



CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MAURO ROBERTO DANIEL

**SUPLEMENTAÇÃO DE CROMO METIONINA EM *CAMUNDONGOS SWISS*
OBESOS: HEMATOLOGIA**

DESCALVADO

2017



CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MAURO ROBERTO DANIEL

SUPLEMENTAÇÃO DE CROMO METIONINA EM *CAMUNDONGOS SWISS* OBESOS: HEMATOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora, como parte das exigências da matriz curricular do curso de graduação em Medicina Veterinária da UNIVERSIDADE BRASIL - Campus de Descalvado - SP.

Orientador: Profa. Dra Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Co-orientador: Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo

DESCALVADO

2017

D186s Daniel, Mauro Roberto
Suplementação de Cromo Metionina em camundongos
Swiss obesos: hematologia / Mauro Roberto Daniel. -- Des-
calvado: [s.n.], 2017.
34p. : il. ; 29,5cm.

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Banca Examinadora, como parte das exigências da matriz curricular do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Brasil – Campus Descalvado – SP.

Orientadora: Prof^a Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia
Co-orientador: Prof^o Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo

1. Mineral orgânico. 2. Complexo. 3. Diabetes. 4. Crômio.
I. Título.

CDD 636.08951



CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA - CAMPUS DE DESCALVADO
SETOR DE ESTÁGIOS E TCC EM MEDICINA VETERINÁRIA – SESMEV

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Acadêmico (a): Mauro Roberto Daniel

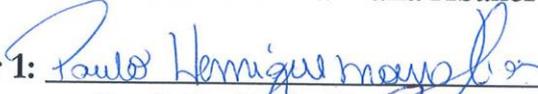
Título do Trabalho: Suplementação de cromo metionina em camundongos Swiss obesos: Hematologia.

Data da avaliação pela Banca Examinadora: 16 de Novembro de 2017.

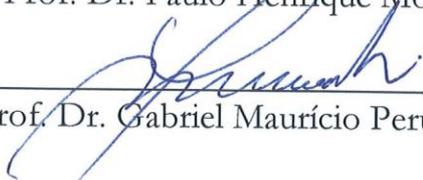
Banca:

Orientador (a): 

Prof. Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Examinador 1: 

Prof. Dr. Paulo Henrique Moura Dian

Examinador 2: 

Prof. Dr. Gabriel Maurício Peruca de Melo

APROVADO(A) pelo SESMEV em ___/___/___ com Nota: _____
(Para uso exclusivo do SESMEV Não preencher)

Prof. MSc. Roberta Vanessa Pinho Casale
Supervisora Geral TCC – SESMEV.
Campus de Descalvado, SP.

Dedico este trabalho
A Deus e à minha Família,
Especialmente, aos meus Pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora Aparecida, por ter me dado sabedoria, saúde, paciência nos momentos difíceis e por me ajudar a tornar em realidade o sonho da minha vida de ser Médico Veterinário.

Aos meus pais, João Daniel e Anesia Cypriano Daniel, fica minha eterna gratidão, por eles sempre estarem ao meu lado e nunca pouparem esforços para me proporcionar sempre o melhor.

Sou muito grato a minha namorada, Larissa Britto, por estar sempre ao meu lado me apoiando sempre, muito obrigado.

À toda minha família, que sempre esteve ao meu lado, agradeço vocês imensamente.

Deixo um agradecimento muito especial aos meus orientadores, Liandra Maria Abaker Bertipaglia e Gabriel Mauricio Peruca de Melo, pois sempre foram mais que professores e orientadores, foram amigos, irmãos e até pais para mim, muito obrigado.

Agradeço de coração todos os outros professores, pois sem eles eu não conseguiria chegar até aqui.

Jamais poderia deixar de agradecer a Professora Arlete Colussi, por estar sempre disposta a ajudar, muito obrigado.

À Raiza Penteado, que me ajudou a fazer os hemogramas e leitura das lâminas, obrigado.

Deixo meus agradecimentos a empresa NewAGri, pelo apoio e por todos materiais utilizados no experimento, obrigado.

E a minha família Vet, Renato Barroco, Pedro Chiuzolo, Adriano Artoni, Felipe Lopes, Alisson Gimenez, Lucas Ferrari e a todos os outros alunos de Medicina Veterinária da Universidade Brasil.

Não poderia deixar de agradecer todos os funcionários da faculdade pois fazem tudo que podem para dar mais conforto a nós alunos, muito obrigado.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a conclusão desta etapa da minha vida, obrigado.

RESUMO

SUPLEMENTAÇÃO DE CROMO METIONINA EM CAMUNDONGO SWISS OBESOS: HEMATOLOGIA

O presente trabalho fornece informações sobre a suplementação do cromo complexado com metionina em fêmeas de camundongos swiss, senis e obesas, com o intuito de avaliar o efeito sobre parâmetros hematológicos. Os dados gerados poderão, futuramente, servir como base para estudos com suplementação deste elemento em humanos e animais de produção. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema de análise fatorial, com 3 tratamentos principais e 2 tratamentos secundários, sendo cada tratamento experimental composto por 6 unidades experimentais. Foram utilizados 36 camundongos *Swiss* senis, divididos em 6 tratamentos. Os tratamentos principais avaliados foram: TC (tratamento controle – ração comercial); TI (cromo na forma de cloreto de cromo - 100 mg.kg⁻¹ ração); TO (cromo orgânico complexado com metionina – 100 mg.kg⁻¹ ração). Os valores de inclusão na dieta foram estabelecidos com o intuito de obter um consumo médio diário de 0,5 a 0,7 mg/dia de cromo (consumo médio diário de ração de 7 gramas). O experimento teve duração de 35 semanas, das quais 28 semanas foram utilizadas para diferenciação de peso entre indivíduos, que constituíram o tratamento secundário (obesidade), 1 semana para adaptação a dieta e 6 semanas de avaliação experimental. Ao final do período experimental, no 42º dia de suplementação, os camundongos foram insensibilizados utilizando anestesia inalatória com isoflurano, em seguida, realizada coleta de sangue por punção cardíaca para determinação dos parâmetros hematológicos. De acordo com os resultados observados, constatou-se que os valores médios de hematócrito, hemoglobina e eritrócito das amostras de sangue dos camundongos *Swiss* não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos e grupos experimentais ($p > 0,05$). Os parâmetros hematológicos para hematócrito, hemoglobina e eritrócito observados neste estudo encontram-se dentro dos valores de referência para a espécie. Conclui-se que a suplementação do cromo, independentemente da fonte ou da condição fisiológica do animal, não altera parâmetros hematológicos avaliados no presente trabalho.

