitamina E, os grandes estudos prospectivos falharam em comprovar a eficácia da vitamina C na redução do

risco cardiovascular. Um estudo observacional que seguiu homens de 40 a 75 anos de idade por um período de oito anos não detectou associação entre ingestão de vitamina C e ocorrência de AVC isquêmico (33). No *Physicians Health Study*, que seguiu mais de 14 mil homens com mais de 50 anos (5% dos quais apresentavam DCV no início do seguimento) por oito anos, também não foi encontrado efeito significativo da vitamina C (500 mg por dia) na redução dos eventos cardiovasculares ou na mortalidade (18).

No que se refere à mortalidade, em um estudo conduzido na Suécia, aproximadamente 40 mil homens de 45 a 79 anos, sem DCV no início do seguimento, foram acompanhados por cerca de oito anos e não se observaram associações entre o consumo de vitamina C e mortalidade cardiovascular ou por todas as causas (34). No entanto, entre os homens que relataram uma dieta inadequada no momento basal, o uso de suplementos multivitamínicos associou-se à redução significativa na mortalidade de origem cardiovascular, após ajustes para os fatores de confundimento (risco relativo = 0,72; IC 95% = 0,57 a 0,91). Outros autores examinaram a relação entre o consumo de vitamina C e a mortalidade na coorte do NHANES I, composta por mais de 11 mil adultos norte-americanos entre 25 e 74 anos de idade, acompanhados por aproximadamente dez anos. Encontraram relação inversa entre a taxa de mortalidade padronizada e o consumo de vitamina C em ambos os sexos, porém somente nos homens essa relação se manteve significativa após os ajustes para os fatores de confundimento (35).

Por fim, com o intuito de explicar tais diferenças e identificar quais indivíduos se beneficiariam com a terapêutica antioxidante, estudo de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo dessas vitaminas pode ser promissor. Como exemplo, o polimorfismo da haploglobina 2-2 associa-se ao aumento da produção de ERO e níveis circulantes reduzidos de vitaminas E e C. Verificou-se que o risco cardiovascular dos portadores desse polimorfismo pode ser atenuado com a suplementação de vitamina E (36). Corroborando essa hipótese, outro estudo, conduzido com adultos diabéticos portadores desse polimorfismo, mostrou que a terapêutica com estatina associada à suplementação de vitamina E foi mais eficaz em prevenir eventos cardiovasculares do que a estatina prescrita isoladamente (*odds ratio* = 0,31) (37). A identificação desses indivíduos na prática clínica abrirá uma perspectiva para a terapêutica direcionada com suplementos, tornando-a mais precisa e eficaz.

Enquanto as evidências ainda são insuficientes, a suplementação com vitamina E ou C na prevenção primária ou secundária não deve ser recomendada indiscriminadamente, uma vez que seu benefício não foi comprovado e, em alguns indivíduos, até aumentou o RCM. Resultados mais consistentes para a saúde humana foram encontrados nos estudos que abordaram padrões dietéticos (38). A manutenção de uma dieta saudável e balanceada, sem a necessidade de suplementação de um micronutriente específico, associa-se a menor RCM e outras doenças crônicas. Porém, convém assinalar que essa dieta pode ser indicativa de um estilo de vida mais saudável de um modo geral. Mais estudos com dietas ricas em vitamina E e C são necessários para elucidar como a atuação combinada destes e outros antioxidantes é capaz de prevenir doenças.

## VITAMINA A E CAROTENOIDES

O termo vitamina A compreende uma família de compostos alimentares essenciais lipossolúveis que são estruturalmente relacionados ao retinol (denominado vitamina A pré-formada) e que compartilham atividades biológicas. Neste conceito, são considerados também vitamina A os carotenoides com atividade de pró-vitamina A que atuam como precursores alimentares do retinol. São eles:  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e criptoxantina (39). Enquanto a vitamina A pré-formada é encontrada apenas em produtos alimentares de origem animal, os carotenoides dietéticos estão presentes especialmente em frutas e hortaliças. Entre os aproximadamente 600 carotenoides descobertos, seis deles ( $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina) representam mais de 95% da concentração total de carotenoides plasmáticos (40,41).

