

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Avaliação de parâmetros metabólicos em indivíduos
pré-diabéticos suplementados com flavonoides cítricos:
Ensaio clínico paralelo, duplo-cego, randomizado,
placebo-controlado**

CAROLINA BARBOSA RIBEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Alimentos e Nutrição para obtenção do título
de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências Nutricionais

Orientadora: Profa. Dra. Thais Borges Cesar

Araraquara

2019

**Avaliação de parâmetros metabólicos em indivíduos
pré-diabéticos suplementados com flavonoides cítricos:
Ensaio clínico paralelo, duplo-cego, randomizado,
placebo-controlado**

CAROLINA BARBOSA RIBEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Alimentos e Nutrição para obtenção do título
de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências Nutricionais

Araraquara

2019

R485a

Ribeiro, Carolina Barbosa.

Avaliação de parâmetros metabólicos em indivíduos pré-diabéticos suplementados com flavonoides cítricos: Ensaio clínico paralelo, duplo-cego, randomizado, placebo-controlado / Carolina Barbosa Ribeiro. – Araraquara, 2019.
68 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação Em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciências Nutricionais.

Orientadora: Thaís Borges Cesar.

1. Pré-diabetes. 2. Resistência à insulina. 3. Flavonoides cítricos. I. Cesar, Thaís Borges, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



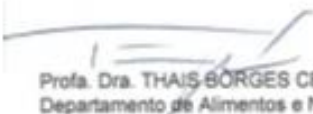
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação de parâmetros metabólicos em indivíduos pré-diabéticos suplementados com flavanoides cítricos: Ensaio clínico paralelo, duplo-cego, randomizado, placebo-controlado

AUTORA: CAROLINA BARBOSA RIBEIRO

ORIENTADORA: THAIS BORGES CESAR

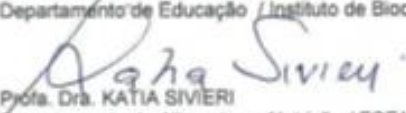
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área de conhecimento: Nutrição pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. THAIS BORGES CESAR
Departamento de Alimentos e Nutrição / FCFAR - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. CAMILA CREMONEZI JAPUR
Curso de Nutrição e Metabolismo / Faculdade de Medicina - Ribeirão Preto - USP

Profa. Dra. CAROLINE DÁRIO CAPITANI
Faculdade de Ciências Aplicadas / Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. THÁBATA KOESTER WEBER
Departamento de Educação / Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu


Profa. Dra. KÁTIA SIVIERI
Departamento de Alimentos e Nutrição / FCFAR - UNESP - Araraquara

Araraquara, 07 de março de 2019

AGRADECIMENTOS

À orientadora Prof^a. Dr^a. Thais Cesar pela competência, paciência e carinho com que sempre me ensinou.

À Fernanda Ramos pela ajuda no recrutamento e atendimentos nutricionais.

Aos estudantes de iniciação científica Mateus e Jeane pela ajuda na coleta de dados.

Ao John Manthey pela revisão cuidadosa do artigo e pelos ensinamentos.

Aos voluntários, pela disposição e generosidade.

À secretária Renata do Departamento de Alimentos e Nutrição pelo suporte e atenção.

Aos docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição pelo ensino e dedicação.

Às funcionárias da Pós-graduação e da Biblioteca pela atenção e competência.

Aos professores integrantes da comissão examinadora pelas valiosas sugestões ao trabalho.

À empresa *Ingredientes By Nature* pelo convênio firmado e financiamento do projeto.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, em especial ao Sérgio Valadão, pelo suporte durante os procedimentos de coleta das amostras.

À farmácia Bandeirantes, em especial ao Evandro pelo suporte durante a pesquisa.

À Secretaria da Saúde e SESA pela autorização na coleta de dados nas Unidades de Saúde.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Tenho muito a agradecer por ter chegado até aqui. Ninguém chega ao final de uma jornada como essa sem o apoio de muita gente.

Primeiramente, a Deus pela força e discernimento a mim concedidos em todos os momentos de alegria e tristeza.

Aos meus pais, Wanda e Marcelo, por todo amor, carinho, dedicação, e por serem meus maiores incentivadores. Vocês são a minha vida!

Ao meu namorado, Michel, pelo carinho, companheirismo, incentivo e paciência.

À minha mãe do coração Gilvana pelo cuidado, amor e carinho dedicado.

À minha amada família, por todo apoio, torcida e inspiração. São muitos, por isso não citarei nomes, mas cada um sabe a importância que tem na minha vida. Amo vocês!

Aos meus amigos de Laboratório, Paula, Melaine, Renata, Fernanda, Olívia, Beatriz, Marina, Marília, Danielle, Sara e Danielli, pela convivência, amizade e auxílio durante todos esses anos. Muito obrigada por tornarem meus dias mais leves e divertidos.

Às pessoas especiais que a pós-graduação me presenteou: Wanderson Silva, Moema Santana, Mariana Tacin e Juliana Campos.

À minha orientadora, Profa. Thais Cesar por permitir o meu crescimento profissional e por acreditar no meu trabalho.

As minhas amigas, pela compreensão nos momentos de ausência, pela parceria e estímulo durante essa caminhada.

OBRIGADA!

*“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

(Madre Teresa de Calcutá)

Resumo

Objetivo: Foi avaliar os efeitos da suplementação de flavonoides cítricos nos parâmetros bioquímicos, inflamatórios e metabólicos de indivíduos pré-diabéticos durante 12 semanas. **Métodos:** 103 indivíduos pré-diabéticos (49 ± 10 anos) foram divididos aleatoriamente em quatro grupos paralelos: (1) *Placebo*: 25 indivíduos receberam dose diária de 400 mg de placebo; (2) *Eriomin 200 mg*: 26 indivíduos receberam dose diária de 200 mg de Eriomin; (3) *Eriomin 400 mg*: 27 indivíduos receberam dose diária de 400 mg de Eriomin; (4) *Eriomin 800 mg*: 25 indivíduos receberam dose diária de 800 mg de Eriomin. Eriomin® é um bioflavonoide cítrico, composto por principalmente por eriocitrina, hesperidina, naringenina e didimina. A avaliação da composição corporal, dos marcadores bioquímicos, inflamatórios, metabólicos, renais, hepáticos e do consumo alimentar foram analisados ao longo de 12 semanas. **Resultados:** O tratamento após 12 semanas com todas as doses de Eriomin (200, 400, 800 mg) mostrou redução similar nos níveis de glicemia (-5%, $p \leq 0,001$), HbA1c (-2%, $p < 0,05$), HOMA-IR (-7%, $p < 0,05$), glicemia 2 horas (-7%, $p < 0,05$), glucagon (-6.5%, $p < 0,001$), peptídeo C (-5%, $p < 0,001$), PCRus (-12%, $p < 0,05$), IL-6 (-13%, $p = 0,03$), TNF- α (-11%, $p = 0,04$), peroxidação lipídica (-17%, $p < 0,01$) e pressão arterial sistólica (-8%, $p < 0,05$), e aumento nos níveis de GLP-1 (+15%, $p < 0,001$), adiponectina (+19%, $p < 0,05$) e capacidade antioxidante (6%, $p = 0,03$). **Conclusão:** A suplementação com Eriomin por 12 semanas em indivíduos pré-diabéticos melhorou os parâmetros bioquímicos, inflamatórios e metabólicos que constituem os fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes *mellitus* tipo 2.

Palavras Chave: pré-diabetes; resistência à insulina; flavonoides cítricos

Abstract

Objective: To evaluate the effects of citrus flavonoid supplementation on the biochemical, inflammatory and metabolic parameters of pre-diabetic subjects for 12 weeks. **Methods:** 103 pre-diabetic subjects (49 ± 10 years) were randomly divided into four parallel groups: (1) *Placebo*: 25 subjects received a daily dose of 400 mg placebo; (2) *Eriomin 200 mg*: 26 subjects received 200 mg daily dose of Eriomin; (3) *Eriomin 400 mg*: 27 subjects received 400 mg daily dose of Eriomin; (4) *Eriomin 800 mg*: 25 subjects received a daily dose of 800 mg Eriomin. Eriomin® is a citric bioflavonoid composed of eriocitrin, hesperidin, naringenin and didymin. Evaluation of body composition, biochemical, inflammatory, metabolic, renal, hepatic and food markers were analyzed during 12 weeks of intervention. **Results:** Treatment with all doses of Eriomin (200, 400, 800 mg) after 12 weeks showed similar reduction in glycemia levels (-5%, $p \leq 0.001$), HbA1c (-2%, $p < 0.05$) (-7%, $p < 0.05$), glycemia 2 hours (-7%, $p < 0.05$), glucagon (-6.5%, $p < 0.001$), peptide C (-5%, $p < 0.05$) (-12%, $p < 0.05$), IL-6 (-13%, $p = 0.03$), TNF- α (-11%, $p = 0.04$), lipid peroxidation ($P < 0.01$), and systolic blood pressure (-8%, $p < 0.05$), and increased GLP-1 (+ 15%, $p < 0.001$), adiponectin (+ $p < 0.05$) and antioxidant capacity (6%, $p = 0.03$). **Conclusion:** Supplementation with Eriomin for 12 weeks in pre-diabetic individuals improved the biochemical, inflammatory and metabolic parameters that constitute the risk factors for the development of type 2 diabetes *mellitus*.

Keywords: pre-diabetes; insulin resistance; citrus flavonoids

Lista de Tabelas e Quadros

Introdução

Quadro 1. Critérios diagnósticos para pré-diabéticos recomendados pela ADA.....	11
Tabela 1: Efeitos das flavanonas em estudos <i>in vivo</i>	20
Tabela 2: Efeitos das flavanonas em estudos clínicos	21

Capítulo 1

Table 1: Baseline characteristics of pre-diabetic individual's subject to supplementation with 200, 400 or 800 mg/day for 12 weeks	48
Table 2: Biochemical markers of pre-diabetic individual's subject to supplementation with 200, 400 or 800 mg/day for 12 weeks	49
Table 3: Metabolic and inflammatory markers of pre-diabetic individual's subject to supplementation with 200, 400 or 800 mg/day for 12 weeks	50
Table 4: Liver and renal markers of pre-diabetic individual's subject to supplementation with 200, 400 or 800 mg/day for 12 weeks	51
Table 5: Anthropometric markers and blood pressure of pre-diabetic individual's subject to supplementation with 200, 400 or 800 mg/day for 12 weeks	52
Table 6: Dietary parameters of pre-diabetic individual's subject to supplementation with 200, 400 or 800 mg/day for 12 weeks.....	53

Sumário

Resumo.....	8
Abstract	9
Lista de Tabelas e Quadros	10
Introdução	12
CAPITULO 1.....	23
Considerações Finais.....	54
Referências	55
ANEXOS.....	59
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido.....	59
ANEXO B - Questionário de seleção.....	61
ANEXO C- Registro Alimentar	63
ANEXO D- Questionário Efeitos Colaterais.....	65
ANEXO E- Acompanhamento Exames Bioquímicos.....	66

Introdução

Nos últimos anos, as doenças crônicas não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus*, doenças pulmonares e cânceres se tornaram uma pandemia emergente em todo o mundo, com taxas mais altas nos países em desenvolvimento (González et al, 2017). O aumento da incidência do diabetes *mellitus* tipo 2 está associado a diversos fatores, como: transição nutricional, estilo de vida sedentário, excesso de peso, e envelhecimento (SDB, 2017). De acordo, com a Sociedade Brasileira de Diabetes, em 2017, 15 milhões de brasileiros tinham diabetes *mellitus* tipo 2 e cerca de 40 milhões de brasileiros eram pré-diabéticos, no entanto, grande parte ainda desconheça que estejam nessas condições (SDB, 2017).

O pré-diabetes caracteriza-se por alteração da glicemia de jejum e/ou da tolerância diminuída à glicose, sendo definido como um estado intermediário entre normoglicemia e diabetes *mellitus* tipo 2 (ADA, 2018). Os critérios de diagnóstico para pré-diabéticos recomendados pela Associação Americana de Diabetes (ADA) estão descritos no Quadro 1.

Glicemia de jejum	Glicemia 2 h após TOTG	HbA1c
100 a 125 mg/dL	140- 199mg/dL	5,7% e 6,4%

Quadro 1. Critérios diagnósticos para pré-diabéticos recomendados pela ADA, 2018.

A glicemia de jejum é diagnosticada pela glicemia após 8 horas de jejum. A tolerância à glicose é obtida por meio do teste de tolerância à glicose oral, o qual é realizado após duas horas de ingerir uma solução contendo 75g de glicose. A medida da

HbA1c deve ser realizada utilizando-se um método certificado pelo Programa Nacional de Padronização de Hemoglobina Glicada e padronizado conforme as referências do Controle de Diabetes e Complicações (ADA, 2011). A HbA1c é resultado da reação entre a glicose do sangue e a proteína (hemoglobina) contida na hemácia ou glóbulo vermelho, refletindo a glicemia média de um indivíduo durante dois a três meses, e para seu diagnóstico não é necessário jejum (Faerch et al, 2009). No entanto, é necessária cautela ao avaliar isoladamente os resultados de HbA1c, pois ela pode estar alterada em certas condições. Por exemplo, na deficiência de vitamina B 12 e de folato os níveis de HbA1c podem estar elevados e, na gravidez, na anemia hemolítica e insuficiência renal terminal os níveis de HbA1c podem estar diminuídos (Radin, 2014).

A causa exata do pré-diabetes é desconhecida, mas histórico familiar, genética inatividade física e excesso de gordura corporal, parecem desempenhar um papel importante no seu desenvolvimento. De acordo com a Associação Americana de Diabetes, indivíduos adultos com excesso de peso, e que tenham um ou mais dos seguintes fatores (parente de primeiro grau com diabetes *mellitus* tipo 2; mulheres que foram diagnosticadas com diabetes *mellitus* gestacional; história de doença cardiovascular; hipertensão; colesterol HDL < 35 mg / dL e / ou triglicerídeos > 250 mg / dL; mulheres com síndrome do ovário policístico; inatividade física) apresentam alto risco para desenvolvimento do pré-diabetes (ADA, 2018).