Palavras-chave: mineral orgânico, complexo, diabetes, crômio

ABSTRACT

SUPPLEMENTATION OF CHROMIUM METHIONINE IN OBESE AND SWISS MICE: HEMATOLOGY

The present paper will provide information about the complexed chromium-methionine supplementation in swiss mice, senile and obese, in order to evaluate the effects on hematological parameters. The data generated, in future, will serve as a basis for studies about the supplementation of this element in humans and production animals. The experiment was installed in a completely randomized design, in a factorial analysis scheme, with 3 main and 2 secondary treatments, each one consisting of 6 experimental units. 36 senile *Swiss* mice were divided into six treatments. The main treatments evaluated were: CT (Control Treatment – commercial feed); TI (chromium in the form of chromium chloride - 100 mg.kg⁻¹ feed); TO (organic chromium complexed with methionine - 100 mg.kg⁻¹ feed). The inclusion values on the diet were established intending to obtain an average daily consumption of 0.5 to 0.7 mg /day of chromium (feed consumption of 7 grams, on average). The experiment lasted 35 weeks, of which 28 weeks were used for differentiation of weight among the individuals, which constituted the secondary treatment (obesity), 1 week for diet adaptation and 6 weeks for experimental evaluation. At the end of the experimental period, on the 42nd day of supplementation, the mice were desensitized using inhalation anesthesia with isoflurane, followed by blood collection using cardiac puncture to determine hematological parameters. According to the results, it was found that the average values of hematocrit, hemoglobin, erythrocyte blood samples of *Swiss* mice showed no significant difference between the treatments and experimental groups ($p > 0.05$). The hematological parameters for hematocrit, hemoglobin and erythrocyte observed in this study are within the reference values for the species. It is concluded that chromium supplementation, regardless of the source or of the physiological condition of the animal, hematological parameters assessed does not change in this work.

Key words: organic mineral, complex, diabetes, chromium.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO.....	14
2.1. Objetivos específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1. Características hematológicas de camundongos	15
3.2. <i>Diabetes mellitus</i>	16
3.2.1. Insulina.....	18
3.2.2. Cromo	19
3.2.3. Mecanismo de ação do cromo	22
3.2.4. Biodisponibilidade dos quelatos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Local de condução	25
4.2. Unidades experimentais e manejo	25
4.3. Delineamento experimental.....	26
4.4. Complexo de cromo e incorporação na dieta.....	27
4.5. Duração experimental	27
4.6. Coleta de sangue.....	27
4.7. Análise hematológica.....	28
4.8. Análise estatística	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do cronograma de execução do experimento com os principais marcos.26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros eritrocitários para camundongos (média e intervalo de referência) 15

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos de camundongos swiss normais ou obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo. 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cr³⁺ - Cromo

DM - Diabetes Mellitus

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

Fe Cr₂ O₄ – Cromita

g/dia – Grama por dia

g/dL – Gramas por decilitro

GLUT 4 – Transportador de glicose

kg – Quilogramas

mg – Miligrama

mg/dL – Miligramas por decilitro

OMS – Organização da Saúde

TC – Tratamento Controle

TI – Tratamento Cromo Inorgânico

TO – Tratamento Cromo Orgânico

VG – Volume Globular

1. INTRODUÇÃO

Desde as demonstrações iniciais dos efeitos antidiabéticos do cromo *in vivo*, há mais de 100 anos, avanços significativos foram feitos no entendimento das propriedades e dos mecanismos de ação dos compostos de cromo, como potencializador da ação da insulina. O mecanismo intracelular exato e /ou mediadores envolvidos nas ações do cromo ainda não estão totalmente elucidados, no entanto, tem-se aumentado o interesse no seu valor terapêutico, sendo já conhecidos alguns mecanismos de ação.

Estudos relacionados com a suplementação da dieta com cromo se faz em pertinentes e necessários, de modo a fornecer subsídios para a correta suplementação deste elemento. A importância se dá pela escassez de dados com relação à suplementação deste mineral e pela diversidade de resultados.

A suplementação de cromo na forma de sal inorgânico não é uma técnica eficiente, sendo aconselhável a utilização deste na forma de quelatos ou complexos, fato este justificado pela afinidade à fibra da dieta, das fontes inorgânicas e solúveis, o que interfere na sua absorção.

Atualmente, esse mineral tem sido utilizado como suplemento dietético em pacientes que necessitam de controle glicêmico. Evidências científicas apontam que a sua deficiência na dieta contribui para a intolerância à glicose e alterações relacionadas ao perfil lipídico. Isto se explica porque a função primária do cromo é a de potencializar os efeitos da insulina, com melhora da tolerância à glicose e, conseqüentemente, do metabolismo de carboidratos e lipídios (GOMES, 2005).

O presente trabalho tem por objetivo fornecer informações sobre a suplementação do cromo complexado com metionina em fêmeas de camundongos *Swiss*, senis e obesas, com o intuito de avaliar os efeitos sobre parâmetros hematológicos. Os dados gerados, futuramente, poderão servir como base para estudos com suplementação deste elemento em humanos e animais de produção.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da ação do cromo (complexo com metionina) em camundongos senis e obesos sobre parâmetros hematológicos.

2.1. Objetivos específicos

Especificadamente, propôs-se avaliar o complexo cromo/metionina, de alta solubilidade e estabilidade, sobre os parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina e eritrócito) de camundongos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Características hematológicas de camundongos

Existem vários fatores que influenciam os parâmetros hematológicos dos camundongos, tais como, local de coleta de amostra, idade do animal, linhagem, tipo de anestesia, métodos de contenção, temperatura do ambiente além do estresse causado no animal. O que dificulta o estabelecimento de valores de referência hematológico para camundongos (JAIN, 1993).

Neste sentido, os valores médios do intervalo de referência para eritrócitos, hemoglobina e hematócrito para várias linhagens de camundongos que estão disponíveis na literatura, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros eritrocitários para camundongos (média e intervalo de referência).

	Camundongos		
	Hematócrito	Hemoglobina	Eritrócitos
	(%)	(g/dL)	(mg/dL)
Intervalo de Referência	32,8 a 48,0	10,1 a 16,1	6,5 a 10,11
Média	40,4	13,1	8,3

Modificada de Jain NC. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. pp.54-71.