Estudos epidemiológicos sugerem que os carotenoides exercem papel protetor importante contra doenças cardiovasculares e certos tipos de cânceres (42-44). Ainda que o mecanismo de proteção não esteja totalmente elucidado, depende em parte da sua atividade antioxidante (45). Outras ações, como sua participação na regulação do crescimento celular e na modulação da expressão gênica, também podem estar relacionadas ao seu efeito protetor (40).

A estrutura molecular comum aos carotenoides é parcialmente responsável por sua ação antioxidante, em razão de sua capacidade de reagir com o oxigênio *singlet*, interrompendo a propagação de reações de peroxidação lipídica (45). Entretanto, diferenças nas ações

dos diversos carotenoides revelam que há dúvidas sobre a forma como essas substâncias atuam como antioxidantes. É relevante mencionar que alguns carotenoides, como o  $\beta$ -caroteno, podem apresentar propriedades pró-oxidantes em condições específicas (46), o que reforça a necessidade de mais estudos para esclarecer o mecanismo pelo qual os carotenoides exercem seus efeitos na saúde humana.

No estudo CARDIA/YALTA, que acompanhou 4.580 indivíduos brancos e negros de 18 a 30 anos por 15 anos, a concentração sérica dos carotenoides totais e individuais (com exceção do licopeno) foi inversamente associada a marcadores de inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial, mesmo após múltiplos ajustes. Esses achados acrescentaram conhecimento sobre os mecanismos por meio dos quais os carotenoides séricos podem auxiliar na prevenção de DCV (47).

A ingestão dietética de  $\beta$ -caroteno teve efeito protetor coronariano, observado apenas em mulheres, em estudo que acompanhou 5.133 adultos sem doença cardíaca por 14 anos (42). Em contraste, o *Scottish Heart Health Study*, que incluiu 4.036 homens e 3.833 mulheres sem cardiopatia, encontrou apenas em homens associação inversa entre ingestão desse nutriente e risco de eventos cardiovasculares (43). Os benefícios do consumo de frutas e hortaliças, ricas em carotenoides, foram observados em estudo prospectivo envolvendo 1.299 idosos. Após 4,8 anos de seguimento, o consumo de frutas e hortaliças foi inversamente associado à mortalidade cardiovascular (risco relativo de 0,54) (48).

Estudos epidemiológicos também avaliaram a relação entre os carotenoides e o DM tipo 2, como é o caso do estudo EVA que incluiu 1.389 adultos saudáveis (49). Maior concentração plasmática de carotenoides no início do estudo associou-se a menor risco de ocorrência de distúrbios do metabolismo da glicose após nove anos de acompanhamento, mesmo após ajuste para marcadores oxidativos. O fato de a concentração de carotenoides circulantes ter mostrado uma relação independente com o início da disglucemia indica que o estresse oxidativo não explica totalmente os resultados encontrados neste estudo. No CARDIA, no qual 4.493 homens e mulheres de 18 a 30 anos foram acompanhados por 15 anos, concentrações de carotenoides mais altas associaram-se a menor risco de DM e de resistência à insulina em não fumantes (50). Por outro lado, em fumantes, essa relação não foi observada, sugerindo que o tabagismo pode anular o efeito protetor dos carotenoides.

Ainda no estudo CARDIA, verificou-se que a concentração plasmática dos carotenoides  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, criptoxantina, luteína e zeaxantina – mas não de licopeno – associou-se inversamente à incidência de hipertensão, após ajuste para pressão arterial sistólica no basal e para outros fatores confundidores (51).

Esses achados motivaram a realização de estudos com suplementação de carotenoides. Em prevenção primária, ensaio clínico aleatorizado controlado mostrou que a suplementação de 50 mg de  $\beta$ -caroteno em dias alternados por 12 anos não foi efetiva para prevenir certos cânceres, DCV ou mortes por todas as causas em 22.071 homens (40-84 anos) aparentemente saudáveis, incluindo fumantes e ex-fumantes (52). Outro estudo, de prevenção secundária, envolvendo a mesma suplementação a 8.171 mulheres (idade mínima de 40 anos) com DCV preexistente ou pelo menos três fatores de risco, não observou qualquer efeito após 9,4 anos de acompanhamento (53). Os resultados do estudo CARET, obtidos em 18.314 indivíduos de ambos os sexos (45-74 anos) fumantes, ex-fumantes recentes e homens expostos ao amianto, foram mais desfavoráveis. Esses foram distribuídos em grupo controle e grupo Intervenção, sendo que o segundo recebeu suplemento com 30 mg de  $\beta$ -caroteno e 25.000 UI de retinilpalmitato (retinol); após quatro anos, houve aumento de 28% na incidência de câncer de pulmão, de 17% na mortalidade por todas as causas e de 26% na mortalidade cardiovascular no grupo suplementado (54). Especulase que esse efeito inesperado possa estar relacionado a propriedades pró-oxidantes dos carotenoides (40).