A fisiopatologia do pré-diabetes é complexa e envolve a combinação de múltiplas alterações nos mecanismos implicados na homeostase da glicose. Semelhante ao diabetes *mellitus* tipo 2, o pré-diabetes está associado ao aumento dos níveis de glicose, diminuição da função das células beta, diminuição da sensibilidade a insulina, aumento das citocinas inflamatórias e alteração das respostas as incretinas (Brannick et al, 2016). Os hormônios incretinas, o polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) e o peptídeo-1 semelhante ao glucagon

(GLP-1), são peptídeos intestinais, sendo secretados em resposta à ingestão de nutrientes e desempenham um papel essencial na regulação pós-prandial da glicose ao potencializar a secreção de insulina estimulada pela glicose (Nauck & Meier, 2018). Em pessoas saudáveis, 70% da secreção de insulina estimulada pela ingestão de glicose ocorre através da liberação das incretinas (Ahmadiéh & Azar, 2014).

A resistência à insulina em vários tecidos do corpo é a principal anormalidade metabólica encontrada em pacientes com pré-diabetes, sendo definida como uma condição na qual a concentração normal de insulina não produz adequadamente uma resposta nos tecidos alvos periféricos, como tecido adiposo e músculo (Wilson, 2017). Essa falta de resposta leva à diminuição da captação de glicose nesses tecidos e aumento dos níveis de glicose circulantes. A hiperglicemia resultante faz com que as células betas secretem mais insulina para superar a resistência. Inicialmente, as células betas são capazes de manter a euglicemia, mas com o tempo, a função das células beta diminui e o nível de glicose começa a aumentar. A resistência à insulina no fígado leva a uma superprodução de glicose hepática, que é estimulada pelo processo de gliconeogênese (Wilson, 2017).

A resistência à insulina está associada a níveis séricos elevados de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e proteína C reativa (PCR), e concentrações baixas de adiponectina (Tateya et al, 2013).

O TNF- α é uma citocina inflamatória que atua no metabolismo de lipídeos e na sinalização da insulina. O TNF- α tem um papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina, pois induz a ativação das proteínas c-jun N-terminal kinase e Ikappa kinase, causando a fosforização do IRS-1 em serina e promovendo menor ativação da enzima fosfatidilinositol 3-quinase, resultando em redução no transporte de glicose

estimulada pela insulina (Zou et al, 2008; Hajiaghaalipour et al, 2015). Além disso, o aumento da secreção de TNF- α promove a secreção da IL-6 e PCR (Emanuela et al, 2012).

A IL-6 também é uma citocina inflamatória que possui múltiplas funções no metabolismo, sendo liberada pelo tecido adiposo e pelo músculo esquelético. Além do seu papel nos estados inflamatórios, ela também está envolvida na regulação da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose. Indivíduos pré-diabéticos apresentam concentrações séricas elevadas dessa citocina (Aguilar-Valles et al, 2015). Estudos demonstraram que níveis elevados de PCR estão associados com hiperglicemia, resistência à insulina, e diabetes *mellitus* tipo 2 (Hribal et al, 2014).

A adiponectina é secretada pelos adipócitos e atua como adipocina anti-inflamatória, regulando a ingestão alimentar, o gasto energético, o metabolismo da glicose e o catabolismo de ácidos graxos. As suas ações de sensibilização à insulina devem-se a diminuição dos níveis de glicemia, através da supressão da gliconeogênese no fígado e aumento da sinalização de insulina nos músculos (Turer & Scherer, 2012).

Além disso, indivíduos pré-diabéticos apresentam alterações nas concentrações circulantes de incretinas (Holst & Gromada, 2004). GLP-1 é um peptídeo intestinal secretado pelas células L enteroendócrinas localizadas na mucosa intestinal em resposta a nutrientes ingeridos (carboidratos, proteínas e gorduras). O GLP-1 contribui para a manutenção da homeostase da glicose através da redução da secreção de glucagon, desaceleração do esvaziamento gástrico e regulação da saciedade. (Gastaldelli et al, 2017). Em indivíduos saudáveis os níveis de GLP-1 em jejum variam entre 5 a 10 pmol/L e aumentam cerca de 2 a 3 vezes após a ingestão de nutrientes, dependendo da quantidade e do conteúdo da refeição (Gastaldelli et al, 2017). No entanto, em indivíduos diabéticos e pré-diabéticos os níveis de GLP-1 encontram-se diminuídos, ocasionando redução da

secreção de insulina estimulada pela ingestão de nutrientes, ocasionando uma hiperglicemia pós-prandial (Gastaldelli et al, 2017).

Além da insulina, a secreção de glucagon pelas células α pancreáticas têm um papel importante na homeostasia da glicose. Do mesmo modo que as incretinas aumentam a secreção de insulina, pelas células β , inibem, concomitantemente, a secreção de glucagon pelas células α (Bagger et al, 2011). O glucagon é um hormônio que é rapidamente secretado na hipoglicemia e é suprimido pela hiperglicemia (Habegger et al, 2010). Em indivíduos saudáveis, os níveis de glucagon diminuem em resposta a uma refeição reduzindo, desta forma, a produção hepática de glicose. Por outro lado, indivíduos pré-diabéticos apresentam níveis elevados de glucagon plasmático em jejum e não são capazes de diminuir a sua concentração de forma adequada após a refeição, ocasionando hiperglicemia em jejum (Bagger et al, 2014).

O peptídeo-C consiste no fragmento liberado quando a pro - insulina passa por clivagem, dando origem à insulina. É um peptídeo secretado pelas células β pancreáticas em concentrações equimolares às da insulina. Além de ter meia-vida mais longa (30 minutos), o que implica em menor flutuação de níveis séricos, não sofre metabolização hepática significativa e possui clearance mais previsível, quando comparado com a insulina. Por essa razão, tem sido bastante utilizado na prática clínica para avaliação da resposta secretora das células β pancreáticas (Kim, et al, 2016; Venkatesh et al, 2018).

Indivíduos com pré-diabetes têm um risco aumentado (até 70%) de desenvolver diabetes *mellitus* tipo 2 (ADA, 2018). Além disso, estudos sugerem que as complicações crônicas do diabetes mellitus tipo 2, como, retinopatia, microalbuminúria, neuropatia e doença cardiovascular começam a se desenvolver durante o estado pré-diabético. O pré-diabetes geralmente não apresenta sinais ou sintomas, por essa razão a

detecção precoce é importante, pois pode prevenir ou retardar a progressão para o diabetes *mellitus* tipo 2 (Wasserman et al, 2018; Pratelly, 2013).

O tratamento do pré-diabetes, tem como objetivo restaurar os níveis de glicemia ao normal, isto é, menor ou igual a 99 mg/dL. Para que esse objetivo seja alcançado, é importante que haja mudanças no estilo de vida como educação alimentar, dieta equilibrada e aumento da atividade física, e se necessário uso de medicamentos hipoglicemiantes, como as biguanidas (Acarbose, Metformina e Pioglitazona), sulfonilureias (Glimepirida, Glibenclamida e Clorpropamida), e gliptinas (Sitagliptina e Vildagliptina) (Roberts et al, 2018; Domingues Avila et al, 2017). Estudos epidemiológicos e metanálises mostraram relação inversa entre o consumo de dietas ricas em flavonoides e a ocorrência de doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo 2, mostrando que os flavonoides foram capazes de reduzir estados de hiperglicemia, dislipidemia, resistência à insulina e processos inflamatórios sistêmicos (Testa et al, 2015; Vinayagam & Xu, 2015).

Os flavonoides pertencem a uma classe de compostos fenólicos de baixo peso molecular que são amplamente distribuídos no reino vegetal. Os flavonoides são importantes para as plantas para o seu crescimento, desenvolvimento e defesa contra o ataque de insetos e microrganismos, além de serem protetores da radiação ultravioleta (Panche, Diwan, Chandra 2016). Os flavonoides (Figura 1) apresentam 15 átomos de carbonos, que consistem em dois anéis benzênicos (A e B) ligado ao anel pirano (C), podendo ser subdivididos em diferentes subgrupos, dependendo do carbono do anel C no qual o anel B está ligado e do grau de instauração e oxidação do anel de acordo em flavanonas, flavonóis, flavonas, catequinas, isoflavonas e antocianinas (Tripoli et al, 2007).

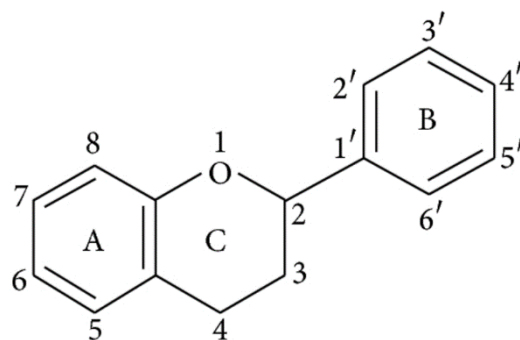


Figura 1. Estrutura geral do flavonoide (Kurmar et al, 2013).

A classe mais comum de flavonoides são as flavanonas (hesperidina, naringina, eriocitrina) que estão naturalmente presentes nas frutas cítricas ligadas a moléculas ramnoglicosídeas, como a hesperitina-7-O-rutinosídeo, naringenina-7-O-rutinosídeo e o eriodictiol-7-O-rutinosídeo (Manach et al, 2004). A hesperidina e a naringina são encontradas principalmente nas laranjas (*Citrus Sinensis*); e a eriocitrina é encontrada principalmente no limão siciliano (*Citrus Lemon*) e lima (*Citrus Limettiodes*). Um copo de 250 mL de suco de laranja contém aproximadamente 30 mg de hesperidina e 5 mg de naringenina (USDA, 2008) e um copo de 250 mL de suco de limão contém 55 mg de eriocitrina (Gattuso et al, 2007).

Quando ingerida, a hesperidina, naringina e eriocitrina são deglicosiladas no lúmen intestinal por ação das β -glicosidases ou bactérias intestinais. Os compostos não hidrolisados no pequeno intestino, são transportados na sua forma intacta em direção ao cólon, onde são hidrolisados pela α -ramnosidase, produzida pela microbiota do local, liberando a forma aglicona. Uma vez absorvidas, as flavanonas agliconas (hesperitina, naringenina e eriodictiol) são conduzidas ao fígado pela circulação entero-hepática. No fígado, são conjugadas por meio de metilação, sulfatação e/ou glicuronidação, e posteriormente são liberadas na circulação e distribuídas entre vários órgãos, como rins,

pâncreas, baço, músculo, coração e tecido adiposo, onde podem exercer atividade biológica. Alguns dos conjugados do fígado podem ser excretados como componentes biliares (recirculação entero-hepática) e/ ou pela urina. Os metabólitos não absorvidos são eliminados pelas fezes. Estudos mostraram que esses metabólitos são eliminados do plasma dentro de 5 a 8 horas, enquanto na urina eles são eliminados dentro de 24 horas. Os metabólitos conjugados, como a hesperitina, naringenina e eriodictiol produzidos endogenamente são responsáveis pelos efeitos sistêmicos das flavanonas (Miyake et al, 2006; 2009; Gattuso, et al 2007).

As flavanonas cítricas apresentam propriedades anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória e antioxidante (Assini et al, 2013; Mulvihill et al, 2012; Tripoli et al, 2007). Alguns efeitos das flavanonas podem ser observados na Tabela 1 e 2. Os mecanismos subjacentes de ação para um efeito hipolipemiante, hipoglicemiante e anti-inflamatório dos flavonoides cítricos ainda não foram totalmente estabelecidos. Várias hipóteses foram propostas com base em dados obtidos de estudos *in vitro* e em animais

A ação hipoglicemiante das flavanonas pode ser decorrente: (1) da redução da apoptose das células β pancreáticas, ocasionado melhora na sua proliferação e promovendo secreção de insulina; (2) da regulação no metabolismo da glicose nos hepatócitos e subsequente melhora da hiperglicemia; (3) do aumento da captação de glicose no músculo esquelético e nos tecidos adiposos (Hajiaghaalipour et al, 2015). Estudo *em vitro* mostrou que a concentração de 5 e 25 μ M de eriodictiol promoveu a captação de glicose estimulada por insulina e aumentou a expressão de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama 2 (PPAR γ 2) em adipócitos 3T3-L1 (Zang et al, 2012). Além disso, a suplementação com naringenina (25 mg / kg) em ratos diabéticos durante 45 dias reduziu hiperglicemia, hiperinsulinemia e modulou as expressões de GLUT-4 (David et al, 2015).