O tamanho dos eritrócitos dos camundongos saudáveis varia em um intervalo entre 5 e 7 μm de diâmetro, sendo marcante a presença de anisocitose. É comum encontrar policromasia, sendo que cerca de 1 a 18% da população de eritrócitos são de células policromatófilicas, estando provavelmente relacionado com a meia-vida relativamente curta dos eritrócitos sendo de 40 a 50 dias para os camundongos. A concentração de eritrócitos em fêmeas tende a ser menor do que em machos. O Volume Globular normal é de 35 a 45 %. Os corpúsculos de Howell-Jolly também são encontrados em pequenas quantidades de eritrócitos em camundongos normais.

A concentração de hemoglobina geralmente varia entre 13,4 e 15,8 g/dL, tendo uma média de 14,6 g/dL.

3.2. Diabetes *mellitus*

A palavra “*diabetes*” vem do grego *diabeneim* e significa “fluir através”, enquanto o termo “*mellitus*”, do latim, significa “doce”. Existem relatos da diabetes mellitus há mais de 2000 anos atrás descrevendo sintomas detalhados desta doença. (KAHN, 1994).

Diabetes mellitus (DM) é considerada uma das principais doenças crônicas que afeta o homem contemporâneo, acometendo populações de países em todos os estágios de desenvolvimento econômico e social (ORTIZ, 2007). Considerada a doença do século XXI, a diabetes é a 4ª causa principal de mortes nos países desenvolvidos e é considerada epidemia global.

Uma epidemia de *diabetes mellitus* está por vir, atualmente estima-se que a população mundial com diabetes é da ordem de 382 milhões de pessoas e que deverá atingir 471 milhões em 2035, sendo que cerca de 80% destes indivíduos com diabetes vivem em países desenvolvidos, onde a epidemia tem maior intensidade, fato este que vem associado ao sedentarismo e hábitos não saudáveis, causando resistência insulínica, que está envolvida na patogênese do diabetes (MALERBI e FRANCO, 1992).

No Brasil, estimou-se no final da década de 1980, uma prevalência de DM na população adulta em 7,6% (MALERBI, FRANCO, 1992). Os dados de 2010 apontam taxas mais elevadas, em torno de 15% em Ribeirão Preto, no estado de São Paulo, por exemplo (GIMENO et al., 2010).

Estudos realizados em seis capitais brasileiras, com servidores de universidades públicas, na faixa etária de 35 a 74 anos, encontrou uma prevalência de cerca de 20%, onde aproximadamente metade dos casos não tinham diagnóstico prévio (DINIZ et al., 2014). Em 2014, estimou-se que no Brasil existiam 11,9 milhões de pessoas, com faixa etária entre 20 a 79 anos, com diabetes, podendo alcançar 19,2 milhões até 2035 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2014).

O *diabetes mellitus*, é a desordem endócrina mais comum (DEVLIN 2006, AHMED et al, 2007). É caracterizada por hiperglicemia, em jejum, devido a uma

deficiência absoluta/relativa e/ou resistência à insulina (AHMED et al, 2007). Os sintomas característicos da patologia são produção excessiva de urina (poliúria), sede excessiva e ingestão aumentada de fluidos (polidipsia), visão borrosa, perda de peso inexplicada e letargia. É provável que estes sintomas estejam ausentes se o açúcar no sangue for apenas moderadamente elevado (DEVLIN 2006, LIONEL 2007).

O número de diabéticos está cada vez maior em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da maior urbanização, do aumento da prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevivência de pacientes com DM. O estudo mostra a importância de quantificar o predomínio atual de DM e relata a importância de estimar o aumento do número de pessoas com diabetes no futuro, pois possibilita planejar os recursos de diagnóstico e tratamento destas populações (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

A obesidade é o principal fator de risco para o desenvolvimento da resistência à insulina, que está envolvida na patogênese do Diabetes (CHOI e KIM, 2010). Em situações de excesso de peso, a utilização periférica da insulina torna-se reduzida, alterando a regulação da homeostase da glicose. Assim, a perda de peso é um objetivo terapêutico importante para indivíduos diabéticos (ADA, 2011).

O conceito de sensibilidade à insulina foi introduzido por Sir Harold Himsworth, em 1939, ao estudar a resposta de pacientes diabéticos ao estímulo glicêmico e à insulina (HIMSWORTH e KERR, 1939). Pode-se definir resistência à insulina como uma perturbação das vias de sinalização, mediadas pela insulina em que as concentrações normais do hormônio produzem uma resposta biológica subnormal, ocorrendo então um aumento da função das células beta pancreáticas para compensar a resistência à insulina, resultando em níveis sanguíneos elevados de insulina e mais tarde de glicose (LAU, 2008; CARVALHEIRO e SAAD, 2006).

Não é caracterizada como uma doença, mais sim uma anomalia fisiopatológica que pode ter inúmeras consequências e está ligada a diversas situações fisiológicas como puberdade, gravidez, menopausa, uso de corticosteroides, obesidade, diabetes mellitus tipo II, doenças cardiovasculares, dislipidemias e síndrome metabólica. (KELLY, 2000).

Várias complicações podem ocorrer como, disfunção e falha renal, anormalidades cardíacas, retinopatia diabética, neuropatia, aterosclerose. A etiologia da diabetes e as suas complicações continuam por clarificar. Contudo, vários fatores

como a idade, obesidade e dano oxidativo têm sido implicados. Devido à prevalência da diabetes, estudos multidisciplinares que se destinam a prevenir e a tratar diabetes é uma das propriedades da investigação em todo o mundo (FLORES et al., 2011).

Inicialmente conhecida como diabetes “juvenil”, a diabetes tipo I ocorre devido a destruição das células β por um processo auto-imune (tipo A) ou por causa desconhecida (forma idiopática ou tipo B). Na forma auto-imune que é a mais comum, ocorre um processo de insulite e a presença de auto-anticorpos (antidescarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina), enquanto a forma idiopática caracteriza-se pela ausência de insulite e de auto-anticorpos. O fato de haver ausência absoluta de insulina na diabetes tipo I, resulta em manifestações clínicas evidentes, possibilitando rápido diagnóstico quando comparada com a diabetes tipo II (GROSS *et al.*, 2002).

A diabetes tipo II é a mais comum, correspondendo a 90% dos casos. Este tipo ocorre devido a distúrbios na ação e secreção da insulina. Anteriormente conhecida como diabetes da maturidade, por ser muito frequente em indivíduos acima de 40 anos, hoje está denominação caiu em desuso, devido à alta incidência de diabetes tipo II em indivíduos jovens. O diabetes tipo II é uma doença multifatorial, sendo resultado de uma combinação de genes “diabetogenes” e de fatores ambientais (KAHN, *et al.*, 1994).

3.2.1. Insulina

A insulina é um hormônio capaz de induzir resposta anabólica no fígado, tecidos musculares e tecido adiposo, sendo importante para a homeostase de lipídios e carboidratos e, conseqüentemente, para o funcionamento do organismo.