Em relação à prevenção de DM tipo 2, 22.071 participantes saudáveis (40-84 anos) do *Physicians' Health Study* foram randomizados para receber ou não suplemento de 50 mg de  $\beta$ -caroteno em dias alternados. Não se observou nenhuma redução no risco de DM tipo 2 após uma média de 12 anos de seguimento (55).

Diante do exposto, conclui-se que é necessário aprofundar o conhecimento sobre possíveis efeitos dos carotenoides nas doenças crônicas não transmissíveis e sobre seu potencial benefício via redução do estresse oxidativo. Enquanto alguns estudos epidemiológicos observacionais mostram ação protetora dos carotenoides nas doenças cardiometabólicas, ensaios envolvendo suplementação mostram ausência de efeito ou efeito desfavorável em determinadas populações, como em fumantes, nos quais a suplementação aumentou o risco de câncer de pulmão e de morte cardiovascular. Dessa forma, as evidências atuais não apoiam o uso de suple-

mentos à base de carotenoides para redução do RCM. Entretanto, a ingestão de frutas e hortaliças ricas em carotenoides deve ser estimulada, uma vez que seus benefícios para promoção da saúde já estão bem estabelecidos (56,57).

## ZINCO

A participação do zinco na defesa antioxidante plasmática vem sendo mais recentemente estudada. Entre outros efeitos, esse mineral inibe a NADPH-oxidase – enzima envolvida na produção de ERO – e atua como cofator da superóxido dismutase (SOD), uma das enzimas do sistema antioxidante endógeno. Além disso, participa diretamente da neutralização do radical livre hidroxila e induz a produção de metalotioninas, substâncias que também atuam na remoção desse radical (58).

Alguns estudos avaliaram o efeito da suplementação de zinco em marcadores de estresse oxidativo e de inflamação, apontando um papel favorável na defesa antioxidante. Em indivíduos saudáveis, a suplementação de zinco foi capaz de reduzir marcadores de estresse oxidativo plasmáticos, como o malondialdeído e o 8-hydroxideoxi-guanina, e de inibir a indução do RNAm do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  em células mononucleares (59). A suplementação com 30 mg de zinco por seis meses em 56 adultos portadores de DM tipo 2 foi capaz de aumentar a concentração plasmática de zinco e de reduzir marcadores de estresse oxidativo, enquanto no grupo placebo não houve mudanças (60). Também se verificou que a concentração sérica de zinco é menor em indivíduos idosos em comparação aos jovens, e que a suplementação de zinco nos primeiros foi capaz de reduzir marcadores de estresse oxidativo (61).

Resultados provenientes de estudos com animais sugerem que o zinco poderia prevenir a ocorrência de DM tipo 2. Além de ser componente estrutural da insulina (62), foi demonstrado que esse mineral estabiliza e evita a degradação dos hexâmeros de insulina armazenados na célula beta (63); também a suplementação com zinco atenuou a hiperglicemia e a hiperinsulinemia de camundongos ob/ob e db/db (64,65). Adicionalmente, certos complexos de zinco administrados a roedores mostraram efeitos insulínomiméticos como o estímulo à lipogênese e a redução da hiperglicemia (66,67). Uma análise derivada do *Nurses Health Study* buscou comprovar essa hipótese e demonstrou uma fraca relação inversa entre a ingestão de zinco e o risco de DM tipo 2 em mulheres americanas adultas, após dois

anos de seguimento, ajustando para fatores de confundimento (68). Os resultados deste estudo indicam, ainda, que a suplementação de zinco potencializa o risco além daquele obtido pela ingestão adequada e que o consumo de zinco por meio de suplementos apenas associou-se com redução de risco de DM tipo 2 nos indivíduos com baixos teores na dieta habitual.