Tabela 1. Efeitos das flavanonas em estudos *in vivo*

<i>Estudos</i>	<i>Flavanona</i>	<i>Doses</i>	<i>Duração</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referências</i>
Camundongos C57BL / 6J	Eriocitrina	200 mg/kg de peso corporal	4 semanas	Aumentou a capacidade antioxidante total do soro e restringiu a elevação da IL-6, MCP-1 e PCR-us	Ferreira et al, 2016
Ratos Sprague-Dawley	Eriocitrina	0,35%	21 dias	Promoveu efeito redutor do colesterol total, VLDL + LDL e triglicérides no soro de ratos alimentados com dieta rica em gordura e colesterol	Miyake et al, 2006
Ratos Wistar machos	Eriocitrina	600 mg/kg de peso corporal	Agudo	Suprimiu os aumentos dos níveis de TBARS causados pela peroxidação lipídica durante o exercício agudo, além de manter os níveis de glutathione redutase	Minato et al, 2003
Ratos Wistar diabéticos com infarto do miocárdio	Hesperidina	100 mg/kg de peso corporal	4 semanas	Normalizou os níveis de glicose sanguínea alterando a atividade das enzimas reguladoras da glicose	Rekha et al, 2019
Ratos Wistar tratados com alto teor de gordura / estreptozotocina (HFD/STZ)	Hesperidina	50 mg/kg de peso corporal	30 dias	Atenuou o estresse oxidativo mediado pela hiperglicemia e a produção de citocinas pró-inflamatórias	Zhang, et al 2012
Camundongos C57BL / KsJ-db / db	Hesperidina	0, 2 g/kg de peso corporal	5 semanas	Reduziu a glicemia de jejum, além disso, reduziu a expressão do GLUT-2 no hepatócito e aumentou o GLUT-4 no adipócito	Jung, et al, 2006
Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina	Naringenina	0,05%	24 semanas	Aumentou a expressão dos GLUT 1 e 3	Sandeep et al, 2017
Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina	Naringenina	5 a 10 mg / kg de peso corporal	6 semanas	Diminuiu os níveis de malonaldeído e as atividades de superóxido dismutase, catalase e enzima glutathione.	Ren, et al, 2016
Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina	Naringenina	25 e 50 mg / kg de peso corporal	5 semanas	Diminui alterações induzidas por diabetes como os níveis de glicose sérica, insulina e citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-1beta e IL-6). Diminuiu biomarcadores de estresse oxidativo	Al-Rejaie, et al, 2015

Tabela 2. Efeitos das flavanonas em estudos clínicos

<i>Indivíduos</i>	<i>Flavanona</i>	<i>Desenho</i>	<i>Dose</i>	<i>Duração</i>	<i>Resultados</i>	
60 indivíduos com diabetes mellitus tipo 2	Hesperidina	Estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, ensaio paralelo	500 mg / dia	6 semanas	Melhorou a capacidade antioxidante e controle glicêmico, reduzindo danos oxidativos ao DNA e peroxidação lipídica	Homayouni, et al 2017
48 indivíduos com diabetes mellitus tipo 2	Hesperidina	Estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, ensaio paralelo	500 mg/dia	8 semanas	Reduziu os níveis da glicemia em jejum e hemoglobina A1c	Mohammadi, 2015
75 indivíduos com infarto do miocárdio	Hesperidina	Estudo randomizado, duplo-cego controlado, ensaio paralelo	600 mg/dia	4 semanas	Diminuiu os níveis séricos de E-selectina e aumentou as concentrações de adiponectina e colesterol HDL-C	Haidari, et al 2015
24 indivíduos com Síndrome Metabólica	Hesperidina	Estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, ensaio crossover	450 mg / d	3 semanas	Reduziu os marcadores de inflamação (PCRus, E-selectina)	Riza et al, 2012

Dentre as ações anti-inflamatórias pode se citar que as flavanonas são capazes de suprimir a produção de mediadores pró-inflamatórios, principalmente TNF- α e IL-6, devido a inativação do fator de transcrição NF κ B (Yoshida et al, 2010). Estudo realizado em camundongos mostrou que a suplementação com eriocitrina reduziu os níveis sanguíneos de IL-6, MCP-1 e PCRus (Ferreira, et al, 2016). Outro estudo realizado com indivíduos com síndrome metabólica mostrou que a suplementação de 500 mg/dia hesperidina reduziu os níveis de PCRus, amiloide sérica e E-selectina após 3 semanas (Rizza, et al, 2011).

Em relação a ação antioxidante, as flavanonas tem a capacidade de promover a ativação do Nrf2, que é considerado regulador chave da resposta antioxidante do organismo, sendo responsável por induzir a expressão de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e catalase (Hu et al, 2012; Lee et al, 2015; Parhiz et al, 2015). Em indivíduos diabéticos, a ativação do Nrf2 protege as células β pancreáticas contra vários insultos, mantendo a homeostase da glicose e aumentando a sensibilidade à insulina (Sireesh et al, 2018). Estudo *in vivo*, mostrou que a suplementação com eriocitrina aumentou as enzimas catalase e glutatona no fígado e diminuiu a peroxidação lipídica no sangue, fígado e rins de ratos diabéticos (Minato et al, 2003). Além disso, estudo realizado com 64 diabéticos tipo 2 mostrou que a suplementação com 500 mg/ dia de hesperidina por 6 semanas aumentou os níveis de capacidade antioxidante e reduziu os níveis de malonaldeído (Homayouni et al, 2017).

Assim, com base nas evidências que mostraram ações benéficas dos flavonoides cítricos na resistência à insulina e normalização da glicose sanguínea, a hipótese desse estudo foi que a suplementação de flavonoides cítricos reduz a hiperglicemia e a resistência insulínica, além de exercer ações benéficas no perfil lipídico, nos biomarcadores inflamatórios, hepáticos e renais.

CAPITULO 1.

Effectiveness of Eriomin® in managing hyperglycemia and reversal of pre-diabetes condition: a double-blind, randomized, controlled study

Effectiveness of Eriomin® in managing hyperglycemia and reversal of pre-diabetes condition: a double-blind, randomized, controlled study

Carolina B Ribeiro¹ | Fernanda M Ramos¹ | John A Manthey² | Thais B Cesar^{*1}

¹Department of Food & Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University - UNESP, Araraquara 14800-903, SP, Brazil

²U.S. Horticultural Research Laboratory, Agricultural Research Service, USDA, 1401 South Rock Road/Port Fierce, FL 34945, USA

***Correspondence to** Thais B Cesar; thais.cesar@unesp.br; phone: +55 16 3301-6927

Abbreviations:

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); ADA: American Diabetes Association; ALP: alkaline phosphatase; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BMI: body mass index; FPG: fasting plasma glucose; γ GT: gamma glutamyl transferase; GLP-1: Glucagon-like peptide 1; HbA1c: Glycated hemoglobin; HDL-C: high-density lipoprotein; HOMA: Homeostasis Model Assessment; hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein; IFG: impaired fasting glucose; IL-6: interleukin 6; LDL-C: low-density lipoprotein; NF κ B: nuclear factor kappa B; Nrf2: Nuclear factor-erythroid related factor 2; OGTT: 2 hours oral glucose tolerance test; PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxykinase; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; WHO: World Health Organization

Abstract

This study evaluated the effect of different doses of Eriomin® on hyperglycemia and insulin resistance associated with other metabolic biomarkers in pre-diabetic individuals. Pre-diabetes patients (n = 103, 49 ± 10 y) were randomly divided into four parallel groups: (1) Placebo; (2) Eriomin 200 mg; (3) Eriomin 400 mg; (4) Eriomin 800 mg. Evaluation biochemical, metabolic, inflammatory, liver, renal, anthropometric markers blood pressure and dietary parameters were analyzed during 12 weeks of intervention. Treatment with all doses of Eriomin (200 mg, 400 mg and 800 mg) were similar and altered significantly the following variables: blood glucose (-5 %), insulin resistance (-7 %), glucose intolerance (-7 %), glycated hemoglobin (-2 %), glucagon (-6.5 %), C-peptide (-5 %), hsCRP (-12 %), interleukin-6 (-13 %), TNF α (-11 %), lipid peroxidation (-17%), systolic blood pressure (-8 %), GLP-1 (+15 %), adiponectin (+19 %), and antioxidant capacity (+6 %). Eriomin or placebo did not influence the anthropometric and dietary variables. Short-term intervention with Eriomin, at doses of 200, 400 or 800 mg / d, benefited glycemic control, reduced systemic inflammation and oxidative stress, and reversed the pre-diabetic condition in 24% of the evaluated patients.

Keywords: Prediabetic state, hyperglycemia, insulin resistance, flavonoids

1 | Introduction

Rapid aging of the population, combined with sedentary habits and inadequate diet, play an important role in the epidemic of pre-diabetes and type 2 diabetes. Currently, 425 million people live with type 2 diabetes and 374 million have pre-diabetes worldwide (IDF, 2017). People with pre-diabetes are defined by three specific parameters: 1°) altered fasting glycemia, defined by fasting blood glucose between 6.0 and 6.9 mmol/L (100 to 125 mg/dL); 2°) impaired glucose tolerance, defined by oral glucose tolerance test (OGTT) between 7.8 and 11.0 mmol/L (140-200 mg/dL), or the combination of both previous conditions; and 3°) HbA1c between 5.7% and 6.4% (ADA, 2018).

The pathophysiology of pre-diabetes is complex and involves the combination of multiple changes in the mechanisms involved in glucose homeostasis. Similar to type 2 diabetes, pre-diabetes is associated with increased glucose levels, decreased insulin sensitivity, increased inflammatory cytokines, and altered incretin responses (Brannick, Wyn, & Dagogo, 2016). Pre-diabetes usually has no apparent signs or symptoms but may progress to type 2 diabetes with microvascular and macrovascular complications such as retinopathy, microalbuminuria, neuropathy, and cardiovascular disease. For this reason, prevent or retard the progression to type 2 diabetes in this population is a relevant therapeutic goal. Recommendations include changes in lifestyle, such as regular physical activity combined with a balanced diet and use of antidiabetic drugs (ADA, 2018; Wasserman, Wang, & Brown, 2018). However, changes in lifestyle can be difficult to maintain in the long run, and antidiabetic drugs may be associated with side effects (Roberts et al., 2018).

Nutraceuticals may represent a complementary or adjunct alternative to drugs prescribed in the treatment of pre-diabetes. Among these, supplement of citrus flavonoids, has been shown to have anti-inflammatory, antihyperglycemic and antioxidant properties

(Minato et al., 2003; Zaidun, Thent, Latiff, 2018; Miyake et al., 2006). Experimental mice (C57BL/6J) supplemented with eriocitrin (140 mg/kg/day) showed an increase of total antioxidant capacity and decreased inflammatory markers (IL-6, MCP-1 and hsPCR) in the blood circulating and organs (Ferreira, Spolidorio, Manthey, & Cesar, 2016). Another study showed that hesperidin supplementation reduced plasma glucose levels in subjects with type 2 diabetes (Homayouni et al., 2018). An in vitro study showed that naringenin improved hyperglycemia by inhibits Toll-like receptor 2 expression in adipose tissue of high-fat diet-fed mice (Yoshida et al., 2013).

Although the antioxidant and anti-inflammatory activities of citrus flavonoids have been widely recognized (Parhiz et al, 2015; Yi, Ma, & Ren, 2017), there is a lack of information about their actions on metabolic disorders related to pre-diabetes in humans, as well information about potentially effective doses. Therefore, this study aimed to investigate the efficacy of three increasing doses (200, 400 and 800 mg/d) of Eriomin® on biochemical, metabolic and inflammatory markers, and the potential of Eriomin for reversal of the pre-diabetic condition.

2 | Methods

2.1 | Trial design

A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-design trial was conducted in the Pharmacy School, Sao Paulo State University, Brazil, between November 2017 and February 2018 according to the CONSORT 2010. To evaluate the effectiveness of Eriomin®, three distinct doses were selected based on the basis of previous clinical trials performed with hesperidin, which average dose given was around 500 mg, ranging from 146 mg to 1000 mg (Morand et al., 2011; Homayouni, et al., 2018; Mohammadi et al., 2015; Demonty et al, 2010). All recruited individuals (n = 120) were

randomized (block size) by random computer-generated numbers. Subjects were allocated into four groups: (1) Placebo: 30 subjects given a daily dose of 400 mg placebo; (2) Eriomin 200 mg: 30 subjects given a daily dose of 200 mg Eriomin; (3) Eriomin 400 mg: 30 subjects given a daily dose of 400 mg Eriomin; (4) Eriomin 800 mg: 30 subjects given a daily dose of 800 mg Eriomin. The randomization scheme was performed by an independent researcher.

2.2 | Ethics approval and consent to participate

The procedures performed in this study followed the ethical guidelines of the National Health Council (Res. 466/12) and Declaration of Helsinki (1964). The protocol was cleared by the Ethical Board of the Pharmacy School of UNESP (CAAE: 67610217.6.0000.5426), and registered at ClinicalTrials.gov (NCT03215043). All individuals signed an Informed Consent Form before starting the study.

2.3| Subjects

Subjects were recruited through advertisement in the local media (websites, radio and newspapers), distribution of fliers in the community, City Health Center and University email lists. Individuals of both sexes, aged 35-60 years, and with pre-diabetes were considered eligible to participate in the study, because pre-diabetes is more prevalent in middle-aged adults, and below 60 years because the confounding factor of aging. Pre-diabetic subjects were selected according to the Expert Panel of the American Diabetes Association (2018), which include these following features: (1) impaired glucose metabolism, (2) glucose intolerance, and (3) glycated hemoglobin $\geq 5.7\%$.

The exclusion criteria were as follows: pregnancy; smoking; history of diabetes *mellitus*, cardiovascular, hepatic, renal, disease; use of dietary supplements (vitamins,

minerals, bioflavonoids, probiotic, symbiotic or other bioactive compound); continuous use drugs; history of drug or alcohol abuse; intense physical exercise (more than 10 h per week). Exclusion criteria after randomization were: non-collection of blood samples or less consumption of 90% of the capsules.

2.4 | Sample size

The primary endpoint was serum glucose, and sample size was estimated based on a similar clinical study (Mohammadi et al., 2015). The sample size for the parallel clinical trial was calculated statistically ($N = \frac{(\sigma_1^2 + \sigma_2^2) (Z_\alpha + Z_\beta)^2}{(\mu_2 - \mu_1)^2}$), with significance level of 5% and 80% power. The minimum sample size was 24 individuals per group and, in anticipation of a 15% dropout rate, 30 individuals were considered per intervention group.

2.5 | Intervention

The intervention product was Eriomin®, supplement of citrus flavonoids provided by Ingredients by Nature TM, Montclair, CA. The purity was determined by HPLC and which contains 70% eriocitrin, 5% hesperidin, 4% naringin and 1% didymin. The placebo, containing 100% microcrystalline corn starch, was formulated by an independent pharmacist and its appearance was as similar as possible to the active supplement. Subjects were instructed to consume one capsule after dinner with a glass of water during 12 weeks. Supplement and placebo were given to participants every two weeks after randomization. Containers and capsules of Eriomin and placebo were encapsulated in tablets of the same size, shape, color and were prepared by a pharmacist who did not participate in the study. The container label held only the patient identification number. Thus, both the investigator and the patients were blind from the time of randomization until the analysis was complete.

Conformity was assessed by counting unused capsules at each visit. Participants who consumed more than 90% of the provided capsules and completed all evaluations had good compliance and were included in the statistical analysis.