Além disso, a insulina regula vários processos fisiológicos em diferentes tipos celulares e tecidos como fluxo de íons, captação de aminoácidos, expressão gênica, proliferação celular, apoptose, rearranjo do citoesqueleto e regulação de enzimas celulares. (MASSEEN e OWENS, 1997; MYERS e WHITE, 1996.)

Este hormônio é essencial para a manutenção da homeostase glicêmica, do crescimento e diferenciação celular, sendo secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento das concentrações circulantes de glicose (NOLAN et al., 2011; WILLIAMS et al 2002).

A insulina é mais conhecida por seu papel na regulação sanguínea, pois ela suprime a neoglicogênese hepática e promove a síntese e armazenamento de glicogênio no fígado e músculos (WILLIAMS et al 2002). Além disso, ela estimula a lipogênese no fígado e adipócitos e aumenta a síntese proteica (CAVALHEIRA; ZECHUIN; SAAD, 2002).

Sendo assim, a insulina tem como função participar do metabolismo energético, permitir a deposição de tecidos nos músculos, atuar no metabolismo das gorduras e regular a utilização do colesterol. Caso a glicose não seja utilizada pelas células do organismo devido à baixa atividade da insulina, esta é convertida em gordura. Caso os aminoácidos não consigam entrar no interior das células, os músculos não poderão ser formados (ANDERSON, 1988).

3.2.2. Cromo

O elemento cromo mineral foi descoberto por Vaquelin em 1797, que o denominou desta maneira porque, quando tratado com carvão a temperaturas elevadas, deu origem a um produto intensamente colorido (BARCELOUX, 1999).

O cromo é encontrado na natureza como Cromita (FeCr_2O_4), um óxido duplo de ferro e cromo, de coloração amarelo ocre. É um mineral que ocorre nas valências de -2 a $+6$, sendo as mais comuns $+2$ (Cr^{2+}), $+3$ (Cr^{3+}) e $+6$ (Cr^{6+}). Sua forma mais comum presente nos alimentos é o Cr^{3+} (LOURENÇO, 2003; MITCHELL, 1978).

O cromo é um mineral-traço essencial que participa ativamente do metabolismo de carboidratos, principalmente co-atuando com a insulina, melhorando a tolerância à glicose (MERTZ, 1969). Ele age estimulando a sensibilidade à insulina, além de influenciar no metabolismo proteico, pois promove um aumento no estímulo da captação de aminoácidos e, conseqüentemente, atua no aumento da síntese proteica (CLARKSON, 1997).

A ação do cromo não se resume apenas à participação coadjuvante com a insulina. Apesar de não ter sido identificada nenhuma enzima depende do cromo, este mineral parece inibir a enzima hepática hidroximetilglutaril-CoA-redutase, assim diminui a concentração plasmática de colesterol (ZIMA, et al, 1998). Também é atribuído ao cromo um efeito lipolítico que ao somar com seus possíveis efeitos anabólicos, estimula principalmente o público esportista ao uso do cromo como

suplemento na dieta, para obtenção de efeitos desejáveis sobre a composição corporal (KREIDER, 1999).

Em humanos, o cromo inibe indiretamente as enzimas de síntese de ácido graxo, responsáveis pela lipogênese, modificando o armazenamento de triglicerídeos mediados pela insulina, resultando em menor deposição de gordura (KAATS et al., 1998), tendo também um efeito positivo sobre a utilização e incorporação de aminoácidos e na síntese de proteínas, melhorando a transcrição do RNA (OKADA et al., 1984).

Em muitos trabalhos relacionados à deficiência deste elemento, a ação da insulina é deprimida a ponto de alterar o metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídios (MOWAT, 1997).

A suplementação de cromo tem sido relatada com efeitos positivos no perfil lipídico. Pacientes com resistência à insulina frequentemente sofrem de dislipidemias. A suplementação de cromo pode ter efeito em ambas as situações, já que interfere na ação da insulina. Além desse efeito, a potencialização da ação da insulina estimula a absorção de glicose e aminoácidos, o que resulta em efeito anabólico, com conseqüente aumento de massa magra e diminuição de massa gorda (PASMAN, 1997)

Cefalu e Hu (2004) observaram que o cromo inibe a fosfatase fosfotirosina, que separa o fosfato do receptor de insulina, promovendo uma diminuição da sensibilidade à insulina. Além disso, tem sido sugerido que o cromo aumenta a ligação da insulina ao número de receptores insulínicos e, conseqüentemente, a sensibilidade das células beta pancreáticas.

A utilização somente da glicose ou da insulina para determinar o efeito do cromo não são eficientes, porque a concentração de ambos é regulada de forma harmônica. As relações molares insulina/glicose e da taxa de desaparecimento insulina/glicose sugerem aumento de sensibilidade do tecido à insulina (HAYIRLI et al., 2001).

A maior parte do cromo ingerido através dos alimentos está na forma trivalente. A melhor fonte de cromo é o levedo de cerveja, no entanto, outras fontes incluem: carnes, fígado bovino, ovos, frango, ostras, trigo, pimentão, brócolis, suco de uva, batata, alho, maçã, banana, espinafre, pimenta, manteiga e melado (ANGUIANO, 2007).

O cromo está presente em muitos suplementos nutricionais e plurimineral e encontra-se disponível na forma de sais: cloreto, picolinato, nicotinato, citrato e pidolato. O cloreto de cromo é absorvido em menor quantidade (0,4%) e o picolinato de cromo possui sua absorção aumentada (0,7-5,2%) (ANGUIANO, 2007).

Esse mineral tem sido utilizado como suplemento dietético em pacientes que necessitam de controle glicêmico. Evidências científicas apontam que a sua deficiência na dieta contribui para a intolerância à glicose e alterações relacionadas ao perfil lipídico. Isto se explica porque a função primária do cromo é a de potencializar os efeitos da insulina, com melhora da tolerância à glicose e, conseqüentemente, do metabolismo de carboidratos e lipídios (GOMES, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) não estabeleceu um valor seguro para a ingestão de cromo, mas relata que dosagens de 125 a 200 µg/dia além do que é ingerido através da alimentação habitual, pode favorecer o controle glicêmico e melhorar o perfil lipídico (OMS, 1998). Dessa forma, a dosagem máxima, dentro de um limite de segurança, é de até 250 µg/dia, o que representa, por exemplo, cerca de dez vezes a dose recomendada para mulheres.