Em estudo transversal envolvendo mais de 3.500 indivíduos, foi avaliada a associação entre consumo dietético de zinco e doenças cardiometabólicas. Nos indivíduos com baixa ingestão observou-se maior frequência de DCV, DM tipo 2 e intolerância à glicose (69). Há outros estudos que também sugerem maior prevalência de DCV em indivíduos com baixas concentrações séricas de zinco (70,71). No que se refere a indivíduos com diagnóstico de DM tipo 2, há concentração sérica de zinco menor do que em indivíduos normais (72); em uma coorte de mais de mil portadores de DM, com idade entre 45 e 64 anos, acompanhados por cerca de sete anos, a baixa concentração de zinco foi fator de risco independente para eventos coronarianos (73).

Esses resultados, analisados em conjunto, sugerem que o consumo adequado de zinco pode reduzir o RCM e, principalmente, reduzir a ocorrência de eventos cardiovasculares em portadores de DM tipo 2. No entanto, a suplementação de zinco em indivíduos com concentrações séricas normais e ingestão adequada desse nutriente na dieta não parece ser necessária para esse propósito.

## SELÊNIO

O selênio é um micronutriente essencial que, uma vez incorporado às selenoproteínas, exerce importantes funções no organismo, participando da defesa antioxidante, do sistema imune e da regulação da função tireoidiana (74). A glutathiona peroxidase é uma selenoproteína que atua como enzima antioxidante no plasma. Demonstrou-se que sua concentração e atividade aumentam com o consumo de selênio, até que essa relação dose-resposta atinja um platô, a um nível sérico de selênio entre 70 e 90 ng/mL (75).

Nos Estados Unidos, 99% da população têm concentrações séricas de selênio acima do necessário para maximizar a atividade da glutathiona peroxidase, portanto, a suplementação com selênio é desnecessária e, possivelmente, pode ser danosa ao organismo (76). Recentes evidências de estudos observacionais sugeriram que a suplementação com selênio em populações sem defi-

ciência pode aumentar o risco de DM, contradizendo achados prévios, provenientes de modelos animais, de que a suplementação com baixas doses poderia exercer efeitos benéficos no metabolismo da glicose (77).

Em relação ao perfil lipídico, estudo transversal conduzido em norte-americanos revelou associação positiva e significativa entre níveis circulantes de selênio e colesterol total (76). No entanto, como essa população apresenta concentrações séricas de selênio elevadas, a associação citada acima provavelmente não se relaciona com seu efeito antioxidante, pois, nestas condições, a atividade da glutathiona-peroxidase já está maximizada. Em outras populações sem carência de selênio, essa associação positiva com colesterol total também foi detectada (78,79), mas os dados relativos às lipoproteínas e apolipoproteínas não são homogêneos (76). Quanto ao triglicérides, não foram detectadas associações com a concentração de selênio (78,80). No que diz respeito à suplementação desse micronutriente, poucos estudos prescreveram selênio isoladamente, envolvendo pequeno número de participantes e por curto período de seguimento. Um deles apontou um aumento na concentração do colesterol total e, em outro, cujo objetivo era a prevenção de câncer de pulmão, não foi detectado efeito protetor desse mineral (81,82).

Sabe-se que a faixa considerada terapêutica do selênio é estreita e que sua toxicidade está parcialmente relacionada à capacidade que alguns compostos contendo selênio têm de gerar radicais livres. É necessário ter muita cautela na prescrição de suplementos deste nutriente. Os efeitos desfavoráveis no risco de DM e possivelmente no perfil lipídico em populações sem carência deste mineral, como é o caso da norte-americana, poderiam explicar a ausência de efeitos benéficos do selênio na redução de eventos cardiovasculares, encontrada em estudos conduzidos nos Estados Unidos (83). Em um desses estudos, *Nutritional Prevention of Cancer Trial*, a suplementação com 200 microgramas de selênio não foi capaz de reduzir a incidência de desfechos cardiovasculares nem da mortalidade geral, avaliados após 7,6 anos de seguimento (84). No NHANES III, o nível sérico de selênio foi determinado em mais de 13 mil indivíduos e não se associou à mortalidade cardiovascular em acompanhamento de 12 anos (85).