2.6 | Study Procedures

Laboratory Analyzes

Overnight fasting blood samples were obtained in the beginning of the 1st, 4th, 8th and 12th intervention at the São Lucas Clinical Analyzes Laboratory, Araraquara-SP, and blood serum was stored at -80°C . Biochemical markers: Fasting glucose, glucose tolerance (OGTT), glycated hemoglobin (HbA1c), insulin, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL- cholesterol), triglycerides were performed by commercial kits (Labtest, Brazil). Low-density lipoprotein (LDL- cholesterol) was calculated (Friedwald, Levy, & Friedrickson, 1972). Homeostasis Model Assessment (HOMA-IR) was calculated and the cutoff set at ≥ 2.71 (Matthews et al, 1985). Metabolic and inflammatory markers: Glucagon-like peptide 1 (GLP-1), glucagon, C-peptide, adiponectin, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), was performed by Luminex Milliplex® (RP3X Scientific, Ribeirao SP, Brazil). Lipid peroxidation was assessed by TBARS assay (Yagi, 1998) and total antioxidant capacity by radical ABTS•+ assay (Re et al, 1999). Liver and renal markers: Aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), and gamma-glutamyl transferase (γGT) and creatinine, were performed by commercial kits (Labtest, Brazil).

Anthropometry and blood pressure

In the beginning of the 1st, 4th, 8th and 12th week it was evaluated the following anthropometric parameters: body weight (kg), muscle mass (kg), fat mass (kg), body fat (%) (InBody 720, Biospace, Tokyo, Japan), BMI was calculated by following computation: weight in kg/height in meters squared and waist-to-hip ratio was evaluated according to WHO,2008. Blood pressure was measured with digital monitor (ReliOn, HEM-741 CRELN, USA).

Dietary parameters

Subjects were instructed to maintain their usual diet and physical activity during the total experimental period. In the beginning of the 1st, 4th, 8th and 12th week registered nutritionists have analyzed usual dietary intake by a 3-day dietary record non-consecutive, and the analysis of energy and macronutrient and micronutrient intake was performed using the DietBox®, based on the Brazilian Table of Food Composition (Unicamp, 2006).

Clinical reversal of pre-diabetic condition

For the calculation of the clinical condition reversal, it was considered whether the individual after treatment had fasting glycemia levels ≤ 99 mg/dL or glucose of 2-hours after OGTT ≤ 40 mg / dL or glycated hemoglobin levels $\leq 5, 7\%$.

2.7 | Adverse events

Adverse effects were previously defined by the investigators as the presence of any unfavorable and unintended signs on the health and well-being of individuals, abnormal laboratory findings, symptoms and/or diseases temporarily associated after

administration of Eriomin® or placebo. During the intervention, patients were questioned bi-weekly by nutritionists for the eventual occurrence of nausea, vomiting, diarrhea or any change in general well-being or illness.

2.8 | Outcomes Measures

The primary outcome was serum fasting glucose. The secondary outcome were glucose tolerance (OGTT), HbA1c, insulin, HOMA-IR, total cholesterol, triglycerides, HDL- cholesterol, LDL- cholesterol, ALP, γ GT, AST, ALT, GLP-1, glucagon, C-peptide, TNF- α , IL-6, hsCRP, antioxidant capacity, serum lipid peroxidation, clinical reversal of pre-diabetic condition, body weight, body mass index (BMI), muscle mass, fat mass, body fat and waist-to-hip ratio, systolic and diastolic blood pressure and intake of macronutrients and micronutrients. Confounder variables, as physical activity, diet and anthropometry were strict controlled by biweekly monitoring of each patient, so that they not influence glycemic control or other results.

2.9 | Statistical Analysis

Data are presented as mean $\pm$ SD. Statistical analysis was performed using SPSS 22 (Statistical Package Social Sciences). One-way ANOVA was used to identify differences between groups in the baseline period. Two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak post hoc test were apply to compare changes within and between groups over 12 weeks. The significance was $p \leq 0.05$.

3 | Results

3.1 | Individuals

One hundred and three subjects, 49 men and 54 women, 49 ± 10 y, previously classified as pre-diabetic, were included in this study; 17 participants were excluded for the following reasons: low compliance to product intake (i.e., $< 90\%$ compliance, $n = 6$), disease ($n = 3$), family circumstances ($n = 2$), moved away ($n = 1$), and did not attend samples withdrawal ($n = 5$) (Figure 1). The baseline characteristics of all participants were similar among the groups: placebo and 200 mg, 400 mg and 800 mg Eriomin, as shown in Table 1.

3.2 | Biochemical Markers

Fasting blood glucose levels were reduced after Eriomin treatment in all tested doses. The reductions of 6% were observed at a dose of Eriomin of 200 mg ($p \leq 0.01$), 5% in 400 mg Eriomin ($p \leq 0.01$) and 4% in 800 mg Eriomin ($p = 0.041$) at the end of treatment. On the other hand, subjects in the placebo group had an increase in fasting blood glucose levels after twelve weeks (Table 2). Glucose of 2-hours after OGTT was significantly reduced by 7% with administration of 200 or 400 mg of Eriomin and 6% with the dose of 800 mg after 12 weeks of treatment (Table 2). In addition, there was a mean reduction of 2% in HbA1c levels in the three groups supplemented with Eriomin ($p \leq 0.05$), whereas placebo showed no change during intervention time (Table 2). All volunteers had insulin resistance at the beginning, during, and at the end of the experiment ($\text{HOMA-IR} \geq 2.71$), but there was a reduction of 8% after intervention with 200 mg of Eriomin ($p = 0.037$), 7% with 400 mg ($p = 0.043$) and 6% with 800 mg ($p = 0.042$) (Table 2) and triglycerides during and at the end of the experimental period (Table 2). Regarding to blood lipids, there was no reduction in total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol in the placebo group and supplemented with Eriomin (200,400 and 800mg).

3.3 | Metabolic and inflammatory markers

Levels of blood plasma GLP-1 increased 15% for all tested doses of Eriomin: 200, 400, and 800 mg ($p < 0.001$). After intervention, Eriomin supplementation (200, 400 and 800 mg) also promoted an average reduction of 6.5% of glucagon ($p < 0.001$) and 5% of C-peptide levels ($p < 0.001$). No change was observed in the placebo group during treatment (Table 3).

Eriomin supplementation for all doses tested (200, 400 and 800 mg/d) promoted a mean reduction of 12% in hsCRP levels ($p < 0.050$), 13% in IL-6 ($p = 0.034$), 12% in TNF- α ($p = 0.041$), 17% in lipid peroxidation levels ($p < 0.010$). Serum adiponectin levels increased by 19% in the Eriomin 200 mg group ($p < 0.010$), 22% in 400 mg ($p < 0.010$) and 17% in 800 mg ($p < 0.050$) after 12 weeks. In addition, individuals supplemented with Eriomin had a 6% increase in antioxidant capacity ($p = 0.031$). Placebo showed no change in these parameters during intervention (Table 3).

3.4 | Liver and renal markers

Hepatic enzymes (AST, ALT, ALP, γ GT), and marker of renal function (creatinine) remained unchanged during the experiment in all three groups supplemented with Eriomin and at placebo (Table 4).

3.5 | Anthropometry and blood pressure

Supplementation with Eriomin (200, 400 and 800 mg/d) and placebo had no effect on body weight, BMI, lean mass, fat mass, fat percentage and hip waist ratio. However, all doses of Eriomin supplementation promoted a mean systolic blood pressure reduction of 7%. Diastolic blood pressure remained unchanged in the groups throughout the study (Table 5).

3.6 | Dietary parameters

Intake of energy and macronutrients (carbohydrates, proteins, lipids) and cholesterol, saturated fatty acid, fibers, vitamin E and vitamin C were not significantly altered in patients supplemented with Eriomin or placebo during the 12-week intervention (Table 6).

3.7 | Clinical reversal of pre-diabetic condition

After 12 weeks, 27% of subjects supplemented with Eriomin 200, 22% with Eriomin 400 mg and 24% with Eriomin 800 reversed pre-diabetes to the normal condition (euglycemia). The placebo group maintained the same number of pre-diabetic individuals (Figure 2).

3.8 | Dose-dependent

According to our results there was no dose-dependent effect, Eriomin supplementation for all doses tested (200, 400 and 800 mg/d) promoted similar effects on the reduction of fasting blood glucose, impaired glucose tolerance, HOMA-IR, HbA1c, glucagon, C peptide, hsCRP, IL-6 and TNF- α and increased similar in blood levels of GLP-1, adiponectin and antioxidant capacity.

3.9 | Adverse effects and safety of Eriomin

During the study, seven adverse events were reported: two cases in the Eriomin 800 group (1 pasty stools and 1 headache), two cases in the 400 group (2 pasty stools), one case in the 200 group (1 pasty stools) and two cases in the placebo group (1 pasty stools and 1 headache). The frequencies of these events did not differ between groups ($p >$

0.05), showing that, in general, Eriomin supplementation was well tolerated, without reports of severe or chronic adverse events. Furthermore, liver and kidney functions were unchanged in all groups during treatment.

4 | Discussion

This study evaluated the efficacy of Eriomin® in the management of hyperglycemia, inflammatory and metabolic parameters, and its contribution to the reversal of the pre-diabetes state in a short time interval. After 12 weeks of Eriomin supplementation with 200, 400 or 800 mg per day there was a significant decrease in fasting glycemia, impaired glucose tolerance, HOMA-IR, HbA1c, glucagon, C-peptide, hsCRP, IL-6 and TNF- α . In addition, there were increases in the blood levels of GLP-1, adiponectin and antioxidant capacity. The lack of dose dependence means that there is a biochemical gate regulating the magnitude of the changes measured in this study, saturated at concentrations of 200 mg or less. This means that there may be a set of preliminary biochemical events, very tightly controlled by very low concentrations of Eriomin, for which there is still no clear information.

Under Eriomin supplementation, 5% reduction in glycemic levels and 7% reduction in the glucose tolerance test occurred. Serum HbA1c and insulin resistance, as measure by HOMA-IR, reduced by 2% and 7%, respectively. These findings were clinically relevant because after treatment with Eriomin 24% of patients reversed the pre-diabetic clinical condition for normal glycemia and / or lower glucose intolerance. Eriocitrin, hesperidin, naringin and its metabolites aglycones eriodictiol, hesperetin, naringenin, have been identified as antidiabetic compounds because of their hypoglycemic effects, observed in vitro and in vivo studies. (Zhang et al., 2012; Bucolo, Leggio, Drago, & Salomone, et al., 2012; Fukuchi et al., 2008). In type 2 diabetic mice,

hesperidin and naringin appear to regulate the activities of hepatic enzymes involved in gluconeogenesis and glycolysis (Jung, Lee, Jeong & Choi, 2004). These flavanones were also able to reduce the expression of glucose-6-phosphatase mRNA, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and hepatic GLUT2, and increase GLUT4 expression in adipocytes (Jung, Lee, Park, Kang & Choi, 2006). More recently, it was shown that eriodictyol regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) mRNA, in hepatocytes and adipocytes, which activates insulin signaling and promotes translocation of the glucose transporter GLUT4, increasing intracellular glucose uptake and consequently improving insulin sensitivity (Zhang et al., 2012).

It has been reported that pre-diabetic individuals have impaired serum GLP-1 secretion, and incretin secreted by intestinal L cells after carbohydrate ingestion (Wang 2016). GLP-1 is involved in regulating glucose metabolism, stimulating insulin secretion and inhibiting glucagon secretion, thereby lowering plasma glucose levels (Gastaldelli, Gaggini, & Fronzo, 2017). In our study, all doses of Eriomin promoted a 15% increase in GLP-1 levels and a 6% reduction in glucagon levels, which presumably may be associated with improved hyperglycemia in pre-diabetic volunteers. A recent review described new mechanisms of how citrus flavonoids act in the secretion and signaling of GLP-1 to regulate the glucose metabolism (Domínguez Avila, Rodrigo García, González Aguilar, & Rosa, 2017). This fact was demonstrated in experiments with naringin, a citrus flavanone, which inhibited dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) by increasing the half-life of GLP-1, improving insulin secretion and glucose uptake (Parmar et al., 2012).

Another important marker for the pre-diabetic condition is the low level of adiponectin, an adipokine that plays a crucial role in insulin sensitivity and regulation of glucose metabolism, and is also considered a risk factor for cardiovascular disease

(Banerjee et al., 2017; Lai, Lin, Xing, Weng & Zhang, 2015). Previous studies, showed citrus flavonoids positively regulate adiponectin transcription in adipocytes and increase their levels in patients with myocardial infarction (Liu et al., 2008; Haidari et al., 2015). These data corroborate with our findings, where supplementation with Eriomin increased serum adiponectin levels by 18% and reduced the concentration of C-peptide by 5%, an important marker of beta cell function that allows differentiation between the prognosis of type 1 and type 2 diabetes (Kim et al., 2016).

Increased production of proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α , plays an important role in the pathogenesis of type 2 diabetes and contributes to long-term micro and macrovascular complications (Navarro & Mora, 2006; Forbes & Cooper 2013). Pre-diabetic patients exhibit higher levels of these markers during disease progression (Dorcely et al., 2017). Results of our study showed that Eriomin lowered the low-grade inflammation in pre-diabetic patients by reductions of serum levels of hsCRP (-12%), IL- 6 (-13%) and TNF- α (-11%). Previous study in mice supplemented with eriocitrin or eriodictyol also showed decreases in the elevated levels of IL-6 and hsCRP caused by a high-fat diet (Ferreira, Spolidorio, Manthey, & Cesar, 2016). Another study showed that eriodictyol had inhibitory effects on mRNA expression of IL-6 and TNF- α (Lee, 2011). Some mechanisms have been proposed to explain the anti-inflammatory properties of citrus flavonoids, which include activation of PPAR γ expression and inhibition of nuclear factor kappa B (NF κ B), with consequent reduction of inflammatory cytokine secretion and increase of adiponectin (Lee, 2011; Gamo, Miyachi, Nakamura, & Matsuura, 2014).