Em dietas normais, o consumo médio diário de uma pessoa é de 50 a 80 mg de cromo, quantidade insuficiente para o funcionamento normal do organismo. A Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos recomenda uma ingestão diária de 100 a 200 mg de cromo para o ser humano (JAMARILLLO, 2007).

As recomendações variam de acordo com a faixa etária - homens adultos: 19 a 50 anos: 35 mg; maiores de 50 anos: 30 mg; mulheres adultas: 19 a 50 anos: 35 mg; maiores de 50 anos: 20 mg (ANGUIANO, 2007). Mesmo assim, a Agência nacional de Vigilância Sanitária estabelece como nível seguro o limite máximo de 1000 µg/dia de cromo para adulto (BRASIL, 1998).

Nesse sentido, acredita-se que o suplemento de cromo é essencial para os seres humanos e animais, especialmente para os diabéticos, uma vez que esses pacientes apresentam metabolismo alterado desse nutriente, necessitando de maiores quantidades deste suplemento nutritivo, devido a sua maior assimilação. Os diabéticos absorvem mais cromo que os não diabéticos por sofrer maiores perdas deste elemento pela urina (JARAMILLO, 2007).

3.2.3. Mecanismo de ação do cromo

O mecanismo de participação do cromo na ação da insulina começou a ser esclarecido em meados dos anos 1980 por meio do isolamento e da caracterização de um oligopeptídeo ligador de cromo, que inicialmente foi denominado substância ligadora de cromo de baixo peso molecular (low-molecular weight chromium-binding substance - LMWCr) (VINCENT, 2000; YAMAMOTO et al, 1989.), sendo conhecida por cromodulina, pelo fato da semelhança em estrutura e função com a calmodulina. Essa estrutura é formada por quatro íons de Cr^{+3} ligado a resíduos de glicina, cisteína, glutamato e aspartato e foi isolado em tecidos de várias espécies de mamíferos (GOMES et al., 2005).

Este mineral participa ativamente do metabolismo de carboidratos, principalmente coatuando com a insulina de modo a potencializar a ação da mesma, melhorando a tolerância à glicose, levando então a uma absorção de glicose mais eficiente (MITCHELL et al,1978; MARANGON e FERNANDES, 2005). Segundo achados pelos quais o cromo age, se propôs que esse mineral aumente a fluidez da membrana celular, amplificando a sinalização celular, de modo a facilitar a ligação da insulina com o seu receptor (EVANS e BOWMAN, 2002; VINCENT, 1999).

Somando ao fato de que aumenta o número de receptores de insulina e a sensibilidade das células β do pâncreas, recentemente, o cromo foi caracterizado como componente do mecanismo de amplificação da sinalização intracelular de insulina, responsável pelo estímulo da translocação de GLUT-4, ou seja, um fator colaborador do aumento da sensibilidade de receptores insulínicos na membrana plasmática (VINCENT, 1999).

Quando ocorre um aumento na glicemia, a insulina é rapidamente secretada para a circulação e liga-se na subunidade alfa de seu receptor, localizada na face externa da membrana plasmática. Esta alteração desencadeia uma série de reações de fosforilação em cascata com o objetivo de estimular translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) para a membrana plasmática (CAVALHEIRA, et al., 2002).

Após a insulina ligar-se ao receptor da membrana plasmática, ocorre um estímulo ao movimento do cromo sanguíneo para as células insulino-dependentes, resultando na ligação da apocromodulina ao cromo. A cromodulina então se liga ao receptor de insulina, ativando a tirosina quinase. No entanto, o estímulo à ação da

insulina é dependente do conteúdo de cromo na cromodulina (YAMAMOTO, et al., 1989).

O modelo proposto explica a ação da cromodulina como parte do sistema de auto-amplificação da sinalização da insulina, sugerindo que a cromodulina seja estocada na forma apocromodulina no citosol e núcleo das células sensíveis à insulina.

Aumento da insulina circulante provoca duas situações concomitantes: aumenta a mobilização do cromo para células-alvo, mediada principalmente pela transferrina; e provoca mobilização de receptores de transferrina a partir das vesículas intracelulares para que possam se fundirem com a membrana. Portanto, a transferrina saturada com cromo liga-se a seus respectivos receptores, iniciando o complexo denominado por endocitose (Vincent, 2000; SUN et al., 2005).

No espaço intravesicular, o pH ácido promove a digestão do complexo e libera o cromo para o citosol. Quatro íons de Cr^{3+} juntam-se à apocromodulina, assim, tornando-se ativa na forma de cromodulina, que por sua vez liga-se ao sítio ativo no receptor da insulina, completando a ativação do mesmo e amplificando o sinal da insulina (VINCENT, 2000; SUN et al., 2005).

3.2.4. Biodisponibilidade dos quelatos

Estudos com minerais orgânicos ou quelatados vem sendo desenvolvidos com a finalidade de garantir a absorção do mineral no trato gastrointestinal, minimizando o processo de competição iônica, normalmente determinada pela presença de maior concentração dos íons minerais. Só serão denominados quelatos os compostos formados por íons metálicos sequestrados por aminoácidos, peptídeos ou complexos polissacarídeos que proporcionam a esses íons maior disponibilidade biológica, alta estabilidade e solubilidade (MORAES, 2001).

Deve-se salientar, porém, que os minerais na forma quelada nem sempre apresentam melhor biodisponibilidade que a forma de sal simples, no caso do cromo levedura e do cloreto de cromo, do ferro EDTA e do sulfato de ferro. O efeito do quelato vai depender basicamente das características do agente quelante, sendo de suma importância sua estabilidade no trato gastrintestinal e a solubilidade em água ou lipídeos (SHAH, 1981).

O requerimento mineral pode ser atendido pelos minerais presentes nos alimentos ou pela adição de minerais à dieta, na forma de sal simples ou complexado. A simples ingestão destes não implica na consequente absorção por inúmeros fatores. Sabe-se que os minerais na forma de sais solúveis são mais biodisponíveis que os presentes nos alimentos. Os elementos minerais na forma de sulfatos são mais absorvidos que óxidos e carbonatos. Um fator de suma importância com relação à biodisponibilidade de minerais inorgânicos diz respeito à solubilidade, ou seja, quanto maior a solubilidade em água, maior será a biodisponibilidade (MELLO, 1998).

Os minerais metálicos na forma de sal simples, para serem absorvidos no intestino delgado, devem, durante o trânsito no trato gastrointestinal, dissociarem-se liberando íons metálicos (cátions) (MELLO, 1998).