No Brasil, estudos revelam baixa biodisponibilidade de selênio na dieta consumida pela população de baixa renda do Estado de São Paulo e também do Mato Grosso (86,87). No entanto, não estão publicados estudos que tenham avaliado se a suplementação de selê-

nio teria efeitos protetores em relação ao DM tipo 2 ou aos eventos cardiovasculares na população brasileira.

Com base no exposto, conclui-se, até o momento, que a suplementação de selênio não é necessária em populações com concentrações séricas normais do nutriente. Recente metanálise mostrou que, apesar de alguns estudos observacionais terem detectado associação inversa entre selênio e risco de doença coronariana, os achados de grandes ensaios aleatorizados sobre a eficácia da suplementação de selênio na redução do RCM são inconclusivos e, por hora, sua prescrição não deve ser recomendada para essa finalidade (83). Se houver carência de selênio na dieta, a preocupação com o RCM em relação ao nutriente em questão deve ser considerada, mas também não há dados conclusivos demonstrando benefícios de sua suplementação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tema dos micronutrientes com propriedades antioxidantes e o RCM ainda está repleto de controvérsias. Estudos epidemiológicos observacionais mostram que maior consumo de substâncias antioxidantes provenientes da dieta e, principalmente, dietas ricas em frutas e hortaliças diminuem o RCM. No entanto, quando se investe na suplementação de um micronutriente específico com propriedades antioxidantes para se reduzir a incidência de DM tipo 2 ou eventos cardiovasculares, o impacto é inexistente ou, por vezes, negativo.

É possível que, quando as dúvidas em relação à dose e à duração da suplementação de cada micronutriente forem esclarecidas, além da combinação ideal entre eles para a prevenção das doenças crônicas, assim como o perfil do paciente que potencialmente se beneficiaria, o papel protetor dessas vitaminas e minerais seja finalmente comprovado. Enquanto se aguardam essas respostas, é prudente e desejável o estímulo ao aumento do consumo de frutas e hortaliças, ricas em substâncias que combatem o estresse oxidativo, e não à ingestão de antioxidantes isolados ou associados na forma de suplementos.

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3ª ed. Oxford: Oxford University Press; 2000.
- Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr.* 2005;135(5):969-72.

- Siqueira AFA, Abdalla DSP, Ferreira SRG. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(2):334-43.
- Wen Y, Skidmore JC, Porter-Turner MM, Rea CA, Khokher MA, Singh BM. Relationship of glycation, antioxidant status and oxidative stress to vascular endothelial damage in diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2002;4(5):305-8.
- Banday AA, Lokhandwala MF. Oxidative stress-induced renal angiotensin AT1 receptor upregulation causes increased stimulation of sodium transporters and hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295(3):F698-706.
- Devaraj S, Harris A, Jialal I. Modulation of monocyte-macrophage function with alpha-tocopherol: implications for atherosclerosis. *Nutr Rev.* 2002;60(1):8-14.
- Korish AA, Arafah MM. Catechin combined with vitamins C and E ameliorates insulin resistance (IR) and atherosclerotic changes in aged rats with chronic renal failure (CRF). *Arch Gerontol Geriatr.* 2008;46(1):25-39.
- Minamiyama Y, Takemura S, Bito Y, Shinkawa H, Tsukioka T, Nakahira A, et al. Supplementation of alpha-tocopherol improves cardiovascular risk factors via the insulin signalling pathway and reduction of mitochondrial reactive oxygen species in type II diabetic rats. *Free Radic Res.* 2008;42(3):261-71.
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part II: animal and human studies. *Circulation.* 2003;108(17):2034-40.
- Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med.* 1997;337(6):408-16.
- Vivekananthan DP, Penn M, Sapp S, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2003;361(9374):2017-23.
- Honarbaksh S, Schachter M. Vitamins and cardiovascular disease. *Br J Nutr.* 2009;101(8):1113-31.
- Nwose EU, Jelinek HF, Richards RS, Kerr PG. The vitamin E regeneration system (VERS) and an algorithm to justify antioxidant supplementation in diabetes – A hypothesis. *Medical Hypotheses.* 2008;70(5):1002-8.
- Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med.* 1993;328(20):1444-9.
- Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med.* 1993;328(20):1450-6.
- Eidelman RS, Hollar D, Hebert PR, Lamas GA, Hennekens CH. Randomized trials of vitamin E in the treatment and prevention of cardiovascular disease. *Arch Intern Med.* 2004;164(14):1552-6.
- Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med.* 1994;330(15):1029-35.
- Sesso HD, Buring JE, Christen WG. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II. Randomized controlled trial. *JAMA.* 2008;300(18):2123-33.
- Steiner M. Vitamin E, a modifier of platelet function: rationale and use in cardiovascular and cerebrovascular disease. *Nutr Rev.* 1999;57(10):306-9.
- Marchioli R, Levantesi G, Macchia A, Marfisi RM, Nicolosi GL, Tavazzi L, et al. Vitamin E increases the risk of developing heart failure after myocardial infarction: results from the GISSI-Prevenzione trial. *J Cardiovasc Med.* 2006;7(5):347-50.
- Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2005;293(11):1338-47.