Hyperglycemia is associated with oxidative stress, which plays an important role at the progression of type 2 diabetes, insulin resistance and β -cell dysfunction (Rehman, & Akash, 2017). In contrast, flavonoids act as antioxidants against various diseases by

neutralizing the effects oxidative stress (Kawser et al., 2016). In the present study, Eriomin supplementation resulted in improved blood serum antioxidant status and reduced oxidative stress, evidenced by increased antioxidant capacity (+6%) associated with reduced lipid peroxidation marker (-17%). Our results are consistent with previous studies, which observed a reduction of lipid peroxidation on the blood serum, liver and kidneys of diabetic rats treated with eriocitrin (Miyake, Yamamoto, Tsujihara & Osawa, 1998; Ferreira, Spolidorio, Manthey, & Cesar, 2016; Bucolo, Leggio, Drago, & Salomone, 2012). In addition, eriodictyol protected against kidney injury through activating nuclear factor-erythroid related factor 2 (Nrf2) (Li et al., 2016). In diabetic individuals, the activation of Nrf2 protects pancreatic β cells against various insults, thus maintaining glucose homeostasis and also increasing insulin sensitivity (Sireesh, Dhamodharan, Ezhilarasi, Vijay, & Ramkumar, 2018). The tendency of eriodictyol to inhibit free radical-mediated events is governed by its chemical structure. Double bonds, hydroxyl groups and carbonyl function confer antioxidant and anti-apoptotic properties of flavonoid molecules (Bucolo, Leggio, Drago & Salomone, 2012). According to Miyake et al (1998), eriocitrin has stronger antioxidant activity than the other citrus flavonoid compounds due to its multiple hydroxyl groups.

Eriomin supplementation during 12 weeks was well tolerated by patients, since AST, ALT, ALP and γ GT levels remained at normal levels. Altered levels of these enzymes reflect damage to hepatocytes and are considered sensitive and specific clinical biomarkers for hepatotoxicity (Ozer et al., 2008). These results suggest absence or non-detectable toxicity or impairment of liver function, as previously shown of lemon flavonoid supplementation (Hiramitsu et al., 2014). In addition, a study with mice showed that eriocitrin protected against liver damage caused by consumption of the high-fat diet (Ferreira, Spolidorio, Manthey & Cesar, 2016).

This study showed strong aspects, including: 1) double-blinded, placebo-controlled design, 2) high adherence of patients attested by the low number of withdrawal, and 3) evaluation of Eriomin adverse effects and toxicity (liver enzymes and creatinine). However, some limitations were also observed, such as the relatively short duration of the study (12 weeks), and indirect observation of dietary intake and physical activity through recorded. More studies with longer intervention time and larger sample sizes are needed to better understand the effects of Eriomin in attenuating hyperglycemia in pre-diabetic subjects. In addition, this lack of dose response suggests that studies with doses below 200mg should be performed.

In conclusion, this study showed that short-term intervention with Eriomin® benefited glycemic control, lowered the systemic inflammation and oxidative stress, and reversed the pre-diabetic condition in 24% of total patients evaluated for all dose tested.

Acknowledgments: The authors thank the Coordination for the Improvement of Education Personnel (CAPES) for grant scholarship to Carolina Ribeiro and Fernanda Ramos.

Funding: Ingredients by Nature™. Number: 5045

Conflict of interest: None. The sponsors had no role in the design, execution, interpretation, or writing of the study

Contributors: **Carolina Ribeiro** enrolled participants, collected data, and wrote the first version of the paper; **Fernanda Ramos** enrolled participants and collected data; **John Manthey** conceived the study and provided chemical analysis. **Thais Cesar** and

Carolina Ribeiro designed the study and, **Thais Cesar** corrected the first version of the paper. All authors contributed significantly to analysis and interpretation of data, discussion, editing, and approval of the final version of this paper.

Orcid: Thais Cesar  <https://orcid.org/0000-0001-7878-7075>

5 | References

- American Diabetes Association. (2018). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 41, S13-S27. doi:<https://doi.org/10.2337/dc18-S002>.
- Banerjee, A., Khemka, V.K., Roy, D., Poddar, J., Roy, T.K.S., Karnam, S.A. (2017). Role of Serum Adiponectin and Vitamin D in Prediabetes and Diabetes Mellitus. *Can J Diabetes*, 41, 259-265. doi: 10.1016/j.jcjd.2016.10. 006.
- Brannick, B., Wyn,n A., Dagogo S. (2016). Prediabetes as a toxic environment for the initiation of microvascular and macrovascular complications. *Experimental Biology and Medicine*, 241(12), 1323-1331. doi:10.1177/1535370216654227.
- Bucolo, C., Leggio, G.M., Drago, F., Salomone, S. (2012). Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Pharmacol*, 84(1), 88-92. doi: 10.1016/j.bcp.2012.03.019.
- Demonty, I., Yuguang L., Yvonne E.M.P., et al (2010). The Citrus Flavonoids Hesperidin and Naringin Do Not Affect Serum Cholesterol in Moderately Hypercholesterolemic Men and Women. *The Journal of Nutrition*, 140 (9), 1615–1620, <https://doi.org/10.3945/jn.110.124735>
- Domínguez Avila, J.A., Rodrigo García, J., González Aguilar, G.A., Rosa, L.A. (2017). The Antidiabetic Mechanisms of Polyphenols Related to Increased Glucagon-Like Peptide-1 (GLP1) and Insulin Signaling. *Molecules*, 22 (6), pii: E903. doi: 10.3390/molecules22060903.
- Dorcely, B., Katz, K., Jagannathan, R., et al. (2017). Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 10, 345-361. doi:10.2147/DMSO.S100074.

- Ferreira, P.S., Spolidorio, L.C., Manthey, J.A., Cesar, T.B. (2016). Citrus flavanones prevent systemic inflammation and ameliorate oxidative stress in C57BL/6J mice fed high-fat diet. *Food Funct*, 7(6), 2675-81. doi: 10.1039/c5fo01541c.
- Forbes, J.M., Cooper, M.E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*, 93(1),137-88. doi: 10.1152/physrev.00045.2011.
- Friedwald, W.T., Levy, R.I., Friedrickson, D.S. (1972). Estimation of concentration of LDL cholesterol in plasma without preparation or ultracentrifugation. *Clinical Chem*, 18, 499-502. PMID: 4337382.
- Fukuchi, Y., Hiramitsu, M., Okada, M., et al. (2008). Lemon Polyphenols Suppress Diet-induced Obesity by Up Regulation of mRNA Levels of the Enzymes Involved in β -Oxidation in Mouse White Adipose Tissue. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 43(3), 201-209. doi:10.3164/jcbrn.2008066.
- Gamo, K., Miyachi, H., Nakamura, K., Matsuura, N. (2014). Hesperetin glucuronides induce adipocyte differentiation via activation and expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Biosci Biotechnol Biochem*, 78(6), 1052-9. doi: 10.1080/09168451.2014.910097.
- Gastaldelli, A., Gaggini, M., De Fronzo, R. (2017). Glucose kinetics: an update and novel insights into its regulation by glucagon and GLP-1. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 20 (4), 300-309. doi: 10.1097/MCO.0000000000000384.
- Haidari, F., Heybar, H., Jalali, M.T., Ahmadi, E.K., Helli, B., Shirbeigi, E. (2015) Hesperidin supplementation modulates inflammatory responses following myocardial infarction. *J Am Coll Nutr*, 34(3):205-11. doi: 10.1080/07315724.2014.891269.
- Hiramitsu, M., Shimada, Y., Kuroyanagi, J., Inoue, T., Katagiri, T., Zang, L., Nishimura, Y., Nishimura, N., Tanaka, T. (2014). Eriocitrin ameliorates diet-induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis. *Sci Rep*, 4, 3708. doi:10.1038/srep03708.
- Homayouni, F., Haidari, F., Hedayati, M., Zakerkish, M., Ahmadi, K. (2018). Blood pressure lowering and anti-inflammatory effects of hesperidin in type 2 diabetes; a randomized double-blind controlled clinical trial. *Phytother Res*, 32(6),1073-1079. doi: 10.1002/ptr.6046.
- International Diabetes Federation (2017). IDF Diabetes Atlas. 8th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. <http://www.diabetesatlas.org/>

- Jung, U.J., Lee, M.K., Jeong, K.S., Choi, M.S. (2004). The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Nutr*, 134(10), 2499-503. PMID:15465737.
- Jung, U.J., Lee, M.K., Park, Y.B., Kang, M.A., Choi, M.S. (2006). Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol*, 38 (7) ,1134-45. PMID:16427799.
- Kawser Hossain, M., Abdal Dayem, A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Kumar Saha, S., Yang, G. M., Choi, H. Y., Cho, S. G. (2016). Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 569. doi:10.3390/ijms17040569.
- Kim, J.D., Kang, S.J., Lee, M.K., et al. (2016). C-Peptide-Based Index Is More Related to Incident Type 2 Diabetes in Non-Diabetic Subjects than Insulin-Based Index. *Endocrinology and Metabolism*, 31, 320-327. doi:10.3803/EnM.2016.31.2.320.
- Lai H, Lin N, Xing Z, Weng H, Zhang H. (2015). Association between the level of circulating adiponectin and prediabetes: A meta-analysis. *Journal of Diabetes Investigation*, 6(3), 416-429. doi:10.1111/jdi.12321.
- Lee, J.K. (2011). Anti-inflammatory effects of eriodictyol in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 murine macrophages. *Arch Pharm Res*, 34 (4), 671-9. doi: 10.1007/s12272-011-0418-3.
- Li, C.Z., Jin, H.H., Sun H.X., Zhang, Z.Z., Zheng, J.X., Li, S.H., Han, S.H. (2016). Eriodictyol attenuates cisplatin-induced kidney injury by inhibiting oxidative stress and inflammation. *Eur J Pharmacol*. 5, (772), 124-30. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.12.042.
- Liu, L., Shan, S., Zhang, K., Ning, Z.Q., Lu, X.P., Cheng, Y.Y. (2008). Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from Citrus aurantium up-regulate transcription of adiponectin. *Phytother Res*, 22(10), 1280-3. doi: 10.1002/ptr.2504.
- Matthews, D., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher DF, Turner, R.C. (1985). Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from man. *Diabetologia*, 28, 412-9. PMID: 3899825.
- Minato, K., Miyake, Y., Fukumoto, S., Yamamoto, K., Kato, Y., Shimomura, Y., Osawa, T. (2003). Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci*, 72(14), 1609-16. PMID: 12551749.
- Miyake, Y., Suzuki, E., Ohya, S., Fukumoto, S., Hiramitsu, M., Sakaida, K., Osawa, T., Furuichi, Y. (2006). Lipid-Lowering Effect of Eriocitrin, the Main Flavonoid in Lemon

- Fruit, in Rats on a High-Fat and High-Cholesterol Diet. *Journal Food Science*, 71, S633-S637. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00192.x>.
- Miyake, Y., Yamamoto, K., Tsujihara, N., Osawa, T. (1998). Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids*, 33(7), 689-95. PMID: 9688172.
- Mohammadi, M., Eghtesadi, S., Vafa, M., Haghighian, H.K., Heydari, I., Salehi, M., Amiri, F., Alipour, R. (2015). Effects of Hesperidin Supplementation on Glycemic Control, Lipid Profile and Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized Double Blind Placebo Control Clinical Trial. Research Article, *Acta Biologica Indica*, 4,75-83. eISSN 2279-0160.
- Morand C., Dubray C., Milenkovic D., Lioger D., Martin J.F., Scalbert A., Mazur A. (2011). Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 93(1), 73-80. doi: 10.3945/ajcn.110.004945.
- Navarro, J.F., Mora, C. (2006). Diabetes, inflammation, proinflammatory cytokines, and diabetic nephropathy. *Scientific World Journal*, 6, 908-17. PMID: 16906324.
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245(3), 194-205. doi: 10.1016/j.tox.2007.11.021.
- Parmar, H.S., Jain, P., Chauhan, D.S., Bhinchar, M.K., Munjal, V., Yusuf, M., Choube, K., Tawani, A., Tiwari, V., Manivannan, E., Kumar, A. (2012). DPP-IV inhibitory potential of naringin: an in silico, in vitro and in vivo study. *Diabetes Res Clin Pract*, 97(1), 105-11. doi: 10.1016/j.diabres.2012.02.011.
- Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother Res*, 29(3), 323-31. doi: 10.1002/ptr.5256.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26,1231-7.
- Rehman, K., Akash, M.S.H. (2017). Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? *J Cell Biochem*, 118 (11),3577-3585. doi: 10.1002/jcb.26097.
- Roberts, S., Craig, D., Adler, A., McPherson, K, Greenhalgh, T. (2018). Economic evaluation of type 2 diabetes prevention programmes: Markov model of low- and high-

- intensity lifestyle programmes and metformin in participants with different categories of intermediate hyperglycaemia. *BMC Medicine*, 16 (16). doi:10.1186/s12916-017-0984-4.
- Sireesh, D., Dhamodharan, U., Ezhilarasi, K., Vijay, V., Ramkumar, K.M. (2018). Association of NF-E2 Related Factor 2 (Nrf2) and inflammatory cytokines in recent onset Type 2 Diabetes Mellitus. *Scientific Reports*. 8, 5126. doi: 10.1038/s41598-018-22913-6.
- Unicamp. (2006). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. TACO. 2ªed. Campinas;
- Wasserman, D.H., Wang, T.J., Brown, N.J. (2018). The Vasculature in Prediabetes. *Circ Res*, 122(8), 1135-1150. doi: 10.1161/circresaha.118.311912.
- Wang, X.L., Ye, F., Li, J., Zhu, L.Y., Feng, G., Chang, X.Y., Sun, K. (2016). Impaired secretion of glucagon-like peptide 1 during oral glucose tolerance test in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Saudi Medical Journal*, 37(1), 48–54. doi: <http://doi.org/10.15537/smj.2016.1.12035>.
- WHO Expert Consultation. (2008). Waist Circumference and Waist-to-hip Ratio: Report of WHO Expert Consultation, Geneva.
- Yagi, K. (1998). Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol*, 108, 101-6.
- Yi, L., Ma, S., Ren, D. (2017). Phytochemistry and bioactivity of Citrus flavonoids: a focus on antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and cardiovascular protection activities *Phytochem Rev*, 6 (479). <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9497-1>.
- Yoshida, H., Watanabe, W., Oomagari, H., Tsuruta, E., Shida, M., Kurokawa, M. (2013). Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes. *J Nutr Biochem*, 24, 1276-84. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.10.003.
- Zaidun, N.H, Thent, Z,C, Latiff, A.A. (2018). Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. *Life Sci*, 208, 111-122. doi: 10.1016/j.lfs.2018.07.017
- Zhang, W.Y., Lee, J.J., Kim, Y., Kim, I.S, Han, J.H., Lee, S.G., Ahn, M.J., Jung, S.H., Myung, C.S. (2012). Effect of eriodictyol on glucose uptake and insulin resistance in vitro. *J Agric Food Chem*, 60(31), 7652-8. doi: 10.1021 / jf300601z.