De acordo com o mesmo autor, o simples fato de se dissociarem não garante a absorção, pois o processo de passagem pela membrana celular, no intestino delgado, é dependente de proteínas transportadoras, também denominadas ligantes. O complexo formado entre a molécula transportadora e o íon metálico deverá apresentar carga total neutra, caso contrário, não ocorrerá absorção. Os diversos microminerais competem entre si pelas proteínas transportadoras, sendo que o excesso de certos elementos minerais poderá reduzir a biodisponibilidade de um ou mais elementos.

A absorção de minerais como zinco, cálcio e cromo no intestino delgado pode ser afetada por fatores como a presença de agentes infecciosos ou enteropatias e fatores relacionados ao hábito alimentar como a presença de óleo mineral, laxativos, consumo de grande quantidade de fibra, fitatos, oxalatos, micotoxinas e presença de elementos que complexam outros minerais (ERDMAN, 1983).

Após a absorção, o cromo pode ser estocado em vários tecidos do organismo, sem possuir um local específico necessariamente, mas totalizando em média um pool de 4 a 6 mg (GIBSON, 1990). A maior quantidade de cromo parece estar distribuída no fígado, rins, baço e epidídimo (HOPKINS, 1965).

Chen et al. (1973) testaram a influência de agentes quelantes (oxalato, fitato, citrato e EDTA) na absorção intestinal do cromo em ratos. Os autores observaram redução na absorção *in vitro* e *in vivo*, quando foi incluído o fitato, e aumento na absorção, quando foi utilizado o oxalato.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de condução

A condução experimental foi realizada no Departamento de Tecnologia, Laboratório de Biogeoquímica, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal e, análises laboratoriais, no laboratório de PD&I alocado na Universidade Brasil, Campus de Descalvado-SP.

4.2. Unidades experimentais e manejo

Como unidades experimentais foram utilizados camundongos *Swiss*, fêmeas, linhagem isogênica, obtidos em biotério certificado. Quarenta e seis fêmeas, com idade média de 4 semanas, foram separadas aleatoriamente em grupos de 23 animais em gaiolas nas medidas de 49x34 cm, com malha de 0,5cm, contendo serragem de madeira no fundo. Estes animais permaneceram nestas gaiolas por 26 semanas.

Os grupos experimentais e controles permaneceram sob idênticas condições ambientais, em lugar arejado e com temperatura ambiente equivalente à média local para a época do ano (25 °C), no escuro e à luz artificial durante ciclos alternados de 12 horas, alimentados com água filtrada e ração comercial (Probiotério MP77), *ad libitum*, disponibilizadas nos comedouros e bebedouros das gaiolas.

Ao final do período de 28 semanas (32 semanas de idade), os animais foram separados em grupos de 2 indivíduos, transferidos para gaiolas nas medidas de 30x20 e identificados individualmente através da pintura de parte da cauda com cores diferentes, com tinta atóxica e resistente a água.

Foi realizada a pesagem e a identificação de animais com peso normal e obesos. Foram considerados os animais como obesos quando o peso do animal era superior a 60 gramas e como peso normal os animais entre 45 e 50 gramas. Dos 46 animais iniciais, foram selecionados 36, descartando os que apresentaram peso muito superior ou inferior à média de cada grupo. Os animais foram submetidos à adaptação ao novo alojamento e a dieta experimental, ao final foram pesados novamente, tendo iniciado o período experimental.

O cronograma do experimento executado, com os principais marcos, pode ser observado na Figura 1.

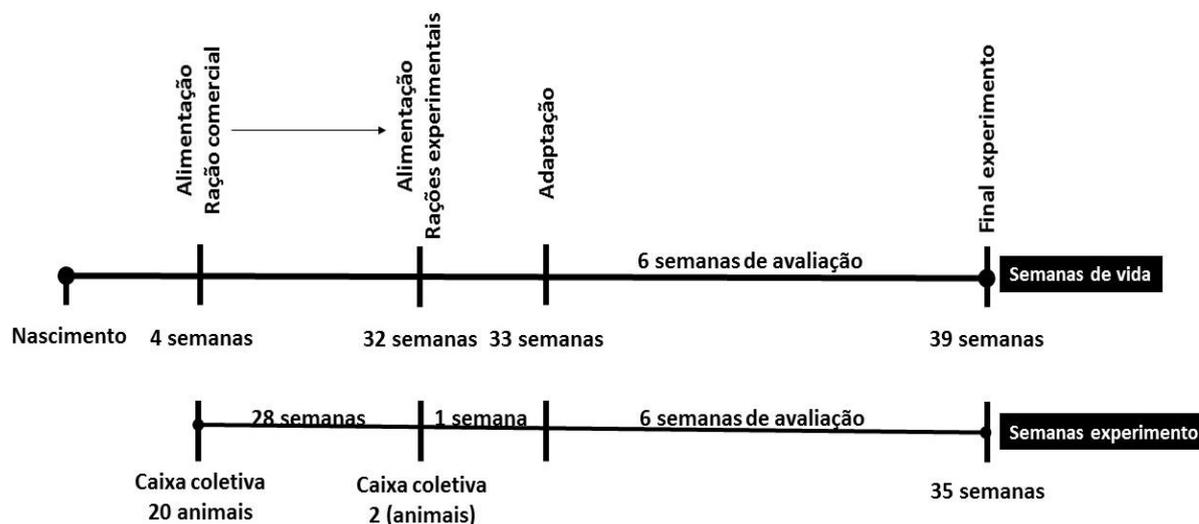


Figura 1 - Ilustração do cronograma de execução do experimento com os principais marcos. Na linha superior, o tempo demonstra a idade dos animais e na linha inferior os tempos envolvidos em cada fase experimental.

4.3. Delineamento experimental

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema de análise fatorial, com 3 tratamentos principais e 2 tratamentos secundários, sendo cada tratamento composto por 6 unidades experimentais, distribuídos em 3 gaiolas.

Os tratamentos principais avaliados foram: TC (tratamento controle – ração comercial); TI (cromo na forma de cloreto cromo - 100 mg.kg^{-1} ração); TO (cromo orgânico complexado com metionina – 100 mg.kg^{-1} ração). Os valores de inclusão na dieta foram estabelecidos com o intuito de obter um consumo médio diário de 0,5 a 0,7 mg/dia de cromo, (consumo médio de 7 g/dia de ração por animal).

4.4. Complexo de cromo e incorporação na dieta

As fontes de cromo avaliadas foram desenvolvidas na empresa NewAgri, sediada no município de Descalvado/SP através de parceria de inovação tecnológica.