22. Liu S, Lee I-M, Song Y, Van Denburgh M, Cook NR, Manson JE, et al. Vitamin E and risk of type 2 diabetes in the Women's Health Study randomized controlled trial. *Diabetes*. 2006;55(10):2856-62.
23. Dietrich M, Jacques PF, Pencina MJ, Lanier K, Keyes MJ, Kaur G, et al. Vitamin E supplement use and the incidence of cardiovascular disease and all-cause mortality in the Framingham Heart Study: Does the underlying health status play a role? *Atherosclerosis*. 2008. [Ahead of print]
24. Traber MG, Siddens LK, Leonard SW, Schock B, Gohil K, Krueger SK, et al. Alpha-tocopherol modulates Cyp3a expression, increases gamma-CEHC production, and limits tissue gamma-tocopherol accumulation in mice fed high gamma-tocopherol diets. *Free Rad Biol Med*. 2005;38(6):773-85.
25. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2007;297(8):842-57.
26. Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res*. 1996;25(5):439-54.
27. Lee KW, Mossine V, Ortwerth BJ. The relative ability of glucose and ascorbate to glycate and crosslink lens proteins in vitro. *Exp Eye Res*. 1998;67(1):95-104.
28. Harding A, Wareham NJ, Bingham SA, Khaw K, Luben R, Welch A, et al. Plasma vitamin C level, fruit and vegetable consumption, and the risk of new-onset type 2 diabetes mellitus. The European Prospective Investigation of Cancer-Norfolk Prospective Study. *Arch Intern Med*. 2008;168(14):1493-9.
29. Chen H, Karne RJ, Hall G, Campia U, Panza JA, Cannon 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):H137-45.
30. Lee DH, Folsom AR, Harnack L, Halliwell B, Jacobs DR Jr. Does supplemental vitamin C increase cardiovascular disease risk in women with diabetes? *Am J Clin Nutr*. 2004;80(5):1194-200.
31. Blocka G, Jensena CD, Morrowb JD, Hollanda N, Norkusc EP, Milneb GL, et al. The effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. *Free Rad Biol Med*. 2008;45(4):377-84.
32. Block G, Jensen CD, Dalvi TB, Norkus EP, Hudes M, Crawford PB, et al. Vitamin C treatment reduces elevated C-reactive protein. *Free Rad Biol Med*. 2009;46(1):70-7.
33. Ascherio A, Rimm EB, Hernán MA, Giovannucci E, Kawachi I, Stampfer MJ, et al. Relation of consumption of vitamin E, vitamin C, and carotenoids to risk for stroke among men in the United States. *Ann Intern Med*. 1999;130(12):963-70.
34. Messerer M, Håkansson N, Wolk A, Åkesson A. Dietary supplement use and mortality in a cohort of Swedish men. *Br J Nutr*. 2008;99(3):626-31.
35. Enstrom JE, Kanim LE, Klein MA. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. *Epidemiology*. 1992;3(3):194-202.
36. Zingg JM, Azzi A, Meydani M. Genetic polymorphisms as determinants for disease-preventive effects of vitamin E. *Nutr Rev*. 2008;66(7):406-14.
37. Blum S, Milman U, Shapira C, Miller-Lotan R, Bennett L, Kostenko M, et al. Dual therapy with statins and antioxidants is superior to statins alone in decreasing the risk of cardiovascular disease in a subgroup of middle-aged individuals with both diabetes mellitus and the haptoglobin 2-2 genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):e18-20.