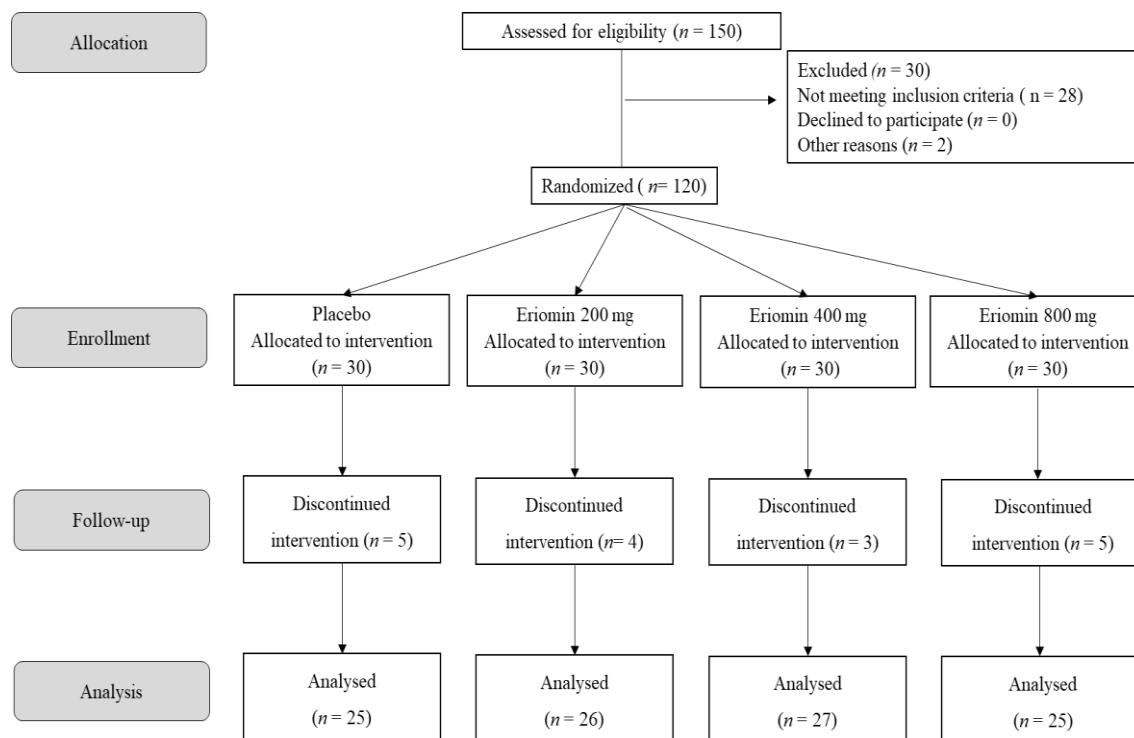


Figure 1. Trial design

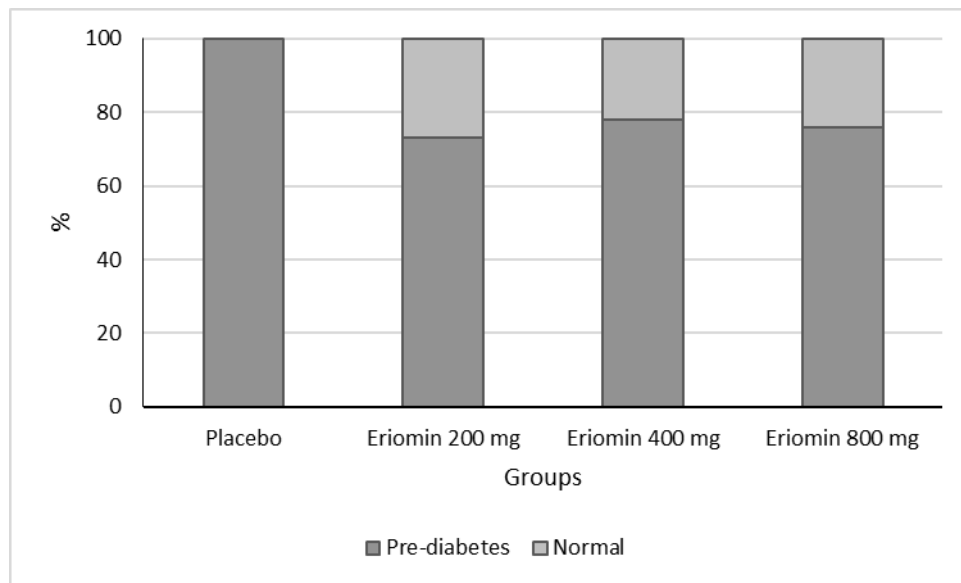


Figure 2. Percentage of individuals with pre-diabetic after Eriomin supplementation

Table 1: Baseline characteristics of pre-diabetic individual's subject to supplementation with 200, 400 or 800 mg/day for 12 weeks

Variables	Eriomin			
	Placebo	200 mg	400 mg	800 mg
	n = 25	n = 26	n = 27	n = 25
Age	47 ± 12	51 ± 11	48 ± 9	51 ± 8
Glucose, mg/dL	104 ± 10	104 ± 13	104 ± 10	103 ± 13
OGTT, mg/dL	150 ± 17	149 ± 21	151 ± 19	151 ± 19
Insulin , µU/mL	19.1 ± 6.5	19.4 ± 7.2	19.3 ± 9.0	19.4 ± 6.6
HOMA-IR	4.70 ± 2.02	4.70 ± 1.38	4.71 ± 2.26	4.71 ± 1.56
HbA1c, %	5.8 ± 0.5	5.8 ± 0.4	5.8 ± 0.5	5.8 ± 0.5
Total Cholesterol, mg/dL	193 ± 32	184 ± 41	190 ± 35	184 ± 40
LDL - cholesterol, mg/dL	116 ± 19	105 ± 19	112 ± 22	106 ± 35
HDL - cholesterol, mg/dL	47 ± 11	46 ± 11	46 ± 8	46 ± 11
Triglycerides, mg/dL	146 ± 78	152 ± 41	151 ± 69	162 ± 93
Aspartate transaminase, U/L	22.1 ± 7.5	22.0 ± 7.0	23.5 ± 7.2	21.5 ± 5.3
Alanine transaminase, U/L	25.6 ± 15.1	24.1 ± 10.5	27.1 ± 12.9	22.6 ± 7.6
Alkaline phosphatase, U/L	63.0 ± 15.6	60.8 ± 18.4	59.8 ± 17.6	59.8 ± 17.6
γ Glutamyltransferase, U/L	42.7 ± 30.8	41.0 ± 34.5	49.8 ± 58.3	34.0 ± 14.4
hsCRP, mg/dL	0.43 ± 0.36	0.44 ± 0.33	0.42 ± 0.30	0.41 ± 0.42
Glucagon-like peptide-1, pmol/L	8.48 ± 1.96	8.52 ± 2.72	8.55 ± 2.75	8.57 ± 2.11
Glucagon, pg/mL	143 ± 19	144 ± 23	142 ± 19	143 ± 14
C-peptide, pg/mL	2122 ± 636	2172 ± 727	2163 ± 767	2151 ± 624
IL-6, pg/mL	6.84 ± 4.33	6.83 ± 3.12	6.82 ± 4.43	6.83 ± 4.92
TNF-α, pg/mL	5.64 ± 1.73	5.66 ± 1.91	5.67 ± 1.88	5.65 ± 1.79
Lipid peroxidation, [MDA] mM	1.77 ± 0.91	1.77 ± 0.58	1.78 ± 0.67	1.77 ± 0.82
Antioxidant capacity, µM	1.87 ± 0.03	1.88 ± 0.09	1.88 ± 0.03	1.87 ± 0.09
BMI, kg/m ²	34.2 ± 7.5	34.3 ± 7.1	33.9 ± 6.6	34.0 ± 7.0
Ratio Waist / Hip	1.06 ± 0.15	1.05 ± 0.10	1.06 ± 0.11	1.06 ± 0.17
Systolic Blood Pressure, mmHg	135 ± 12	133 ± 10	133 ± 11	134 ± 9
Diastolic Blood Pressure, mmHg	78.8 ± 15.6	80.0 ± 8.0	77.8 ± 10.0	81.2 ± 6.7

BMI, body mass index; OGTT, 2 hours' oral glucose tolerance test; HOMA-IR, homeostasis model assessment–insulin resistance; HbA1c, glycated hemoglobin; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL-6: interleukin 6; TNF-α: tumor necrosis factor alpha; BMI, body mass index;

Data are presented as mean ± SD

Anova One-Way, $p \leq 0.05$

Table 2: Biochemical markers of pre-diabetic individual's subject to supplementation with 200, 400 or 800 mg/day for 12 weeks

Variables	Period week	Eriomin			
		Placebo	200 mg	400 mg	800 mg
Glucose, mg/dL	0	104 ± 10	104 ± 13 ^a	104 ± 10 ^a	103 ± 13 ^a
	4	104 ± 13 ^A	99 ± 11 ^{b, B}	101 ± 12 ^{b, B}	100 ± 12 ^{b, B}
	8	103 ± 14 ^A	99 ± 11 ^{b, B}	100 ± 10 ^{b, B}	100 ± 11 ^{b, B}
	12	105 ± 16 ^A	98 ± 10 ^{b, B}	99 ± 10 ^{b, B}	99 ± 11 ^{b, B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	1.0 %	-5.8 %	-4.8 %	-3.9 %
OGGT, mg/dL	0	150 ± 17	149 ± 21 ^a	151 ± 19 ^a	151 ± 19 ^a
	12	151 ± 22 ^A	139 ± 19 ^{b, B}	140 ± 18 ^{b, B}	141 ± 17 ^{b, B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	-0.7 %	-6.7 %	-7.3 %	-6.6 %
			-6.9 %		
Insulin, $\mu\text{U/mL}$	0	19.1 ± 6.5	19.4 ± 7.2	19.3 ± 9.0	19.4 ± 6.6
	4	19.1 ± 7.6	19.1 ± 7.6	18.9 ± 10.3	19.3 ± 5.8
	8	19.0 ± 8.6	19.1 ± 7.2	18.5 ± 7.6	19.2 ± 8.0
	12	19.0 ± 8.9	18.2 ± 7.1	18.0 ± 8.9	19.2 ± 6.3
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	-0.5 %	-6.2 %	-6.7 %	-1.0 %
HOMA-IR	0	4.70 ± 2.02	4.70 ± 1.38 ^a	4.71 ± 2.26 ^a	4.71 ± 1.56 ^a
	4	4.70 ± 2.50	4.67 ± 1.95 ^a	4.66 ± 2.47 ^a	4.64 ± 1.50 ^a
	8	4.68 ± 2.83	4.65 ± 1.82 ^a	4.58 ± 1.98 ^a	4.64 ± 1.64 ^a
	12	4.74 ± 2.81 ^A	4.31 ± 1.77 ^{b, B}	4.39 ± 1.98 ^{b, B}	4.44 ± 1.69 ^{b, B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.9 %	-8.3 %	-6.8 %	-5.7 %
HbA1c, %	0	5.81 ± 0.50	5.82 ± 0.42 ^a	5.81 ± 0.50 ^a	5.80 ± 0.51 ^a
	4	5.81 ± 0.51	5.80 ± 0.45 ^a	5.81 ± 0.52 ^a	5.78 ± 0.61 ^a
	8	5.80 ± 0.51 ^A	5.71 ± 0.45 ^{b, B}	5.72 ± 0.51 ^{b, B}	5.73 ± 0.52 ^{a, A}
	12	5.82 ± 0.53 ^A	5.68 ± 0.41 ^{b, B}	5.70 ± 0.42 ^{b, B}	5.70 ± 0.51 ^{b, B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.2 %	-2.4 %	-1.9 %	-1.7 %
Total Cholesterol, mg/dL	0	193 ± 32	184 ± 41	190 ± 35	184 ± 40
	4	193 ± 29	181 ± 38	190 ± 37	184 ± 41
	8	193 ± 24	181 ± 40	188 ± 30	182 ± 40
	12	195 ± 27	181 ± 40	187 ± 36	182 ± 40
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	1.0 %	-1.6 %	-1.6 %	-1.1 %
LDL-cholesterol, mg/dL	0	116 ± 19	105 ± 19	112 ± 22	106 ± 35
	4	116 ± 17	103 ± 24	112 ± 30	105 ± 37
	8	116 ± 23	103 ± 27	110 ± 23	103 ± 29
	12	117 ± 23	103 ± 26	110 ± 23	103 ± 25
	$\delta_{12-0 \text{ wk})}$	0.9 %	-1.9 %	-1.8 %	-2.8 %
HDL-cholesterol, mg/dL	0	47.3 ± 11.3	46.3 ± 10.9	46.6 ± 7.91	46.0 ± 10.9
	4	47.4 ± 10.0	45.5 ± 9.96	45.5 ± 6.81	45.7 ± 9.91
	8	47.4 ± 11.9	45.5 ± 9.36	45.1 ± 8.07	44.1 ± 10.7
	12	47.6 ± 10.7	45.5 ± 10.6	45.1 ± 8.41	44.0 ± 10.7
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.6 %	-1.7 %	-3.2 %	-4.3 %

Two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak test among groups (placebo, 200, 400 and 800 mg) over 12-wk intervention period; $p \leq 0.05$ Different letters (a, b) indicate difference within the group, and different uppercase letters (A, B) indicate difference between groups.