A ração comercial para camundongos (Probiotério MP77) foi moída, peneirada e pesada, assim como as fontes de cromo para os tratamentos. Desta forma, a ração moída, água (60% do peso de ração) e a fonte de cromo foram transferidas para misturador tipo *ribbon blender* (capacidade para 15 kg), sendo o material homogeneizado por 20 minutos. Posteriormente, as rações TC, TI e TO foram peletizadas, sem aquecimento, com características similares ao pellet inicial. Para facilitar a identificação das rações foi utilizado corante verde em diferentes quantidades. A quantidade de ração preparada foi equivalente ao consumo de três semanas, sendo acondicionada em sacos plásticos hermeticamente fechados.

4.5. Duração experimental

O experimento teve duração de 35 semanas, dos quais 28 semanas foram utilizadas para diferenciação de peso entre indivíduos, que constituíram o tratamento secundário – obesidade, 1 semana para adaptação a nova gaiola e dieta e, 6 semanas, de avaliação experimental.

4.6. Coleta de sangue

Ao final do período experimental, no 42º dia de suplementação, os camundongos foram insensibilizados utilizando anestesia inalatória com isoflurano, em seguida, foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca para determinação dos parâmetros hematológicos, utilizando seringas de 1 mL heparinizadas.

No procedimento de anestesia foi utilizado o isoflurano, adicionado em algodão estéril e alocado na câmara de inalação de forma isolada, evitando o contato direto com o produto. Neste método, a quantidade precisa de anestésico oferecida ao animal não é conhecida e o plano anestésico do animal deve ser observado através da câmara de inalação. Se houver reflexo presente, ou seja, se o animal responder a estímulos, a anestesia não está no plano anestésico adequado

para a intervenção cirúrgica. Confirmado que o plano anestésico foi efetivado, foi realizado a exsanguinação por punção cardíaca, imediatamente após a insensibilização e antes do animal restabelecer a consciência. A confirmação de morte do animal foi realizada pela ausência de movimento respiratório (apneia) e ausência de batimentos cardíacos (assistolia).

4.7. Análise hematológica

Utilizando-se um analisador automatizado hematológico (contador hematológico veterinário) foram avaliados os seguintes parâmetros: hemoglobina, hematócrito, eritrócito.

4.8. Análise estatística

Os resultados obtidos foram representados pela média e a comparação entre elas realizada por teste SNK e análise de variância (ANOVA). Foi considerado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os valores médios de hematócrito, hemoglobina e eritrócito das amostras de sangue dos camundongos *Swiss*, não houve diferença significativa entre os tratamentos e, grupos experimentais ($p>0,05$) (Tabela 2).

Os parâmetros hematológicos para hematócrito, hemoglobina e eritrócito observados neste estudo encontram-se dentro dos valores de referência para a espécie. Neste sentido o cromo é um elemento seguro para a espécie estudada, nas condições do estudo; Vale ressaltar que as respostas hematológicas não foram alteradas entre os tratamentos aplicados.

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss* senis, normais ou obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo.

Grupo experimental	Suplementação			Médias
	TC	TI	TO	
Hematócrito (%)				
Peso Normal	47,86	49,53	47,46	48,28
Obesos	50,66	52,26	49,06	50,66
Médias	49,26	50,89	48,26	
Hemoglobina (g/dL)				
Peso Normal	14,17	15,36	15,00	14,84
Obesos	15,57	15,97	15,26	15,60
Médias	14,87	15,66	15,13	
Eritrócitos (mg/dL)				
Peso Normal	8,33	9,73	10,23	9,43
Obesos	10,40	9,67	9,14	9,73
Médias	9,36	9,70	9,68	

TC=ração controle; TI= ração com adição de cromo inorgânico; TO= ração com adição de cromo orgânico.

6. CONCLUSÃO

A suplementação de cromo, independente da forma, orgânica ou inorgânica, não altera os valores hematológicos para hematócrito, hemoglobina e eritrócito de camundongos *Swiss senis*, nas condições experimentais deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, Standart of medical care in Diabetes 2011. *Diabetes Care* 2011; 34 S10-S61.

AHMED, N.; DAWSON, M.; SMITH, C. and Wood, E. (2007). *Biology of Disease*. First Edition. Taylor & Francis.

ANDERSON, R. A. 1988. Chromium, History and nutritional importance. *Biological Trace Element Research*, Totowa, v. 32, Nº 3. pp: 409-421.

ANGUIANO A, GASCÓN M, CRUZ A. Evidencias del efecto del cromo en personas con diabetes: revisión sistemática. *Rev Biomed* 2007; 18(2):117-126.

BARCELOUX D.G. 1999. Chromium *Clinical Toxicology*, Vol.37; pp: 173–194.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Normas para Níveis de Dosagens de Vitaminas e Minerais em Medicamentos. Portaria nº 40 de 13 de janeiro de 1998. Disponível em:

http://WWW.anvisa.gov.br/legis/portaria/40_98.htm. Acesso em 27 fevereiro 2016

CAVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização de insulina *Arquivos Brasileiros de endocrinologia e metabologia São Paulo*, v. 46, n. 4, p. 419 - 425, 2002.

CARVALHEIRA, JOSÉ B.C. AND SAAD, MARIO J.A. Doenças associadas à resistência à insulina/hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*, Abr 2006, vol.50, no.2, p.360-367. ISSN 0004-2730

CEFALU WT, HU FB. Role of chromium in human health and Diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(11):2741-51.

CHEN, N. S. C.; TASI, A.; DYER, I. A. Effect of chelating agents on chromium absorption in rats. *J Nutr, Bethesda*, n.103, p.1182-1186, 1973.

CHOI, K.; KIM, Y.B. Molecular mechanism of resistance in obesity and type 2 diabetes. *The Korean Journal of internal Medicine*, Seoul, v25 n. 2, p. 119-129, 2010.

CLARKSON PM. Effects of exercise on chromium levels: Is supplementation required? *Sports Med* 1997; 23:341-9.

DEVLIN, T. (2006). *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. Sixth Edition. Wiley-Liss diabetes epidemic. *Nature*, v. 414, p. 782 – 787, 2001.

DINIZ MFS ET AL, SCHMIDT MI, HOFFMANN JF. High prevalence of diabetes and intermediate hyperglycemia – The Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Diabetol Metab Syndr*. 2014 nov; 6(123):1-9.

ERDMAN, J. W. Factors that limit or enhance bioavailability of minerals from food. *Nutr and the M.*, v.9, n.2, p 1-2, 1983.

EVANS, G.; BOWMAN, T. D. Chromium picolinate increases membrane fluidity and rate of insulin internalization. *J. Inorg. Biochem.* 6:243-250. 2002.