38. Lichtenstein AH, Russell RM. Essential nutrients: food or supplements? Where should the emphasis be? *JAMA*. 2005;294(3):351-8.
39. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington (DC): National Academy Press; 2000.
40. Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res*. 2007;55(3):207-16.
41. Maiani G, Castón MJP, Catasta G, Toti E, Cambrodón IG, Bysted A, et al. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53:DOI 10.1002/mnfr.200800053.
42. Knekt P, Reunanen A, Jarvinen R, Seppanen R, Heliovaara M, Aromaa A. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. *Am J Epidemiol*. 1994;139(12):1180-9.
43. Tood S, Woodward M, Tunstall-Pedoe H, Smith CB. Dietary antioxidant vitamins and fiber in the etiology of cardiovascular disease and all-cause mortality: results from the Scottish Heart Health Study. *Am J Epidemiol*. 1999;150(10):1073-80.
44. Buijsse B, Feskens EJM, Schlettwein-Gsell D, Ferry M, Kok FJ, Kromhout D, et al. Plasma carotene and alpha-tocopherol in relation to 10-y all-cause and cause-specific mortality in European elderly: the Survey in Europe on Nutrition and the Elderly, a Concerted Action (SENECA). *Am J Clin Nutr*. 2005;82(4):879-86.
45. McNulty H, Jacob RF, Mason RP. Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *Am J Cardiol*. 2008;101(suppl):20D-9D.
46. Norman IK. Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*. 2001;17(10):815-7.
47. Hozawa A, Jacobs DR Jr, Steffes MW, Gross MD, Steffen LM, Lee DH. Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA)/Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALTA) study. *Clin Chem*. 2007;53(3):447-55.
48. Gaziano JM, Manson JE, Branch LG, Colditz GA, Willett WC, Buring JE. A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascular mortality in the elderly. *Ann Epidemiol*. 1995;5(4):255-60.
49. Akbaraly TN, Fontbonne A, Favier A, Berr C. Plasma carotenoids and onset of dysglycemia in an elderly population: results of the Epidemiology of Vascular Ageing Study. *Diabetes Care*. 2008;31(7):1355-9.
50. Hozawa A, Jacobs DR Jr, Steffes MW, Gross MD, Steffen LM, Lee DH. Associations of serum carotenoid concentrations with the development of diabetes and with insulin concentration: interaction with smoking: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Epidemiol*. 2006;163(10):929-37.
51. 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):237-42.
52. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996;334(18):1145-9.
53. 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):1610-8.
54. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996;334(18):1150-5.
55. Liu S, Ajani U, Chae C, Hennekens C, Buring JE, Manson JE. Long-term beta-carotene supplementation and risk of type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1999;282(11):1073-5.
56. Ford ES, Mokdad AH. Fruit and vegetable consumption and diabetes mellitus incidence among U.S. adults. *Prev Med*. 2001;32(1):33-9.

57. Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria CM, Vupputuri S, Myers L, et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(1):93-9.
58. Prasad AS. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp Gerontol.* 2008;43(5):370-7.
59. Prasad AS, Bao B, Beck FWJ, Kucuk O, Sarkar FH. Anti-oxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(8):1182-90.
60. Roussel AM, Kerkeni A, Zouari N, Mahjoub S, Matheau JM, Anderson RA. Antioxidant effects of zinc supplementation in Tunisians with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr.* 2003;22(4):316-21.
61. Prasad AS. Zinc: mechanisms of host defense. *J Nutr.* 2007;137(5):1345-9.
62. Scott DA. Crystalline insulin. *Biochem J.* 1934;28(4):1592-602.
63. Taylor CG. Zinc, the pancreas, and diabetes: insights from rodent studies and future directions. *Biometals.* 2005;18(4):305-12
64. Simon SF, Taylor CG. Dietary zinc supplementation attenuates hyperglycemia in db/db mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001;226(1):43-51.
65. Begin-Heick N, Dalpe-Scott M, Rowe J, Heick HM. Zinc supplementation attenuates insulin secretory activity in pancreatic islets of the ob/ob mouse. *Diabetes* 1985;34(2):179-84.
66. Adachi Y, Yoshida J, Kodera Y, Kiss T, Jakusch T, Enyedy EA, et al. Oral administration of a zinc complex improves type 2 diabetes and metabolic syndromes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;351(1):165-70.
67. Fugono J, Fujimoto K, Yasui H, Kawabe K, Yoshikawa Y, Kojima Y, et al. Metallokinetic study of zinc in the blood of normal rats given insulinomimetic zinc (II) complexes and improvement of diabetes mellitus in type 2 diabetic GK rats by their oral administration. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2002;17(4):340-47.
68. Sun Q, van Dam RM, Willett WC, Hu FB. A prospective study of zinc intake and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care.* 2009. [Ahead of print]
69. Singh RB, Niaz MA, Rastogi SS, Bajaj S, Gaoli Z, Shoumin Z. Current zinc intake and risk of diabetes and coronary artery disease and factors associated with insulin resistance in rural and urban populations of north India. *J AM Coll Nutr.* 1998;17(6):564-70.
70. Reunanen A, Knekt P, Marniemi J, Mäki J, Maatela J, Aromaa A. Serum calcium, magnesium, copper and zinc and risk of cardiovascular death. *Eur J Clin Nutr.* 1996;50(7):431-7.
71. Lee D-H, Folsom A, Jacobs D. Iron, zinc, and alcohol consumption and mortality from cardiovascular diseases: the Iowa Women's Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(4):787-91.
72. Kinlaw WB, Levine AS, Morley JE, Silvis SE, McClain CJ. Abnormal zinc metabolism in type II diabetes mellitus. *Am J Med.* 1983;75(2):273-7.
73. Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Pyorala K, Lehto S, Ronnema T. Serum zinc level and coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30(3):523-8.
74. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet.* 2000;356(9225):233-41.
75. Burk RF. Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutr Clin Care.* 2002;5:75-9.
76. Bleys J, Navas-Acien A, Stranges S, Menke A, Miller ER, Guallar E. Serum selenium and serum lipids in US adults. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(2):416-23.
77. Bleys J, Navas-Acien A, Guallar E. Selenium and diabetes: more bad news for supplements. *Ann Intern Med.* 2007;147(4):217-23.
78. Jossa F, Trevisan M, Krogh V, Farinara E, Giumetti D, Fusco G, et al. Serum selenium and coronary heart disease risk factors in southern Italian men. *Atherosclerosis.* 1991;87(2-3):129-34.
79. Coudray C, Roussel AM, Mainard F, Arnaud J, Favier A. Lipid peroxidation level and antioxidant micronutrient status in a pre-aging population; correlation with chronic disease prevalence in a French epidemiological study (Nantes, France). *J Am Coll Nutr.* 1997;16(6):584-91.
80. Hercberg S, Bertrais S, Czernichow S, Noisette N, Galan P, Jaouen A, et al. Alterations of the lipid profile after 7.5 years of low-dose antioxidant supplementation in the SU. VI.MAX Study. *Lipids.* 2005;40(4):335-42.
81. Luoma PV, Sotaniemi EA, Korpela H, Kumpulainen J. Serum selenium, glutathione peroxidase activity and high-density lipoprotein cholesterol – effect of selenium supplementation. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1984;46(3):469-72.
82. Yu SY, Mao BL, Xiao P, Yu WP, Wang YL, Huang CZ, et al. Intervention trial with selenium for the prevention of lung cancer among tin miners in Yunnan, China. A pilot study. *Biol Trace Elem Res.* 1990;24(2):105-8.
83. Flores-Mateo G, Navas-Acien A, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(4):76-3.
84. Stranges S, Marshall JR, Trevisan M, Natarajan R, Donahue RP, Combs GF, et al. Effects of selenium supplementation on cardiovascular disease incidence and mortality: secondary analyses in a randomized clinical trial. *Am J Epidemiol.* 2006;163(8):694-9.
85. Bleys J, Navas-Acien A, Guallar E. Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. *Arch Intern Med.* 2008;168(4):404-10.
86. Cintra RMG, Cozzolino SMF. Selenium bioavailability in a regional diet of Sao Paulo. *Int J Food Sci Nutr.* 1993;44(3):167-73.
87. Boaventura GT, Cozzolino SMF. Selenium bioavailability in the regional urban diet of Mato Grosso, Brazil. *Int J Food Sci Nutr.* 1993;43(4):223-9.