Table 3: Metabolic and inflammatory markers of pre-diabetic individual's subject to supplementation with 200, 400 or 800 mg/day for 12 weeks

Variables	Period	Eriomin			
	week	Placebo	200 mg	400 mg	800 mg
Glucagon, pg/mL	0	143 ± 19	144 ± 23 ^a	142 ± 19 ^a	143 ± 14 ^a
	12	142 ± 20 ^A	134 ± 21 ^{b,B}	135 ± 19 ^{b,B}	132 ± 14 ^{b,B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	-0.7 %	-6.9 %	-4.9 %	-7.7 %
C-peptide, pg/mL	0	2122 ± 636	2172 ± 727 ^a	2163 ± 767 ^a	2151 ± 624 ^a
	12	2106 ± 675 ^A	2047 ± 613 ^{b,B}	2055 ± 803 ^{b,B}	2046 ± 648 ^{b,B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	-0.8 %	-5.8 %	-5.0 %	-4.9 %
GLP-1, rmol/L	0	8.48 ± 1.96	8.52 ± 2.72 ^a	8.55 ± 2.75 ^a	8.57 ± 2.11 ^a
	12	8.50 ± 1.96 ^A	9.85 ± 2.68 ^{b,B}	9.80 ± 1.95 ^{b,B}	9.89 ± 2.15 ^{b,B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.2 %	15.6 %	14.6 %	15.4 %
hsCRP, mg/dL	0	0.43 ± 0.36	0.44 ± 0.33 ^a	0.42 ± 0.30 ^a	0.41 ± 0.42 ^a
	12	0.43 ± 0.41 ^A	0.38 ± 0.25 ^{b,B}	0.39 ± 0.34 ^{b,B}	0.35 ± 0.30 ^{b,B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.0 %	-13.6 %	-7.1 %	-14.6 %
IL-6, pg/mL	0	6.84 ± 4.33	6.83 ± 3.12 ^a	6.82 ± 4.43 ^a	6.83 ± 4.92 ^a
	12	6.82 ± 4.61 ^A	5.89 ± 2.23 ^{b,B}	5.84 ± 3.04 ^{b,B}	6.03 ± 3.80 ^{b,B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	-0.3 %	-13.8 %	-14.4 %	-11.7 %
TNF- α , pg/mL	0	5.64 ± 1.73	5.66 ± 1.91 ^a	5.67 ± 1.88 ^a	5.65 ± 1.79 ^a
	12	5.63 ± 2.03 ^A	4.98 ± 1.59 ^{b,B}	5.06 ± 1.63 ^{b,B}	5.02 ± 1.96 ^{b,B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	-0.2 %	-12.0 %	-10.8 %	-11.2 %
Adiponectin, μ g/mL	0	18.4 ± 5.6	18.7 ± 5.7 ^a	17.9 ± 7.5 ^a	18.1 ± 7.6 ^a
	12	18.7 ± 5.3 ^A	22.2 ± 6.6 ^{b,B}	21.8 ± 8.9 ^{b,B}	21.1 ± 6.6 ^{b,B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	1.6 %	18.7 %	21.8 %	16.6 %
Lipid peroxidation, [MDA] mM	0	1.77 ± 0.91	1.77 ± 0.58 ^a	1.78 ± 0.67 ^a	1.77 ± 0.82 ^a
	12	1.76 ± 0.94 ^A	1.33 ± 0.67 ^{b,B}	1.53 ± 0.86 ^{b,B}	1.54 ± 0.84 ^{b,B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	-0.6 %	-24.9 %	-14.0 %	-13.0 %
Antioxidant capacity, μ M	0	1.87 ± 0.03	1.88 ± 0.09 ^a	1.88 ± 0.03 ^a	1.87 ± 0.09 ^a
	12	1.88 ± 0.03 ^A	1.99 ± 0.04 ^{b,B}	1.99 ± 0.03 ^{b,B}	1.98 ± 0.03 ^{b,B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.5 %	5.9 %	5.9 %	5.3 %

Two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak test among groups (placebo, 200, 400 and 800 mg) over 12-wk intervention period; $p \leq 0.05$ Different letters (a, b) indicate difference within the group, and different uppercase letters (A, B) indicate difference between groups

Table 4: Liver and renal markers of pre-diabetic individual's subject to supplementation with 200, 400 or 800 mg/day for 12 weeks

Variables	Period week	Eriomin			
		Placebo	200	400	800
Aspartate transaminase (AST), U/L	0	22.1 ± 7.5	22.0 ± 7.0	23.5 ± 7.2	21.5 ± 5.3
	4	22.5 ± 7.5	21.5 ± 5.9	23.6 ± 7.4	23.6 ± 6.6
	8	22.3 ± 7.3	23.3 ± 9.0	22.9 ± 7.9	22.8 ± 7.7
	12	23.4 ± 8.4	23.3 ± 7.8	23.4 ± 8.0	21.8 ± 6.3
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	5.9 %	5.9 %	-0.4 %	1.4 %
			2.3 %		
Alanine transaminase (ALT), U/L	0	25.6 ± 15.1	24.1 ± 10.5	27.1 ± 12.9	22.6 ± 7.6
	4	25.1 ± 13.1	23.1 ± 8.3	29.8 ± 16.0	24.8 ± 9.2
	8	26.2 ± 15.7	26.6 ± 12.4	27.8 ± 13.7	25.5 ± 12.3
	12	26.0 ± 15.7	25.2 ± 12.5	28.7 ± 15.1	23.5 ± 8.4
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	1.6 %	4.6 %	5.9 %	4.0 %
			4.8 %		
Alkaline phosphatase (ALP), U/L	0	63.0 ± 15.6	60.8 ± 18.4	59.8 ± 17.6	59.8 ± 17.6
	4	62.4 ± 15.6	60.7 ± 21.4	57.3 ± 17.6	57.3 ± 17.6
	8	64.4 ± 17.9	61.8 ± 23.0	61.3 ± 21.9	61.3 ± 21.9
	12	64.8 ± 15.9	62.6 ± 26.1	62.3 ± 20.1	62.3 ± 20.1
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	2.9 %	3.0 %	4.8 %	4.2 %
			4.0 %		
Gamma-glutamyltransferase (γ GT), U/L	0	42.7 ± 30.8	41.0 ± 34.5	49.8 ± 58.3	34.0 ± 14.4
	4	41.9 ± 29.4	42.9 ± 38.5	49.8 ± 44.4	35.3 ± 23.4
	8	44.8 ± 32.1	43.0 ± 32.7	50.0 ± 49.5	35.7 ± 20.9
	12	45.4 ± 33.0	41.5 ± 31.5	51.2 ± 49.8	36.3 ± 27.1
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	6.6 %	1.2 %	2.8 %	6.8 %
			3.6 %		
Creatinine, mg/dL	0	0.80 ± 0.18	0.85 ± 0.21	0.82 ± 0.24	0.83 ± 0.16
	4	0.83 ± 0.19	0.84 ± 0.20	0.80 ± 0.18	0.80 ± 0.15
	8	0.82 ± 0.20	0.85 ± 0.16	0.81 ± 0.19	0.81 ± 0.17
	12	0.83 ± 0.22	0.85 ± 0.18	0.81 ± 0.21	0.80 ± 0.18
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	3.8 %	0.0 %	-1.2 %	-3.6 %
			-1.6 %		

Two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak test among groups (placebo, 200, 400 and 800 mg) over 12-wk intervention period; $p \leq 0.05$ Different letters (a, b) indicate difference within the group, and different uppercase letters (A, B) indicate difference between groups

Table 5: Anthropometric markers and blood pressure of pre-diabetic individual's subject to supplementation with 200, 400 or 800 mg/day for 12 weeks

Variables	Period week	Eriomin			
		Placebo	200	400	800
Systolic Blood Pressure, mmHg	0	135 ± 12	133 ± 10 ^a	133 ± 11 ^a	134 ± 9 ^a
	4	133 ± 12	133 ± 10 ^a	133 ± 11 ^a	134 ± 9 ^a
	8	134 ± 10	128 ± 12 ^a	131 ± 11 ^a	129 ± 10 ^a
	12	134 ± 10 ^A	123 ± 11 ^{b,B}	122 ± 13 ^{b,B}	123 ± 9 ^{b,B}
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	-0.7 %	-7.5 %	-8.3 %	-8.2 %
Diastolic Blood Pressure, mmHg	0	78.8 ± 15.6	80.0 ± 8.0	77.8 ± 10.0	81.2 ± 6.7
	4	77.2 ± 11.7	80.0 ± 7.0	77.8 ± 10.1	80.4 ± 6.8
	8	76.4 ± 11.1	80.0 ± 9.8	77.4 ± 9.8	79.2 ± 8.1
	12	76.2 ± 11.8	78.8 ± 9.9	77.4 ± 9.9	78.0 ± 6.5
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	-3.3 %	-1.5 %	-0.5 %	-3.9 %
Body weight, kg	0	95.3 ± 24.5	96.0 ± 22.0	95.9 ± 18.8	96.0 ± 20.9
	4	95.3 ± 24.6	96.0 ± 22.0	95.7 ± 19.1	96.0 ± 21.6
	8	95.2 ± 24.8	96.1 ± 21.7	95.8 ± 19.2	95.7 ± 21.7
	12	95.5 ± 24.3	96.1 ± 22.1	95.7 ± 19.1	95.8 ± 22.0
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.2 %	0.1 %	-0.2 %	-0.2 %
BMI, kg/m ²	0	34.2 ± 7.5	34.3 ± 7.1	33.9 ± 6.6	34.0 ± 7.0
	4	34.4 ± 7.4	34.3 ± 7.1	33.7 ± 6.8	34.0 ± 7.2
	8	34.2 ± 7.6	34.3 ± 7.1	33.8 ± 6.7	33.9 ± 7.2
	12	34.5 ± 6.7	34.2 ± 6.2	33.7 ± 6.9	34.2 ± 7.1
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.9 %	0.3 %	-0.6 %	0.6 %
Lean mass, kg	0	32.3 ± 6.7	32.1 ± 6.2	31.8 ± 5.5	32.0 ± 6.9
	4	32.2 ± 7.2	32.4 ± 6.1	32.0 ± 5.8	32.0 ± 7.3
	8	31.9 ± 7.2	32.2 ± 6.2	32.0 ± 5.8	31.9 ± 7.3
	12	32.4 ± 7.1	32.4 ± 6.4	32.0 ± 5.6	31.9 ± 7.4
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.3 %	0.9 %	0.6 %	-0.3 %
Fat mass, kg	0	38.7 ± 15.6	38.5 ± 16.8	37.8 ± 15.4	39.0 ± 14.3
	4	38.8 ± 15.1	38.2 ± 17.0	37.4 ± 15.6	38.8 ± 14.7
	8	38.8 ± 15.1	38.5 ± 16.8	37.3 ± 15.6	38.0 ± 15.2
	12	38.9 ± 15.2	38.2 ± 16.9	37.3 ± 15.5	38.0 ± 15.4
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.5 %	-0.8 %	-1.3 %	-2.6 %
Body fat, %	0	39.0 ± 9.3	38.9 ± 9.9	38.8 ± 10.7	39.6 ± 8.8
	4	39.1 ± 8.8	38.7 ± 10.2	38.7 ± 11.1	38.9 ± 9.1
	8	39.6 ± 8.4	38.9 ± 10.0	38.5 ± 11.2	38.8 ± 9.5
	12	39.7 ± 8.5	38.5 ± 9.9	38.6 ± 10.8	38.7 ± 9.7
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	1.8 %	-1.0 %	-0.5 %	-2.3 %
Ratio Waist / Hip	0	1.06 ± 0.15	1.05 ± 0.10	1.06 ± 0.11	1.06 ± 0.17
	4	1.06 ± 0.19	1.05 ± 0.10	1.05 ± 0.12	1.05 ± 0.17
	8	1.06 ± 0.19	1.05 ± 0.10	1.05 ± 0.12	1.05 ± 0.18
	12	1.06 ± 0.12	1.05 ± 0.10	1.05 ± 0.10	1.05 ± 0.12
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.0 %	0.0 %	-0.9 %	-0.9 %

Two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak test among groups (placebo, 200, 400 and 800 mg) over 12-wk intervention period; $p \leq 0.05$ Different letters (a, b) indicate difference within the group, and different uppercase letters (A, B) indicate difference between group

Table 6: Dietary parameters of pre-diabetic individual's subject to supplementation with 200, 400 or 800 mg/day for 12 weeks