FLORES CR, et al. Trace elements status in diabetes mellitus type 2: Possible role of interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 91: 333-341

GIBSON RS. *Principles of nutrition assessment*. New York: Oxford University Press 1990. Hopkins LL Jr. Distribution in the ratio of physiological amounts of injected Cr (III) with time. *Am J Physiol* 1965; 209:731-5.

GIMENO, L., R. NIETO, R. M. TRIGO, S. VICENTE-SERRANO, AND J. I. LÓPEZ-MORENO (2010), Where does the Iberian Peninsula moisture come from? An answer based on a Lagrangian approach, *J. Hydrometeorol.*, 11, 421–436.

GOMES M, ROGERO M, TIRAGEGUI M. *Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico*. In: *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 2005; 11(5): 262-266.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICHEL, A. J.; AZEVEDO, M. J. Diabetes Mellito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v. 46 (1), p. 16 – 26, 2002.

HAYIRLI, A. et al. Effects of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cow. J Dairy Sci, Champaign, v.84, p.1218-1230, 2001.

HIMSWORTH HP, KERR RB. Insulin-sensitive and insulin-insensitive types of diabetes mellitus. Clin Sci. 1939; 4:119-52.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas [Internet]. 6a ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2014. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas>>. Acesso em: 19/01/2014.

JAIN NC. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. pp.54-71.

JARAMILLO R. Importância del cromo em el organismo de personas com diabetes tipo II. Revista Tecnociencia Universitaria Bolivia 2007; 5(5): 5.

KAATS, G.R.; BLUM, K.; PULLIN, D.; KEITH, S.C.; WOOD, R. A randomized, double-masked, placebo-controlled study of the effects of chromium picolinate supplementation on body composition: a replication and extension of a previous study. Current Therapeutic Research, v.59, p.379-388, 1998

KAHN, C. R. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. Diabetes, v. 43, p.1066 – 1084, 1994

KELLY G. S. Insulin resistance: lifestyle and nutritional interventions. Altern Med Rev. 2000; 5(2):109-32.

KREIDER RB. Dietary supplements and the promotion of muscle growth with resistance exercise. Sports Med 1999; 27:97-110

LAU F. C.; BAGCHI M. ; SEN C. K. ; Nutrigenomic basis of beneficial effects of chromium on obesity and diabetes. Mol Cell Biochem. 2008; 317(1-2):1-10.

LIONEL, O. P. Metabolic syndrome. *Circulation*, 115: 32-35, 2007.

LOURENÇO, L. M. Estudo espectrofotométrico do sistema crômio (III) / azoteto e seu aproveitamento analítico. Ribeirão Preto, 2003. 113 F. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Química – Universidade de São Paulo). 2003

MAASSEN, J.A.; OUWENS, D. M. Mechanism of Insulin Action. *Molecular Pathogenesis of Diabetes Mellitus*, v.22 , p. 201-221, 1997.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J.. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. *Diabetes care*, Alexandria, v.15, n. 11, p.1509-1516, 1992.

MARANGON, A. F. C.; FERNANDES, L. G. M. O uso do picolinato de cromo como coadjuvante no tratamento da diabetes mellitus. *Universidade ciências da saúde*, VOL.3 N.2, P. 253-260, 2005.

MELLO C. A. O que há de novo na mineralização. *Leite Brasil*, São Paulo, v.1 , n.6, p.8-14, 1998.

MERTZ W. Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol Rev* 1969; 49:163-239.

MERTZ W. Chromium in human nutrition: a Review. *J Nutr* 1993; 123:626-33.

MERTZ, W.; SCHAWARZ, K. A glucose tolerance factor and its differentiation from factor 3. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , New York, v72, n.2, p. 515 – 518, 1957.

MITCHELL, H. S.; RYNBERGEN, H. J., ANDERSON, L.; DIBBLE, M. V.. *Nutrição*. 16º. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1978. P. 60-71.

MORAES, S.da S. Importância da suplementação mineral para bovinos de corte. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2001. 26 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 114).

MORAES, S. S. Novos microelementos minerais quelatados na nutrição de bovinos. Disponível em: http://www.enpge.embrapa.br/publicacoes/doc/doc_pdf/DOC119.pdf
Acesso em 15 jan, 2008.

MORAES S. da S, FREITAS ICM DE, GIMENO SGA ET AL. Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil 2006: Projeto OBEDIARP. Cad Saúde Pública. 2010; 26(5):929-41.

MOWAT, D. N. Organic chromium, Chromium Books, 258p., 1997.

MYERS, M.G. ,JR AND WHITE, M.F. (1996) Insulin signal transduction and the IRS proteins. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 36, 615-658.

NOLAN, C.J.; DAMM, P.; PRENTTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. The Lancet, Boston, v.378, n.9786, p. 169-181, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Cromo. In: Elementos traço na nutrição e saúde humanas. São Paulo: Rocca, 1998;135-8

OKADA, S.; TSUKADA, H.; OHBA, H. Enhancement of nucleolar RNA synthesis by chromium (III) in regenerating rat liver. Journal of Inorganic Biochemistry, v.21, p.113-124, 1984

ORTIZ MCA, ZANETTI ML. Levantamento dos fatores de risco para diabetes *mellitus* tipo 2 em uma instituição de ensino superior. Rev Latino-am Enfermagem 2007; 9(3):58-63

PASMAM, W. J., WESTERTERP-PLANTENGA, M. S., SARIS, W. H. M. 1997. The effectiveness of long-term supplementations of carbohydrate, chromium, fibre and caffeine on weight maintenance, In International Journal of obesity, 21 pp 1143-1151.

SHAH, B. G.; Chelating agents and bioavailability of minerals. Nutr Res , Tarrytown, v.1, n.6, p.617-622, 1981.

SUN Y, RAMIREZ J, WOSKI AS, VICENT JB. The binding of trivalent chromium to low-molecular-weight chromium binding substance (LMW Cr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMW Cr. J Biol Inorg Chem 2005 :5: 129-36

VINCENT, J. B. Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium - binding substance. *J Am Coll Nutr* 1999;18:6-12.

VINCENT JB. The biochemistry of chromium. *J Nutr* 2000; 130:715-8

WILLIAMS, M.; LIPPINCOTT, T.; WILKINS, B.. Atlas of Diabetes. Ed. Jay S. Skyler;p. 248; 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Organization Report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva: WHO, 2002.

YAMAMOTO A, WADA O, MANABE S. Evidence that chromium is an essential factor for biological activity of low-molecular-weight chromium-binding substance. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163:189-93.

ZIMA T, MESTEK O, TESAR V, TESAROVA P, NEMECEK K, ZAK A, et al. Chromium levels in patients with internal diseases. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 46:365-74.