Variables	Period week	Eriomin			
		Placebo	200	400	800
Energy, Kcal	0	1820 ± 242	1879 ± 214	1769 ± 174	1840 ± 270
	4	1815 ± 264	1893 ± 223	1771 ± 182	1832 ± 257
	8	1817 ± 240	1881 ± 229	1772 ± 192	1840 ± 260
	12	1829 ± 294	1873 ± 240	1768 ± 184	1845 ± 255
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.7 %	-0.3 %	-0.05 %	0.2%
				-0.18 %	
Carbohydrate, g	0	253 ± 34	255 ± 32	248 ± 25	253 ± 40
	4	251 ± 37	256 ± 34	250 ± 26	250 ± 38
	8	252 ± 34	255 ± 35	249 ± 26	252 ± 37
	12	254 ± 41	254 ± 36	248 ± 26	254 ± 37
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.3 %	-0.3 %	0 %	0.4 %
				0.2 %	
Protein, g	0	68.5 ± 9.4	68.8 ± 5.4	68.1 ± 8.9	69.8 ± 9.6
	4	68.0 ± 9.9	69.3 ± 6.0	68.8 ± 9.1	69.7 ± 10.7
	8	68.3 ± 9.3	68.8 ± 6.1	69.0 ± 8.7	69.9 ± 10.2
	12	68.6 ± 11.2	68.7 ± 5.9	68.0 ± 8.8	70.1 ± 10.7
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.1 %	-0.14 %	-0.14 %	0.4 %
				-0.22 %	
Lipids, g	0	61.5 ± 8.6	62.6 ± 7.1	61.5 ± 5.5	62.1 ± 8.4
	4	61.0 ± 9.6	63.1 ± 7.5	61.9 ± 5.6	62.3 ± 8.0
	8	61.2 ± 8.5	62.7 ± 7.6	61.7 ± 6.3	62.9 ± 8.5
	12	61.7 ± 10.2	62.2 ± 7.9	61.6 ± 6.4	62.8 ± 8.3
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.3%	-0.6 %	0.16 %	1.1%
				0.62 %	
Cholesterol, mg	0	244 ± 35	242 ± 28	243 ± 29	246 ± 25
	4	245 ± 38	243 ± 23	246 ± 29	247 ± 23
	8	246 ± 36	247 ± 22	250 ± 24	252 ± 19
	12	244 ± 35	242 ± 28	245 ± 28	248 ± 23
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0 %	0 %	0.8 %	0.8 %
				0.5 %	
Saturated Fatty Acid (SFA), g	0	20.0 ± 3.2	20.2 ± 2.3	20.3 ± 3.0	21.2 ± 2.3
	4	20.5 ± 3.4	20.7 ± 2.5	20.8 ± 2.9	21.7 ± 2.5
	8	21.5 ± 3.4	20.6 ± 2.9	21.8 ± 3.1	22.0 ± 2.5
	12	20.2 ± 3.3	20.0 ± 2.4	20.5 ± 3.0	21.4 ± 2.4
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	1 %	-1 %	-0.9 %	-0.9 %
				-0.9 %	
Fibers, g	0	19.4 ± 3.7	19.6 ± 3.5	19.5 ± 3.4	19.5 ± 2.1
	4	19.1 ± 3.1	19.4 ± 3.3	19.1 ± 3.5	19.2 ± 3.8
	8	19.8 ± 3.0	19.9 ± 2.5	19.7 ± 2.9	19.1 ± 3.1
	12	19.3 ± 3.0	19.4 ± 2.5	19.4 ± 2.8	19.3 ± 2.5
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	-0.5 %	-1 %	-0.5 %	-1 %
				0.8 %	
Vitamin E, mg	0	15.8 ± 3.6	15.4 ± 3.6	15.0 ± 3.1	15.5 ± 1.7
	4	15.5 ± 4.4	15.2 ± 3.1	15.1 ± 2.9	15.6 ± 1.8
	8	15.1 ± 4.8	15.0 ± 3.0	15.0 ± 3.0	15.3 ± 1.9
	12	15.6 ± 4.0	15.5 ± 3.0	15.1 ± 2.9	15.4 ± 2.0
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	-1.2 %	0.6 %	0.6 %	-0.6%
				0.6 %	
Vitamin C, mg	0	55.9 ± 4.0	56.5 ± 7.6	55.1 ± 7.0	55.3 ± 6.0
	4	56.2 ± 4.9	56.8 ± 7.7	54.9 ± 6.6	55.7 ± 6.0
	8	55.7 ± 5.1	56.9 ± 7.9	54.4 ± 6.7	55.1 ± 6.0
	12	56.0 ± 4.1	56.8 ± 8.0	55.2 ± 6.8	55.9 ± 6.1
	$\delta_{(12-0 \text{ wk})}$	0.1 %	0.5 %	0.1 %	1%
				0.5 %	

Two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak test among groups (placebo, 200, 400 and 800 mg) over 12-wk intervention period; $p \leq 0.05$ Different letters (a, b) indicate difference within the group, and different uppercase letters (A, B) indicate difference between groups.

Considerações Finais

A suplementação com flavonoides cítricos por 12 semanas promoveu efeito hipoglicêmico, anti-inflamatório e antioxidante, sugerindo ação benéfica no controle glicêmico de indivíduos pré-diabéticos.

Referências

1. Aguilar-Valles A, Inoue W, Rummel C, Luheshi GN. Obesity, adipokines and neuroinflammation. *Neuropharmacology*. 2015; 96:124-34. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.023.
2. Ahmadi H, Azar ST. The role of incretin-based therapies in prediabetes: a review. *Prim Care Diabetes*. 2014;8(4):286-94. doi: 10.1016/j.pcd.2014.02.005.
3. Al-Rejaie SS, Aleisa AM, Abuhashish HM, Parmar MY, Ola MS, Al-Hosaini AA, Ahmed MM. Naringenin neutralises oxidative stress and nerve growth factor discrepancy in experimental diabetic neuropathy. *Neurol Res*. 2015;37(10):924-33. doi: 10.1179/1743132815Y.0000000079.
4. American Diabetes Association - ADA. Position Statement/ Standards of Medical Care in Diabetes - 2011. *Diabetes Care*. 2011;34(1): S11-S61.
5. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 2018; 41 (1): S13-27. doi:https://doi.org/10.2337/dc18-S002.
6. Assini, JM, Mulvihill, EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2013; 24:34-40.
7. Bagger JI, Knop FK, Lund A, Holst JJ, Vilsbøll T. Glucagon responses to increasing oral loads of glucose and corresponding isoglycaemic intravenous glucose infusions in patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Diabetologia*. 2014;57(8):1720-5.
8. Bagger JI, Knop FK, Lund A, Vestergaard H, Holst JJ, Vilsbøll T. Impaired regulation of the incretin effect in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(3):737-45. doi: 10.1210/jc.2010-2435.
9. Brannick B, Wynn A, Dagogo-Jack S. Prediabetes as a toxic environment for the initiation of microvascular and macrovascular complications. *Experimental Biology and Medicine*. 2016;241(12):1323-1331. doi:10.1177/1535370216654227.
10. Domínguez Avila, J.A.; Rodrigo García, J.; González Aguilar, G.A.; de la Rosa, L.A. The Antidiabetic Mechanisms of Polyphenols Related to Increased Glucagon-Like Peptide-1 (GLP1) and Insulin Signaling. *Molecules*. 2017; 22, 903.
11. David H P, Murugesan J, Kavitha T, Flavanone naringenin: An effective antihyperglycemic and antihyperlipidemic nutraceutical agent on high fat diet fed streptozotocin induced type 2 diabetic rats. *journal of functional foods*. 2015; 363–373.
12. Emanuela F, Grazia M, Marco de R, Maria Paola L, Giorgio F, Marco B. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. *J Nutr Metab*. 2012. doi: 10.1155/2012/476380.
13. Faerch K, Borch-Johnsen K, Holst JJ, Vaag A. Pathophysiology and an etiology of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance: does it matter for prevention and treatment of type 2 diabetes? *Diabetologia*. 2009;52(9):1714-23. doi: 10.1007/s00125-009-1443-3.
14. Ferreira PS, Spolidorio LC, Manthey JA, Cesar TB. Citrus flavanones prevent systemic inflammation and ameliorate oxidative stress in C57BL/6J mice fed high-fat diet. *Food Funct*. 2016; 7:2675-81. doi: 10.1039/c5fo01541c.
15. Gastaldelli A, Gaggini M, DeFronzo R. Glucose kinetics: an update and novel insights into its regulation by glucagon and GLP-1. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2017;20(4):300-309. doi: 10.1097/MCO.0000000000000384.

16. Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C. Flavonoid composition of Citrus juices. *Molecules*. 2007;12(8):1641-73. Review. PMID: 17960080.
17. González K, Fuentes J, Márquez JL. Physical Inactivity, Sedentary Behavior and Chronic Diseases. *Korean Journal of Family Medicine*. 2017;38(3):111-115. doi:10.4082/kjfm.2017.38.3.111.
18. Habegger KM, Heppner KM, Geary N, Bartness TJ, DiMarchi R, Tschöp MH. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(12):689-97. doi: 10.1038/nrendo.2010.187.
19. Haidari F, Heybar H, Jalali MT, Ahmadi Engali K, Helli B, Shirbeigi E. Hesperidin supplementation modulates inflammatory responses following myocardial infarction. *J Am Coll Nutr*. 2015;34(3):205-11. doi:10.1080/07315724.2014.891269.
20. Hajiaghaalipour F, Khalilpourfarshbafi M, Arya A. Modulation of glucose transporter protein by dietary flavonoids in type 2 diabetes mellitus. *Int J Biol Sci*. 2015;11(5):508-24. doi: 10.7150/ijbs.11241.
21. Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(2): E199-206. PMID: 15271645.
22. Homayouni F, Haidari F, Hedayati M, Zakerkish M, Ahmadi K. Hesperidin Supplementation Alleviates Oxidative DNA Damage and Lipid Peroxidation in Type 2 Diabetes: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Phytother Res*. 2017;31(10):1539-1545. doi: 10.1002/ptr.5881.
23. Hribal ML, Fiorentino TV, Sesti G. Role of C reactive protein (CRP) in leptin resistance. *Curr Pharm Des*. 2014;20(4):609-15. PMID: 23688010.
24. Hu Q, Zhang DD, Wang L, Lou H, Ren D. Eriodictyol-7-O-glucoside, a novel Nrf2 activator, confers protection against cisplatin-induced toxicity. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(6):1927-32.
25. Jung UJ, Le, MK, Park, YB., Kang, M.A., Choi, M.S. (2006). Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol*, 38 (7) ,1134-45. PMID:16427799.
26. Kim JD, Kang SJ, Lee MK, Park SE, Rhee EJ, Park CY, Oh KW, Park SW, Lee WY. C-Peptide-Based Index Is More Related to Incident Type 2 Diabetes in Non-Diabetic Subjects than Insulin-Based Index. *Endocrinol Metab*. 2016;31(2):320-7. doi: 10.3803/EnM.2016.31.2.320.
27. Lee SE, Yang H, Son GW, et al. Eriodictyol Protects Endothelial Cells against Oxidative Stress-Induced Cell Death through Modulating ERK/Nrf2/ARE-Dependent Heme Oxygenase-1 Expression. Battino M, ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(7):14526-14539. doi:10.3390/ijms160714526.
28. Manach C; Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 70 (5):727-747.
29. Minato K, Miyake Y, Fukumoto S, Yamamoto K, Kato Y, Shimomura Y, Osawa T. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci*. 2003;72(14):1609-16. PubMed PMID: 12551749.
30. Miyake Y, Shimoi K, Kumazawa S, Yamamoto K, Kinae N, Osawa T. Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of eriocitrin-treated rats. *J Agric Food Chem*. 2000; 48(8),3217-24. PMID: 10956094.

31. Miyake Y, Suzuki E, Ohya S, Fukumoto S, Hiramitsu M, Sakaida K, Osawa T, Furuichi Y. Lipid-Lowering Effect of Eriocitrin, the Main Flavonoid in Lemon Fruit, in Rats on a High-Fat and High-Cholesterol Diet. *Journal Food Science*. 2006; 71, S633-S637. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00192.x>.
32. Mulvihill EE, Huff MW. Protection from Metabolic Dysregulation, Obesity, and Atherosclerosis by Citrus Flavonoids: Activation of Hepatic PGC1 α Mediated Fatty Acid Oxidation. *PPAR Res*. 2012.
33. Nauck MA, Meier JJ. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20(1):5-21. doi: 10.1111/dom.13129. Review
34. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother Res*. 2015;29(3):323-31. doi: 10.1002/ptr.5256.
35. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*. 2016; 29. doi: 10.1017/jns.2016.41.
36. Pratley RE. The early treatment of type 2 diabetes. *Am J Med*. 2013;126(9): S2-9. doi: 10.1016/j.amjmed.2013.06.007.
37. Radin MS. Pitfalls in hemoglobin A1c measurement: when results may be misleading. *J Gen Intern Med*. 2014;29(2):388-94. doi: 10.1007/s11606-013-2595-x.
38. Ren B, Qin W, Wu F, Wang S, Pan C, Wang L, Zeng B, Ma S, Liang J. Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2016;15(73):13-23. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.01.002.
39. Rekha SS, Pradeepkiran JA, Bhaskara M. Bioflavonoid hesperidin possesses the anti-hyperglycemic and hypolipidemic property in STZ induced diabetic myocardial infarction (DMI) in male Wistar rats. 2019;15: 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.jnim.2018.12.004>
40. Rizza S, Muniyappa R, Iantorno M, Kim JA, Chen H, Pullikotil P, Senese N, Tesaro M, Lauro D, Cardillo C, Quon MJ. Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(5): E782-92. doi: 10.1210/jc.2010-2879.
41. Roberts S, Craig D, Adler A, McPherson K, Greenhalgh T. Economic evaluation of type 2 diabetes prevention programmes: Markov model of low- and high-intensity lifestyle programmes and metformin in participants with different categories of intermediate hyperglycaemia. *BMC Medicine*. 2018; 16:16. doi:10.1186/s12916-017-0984-4.
42. Sandeep MS, Nandini CD. Influence of quercetin, naringenin and berberine on glucose transporters and insulin signalling molecules in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed. Pharmacother*. 2017; 94: 605–611.
43. Sireesh D, Dhamodharan U, Ezhilarasi K, Vijay V, Ramkumar KM. Association of NF-E2 Related Factor 2 (Nrf2) and inflammatory cytokines in recent onset Type 2 Diabetes Mellitus. *Scientific Reports*. 2018; 8:5126.
44. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes sociedade brasileira de diabetes 2017-2018. São Paulo. Editora Clannad, 2017.
45. Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 4:93. doi: 10.3389/fendo.2013.00093.

46. Testa R, Bonfigli AR, Genovese S, De Nigris V, Ceriello A. The Possible Role of Flavonoids in the Prevention of Diabetic Complications. *Nutrients*. 2016;8(5):310. doi:10.3390/nu8050310.
47. Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*. 2007; 104:466–479.
48. Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia*. 2012;55(9):2319-26. doi: 10.1007/s00125-012-2598-x.
49. USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. Release 2008. Disponível em: Acesso em: 19 mai. 2018
50. Wasserman DH, Wang TJ, Brown NJ. The Vasculature in Prediabetes. *Circ Res*. 2018;122(8):1135-1150. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.311912.
51. Venkatesh P, Jayasingh K, Srikanth K, Siva R. Cross sectional study of microalbuminuria, C-peptide and fundal changes in pre-diabetics. *International Journal of Advances in Medicine*. 2018; 5 (2): 271-275. <http://dx.doi.org/10.18203/2349-3933.ijam20180943>.
52. Vinayagam R, Xu B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutrition & Metabolism*. 2015; 12:60. doi:10.1186/s12986-015-0057-7.
53. Wilson ML. Prediabetes: Beyond the Borderline. *Nurs Clin North Am*. 2017;52(4):665-677. doi: 10.1016/j.cnur.2017.07.011.
54. Yoshida H, Takamura N, Shuto T, Ogata K, Tokunaga J, Kawai K, Kai H. The citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF-alpha in mouse adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(3):728-32. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.060.
55. Zhang WY, Lee JJ, Kim Y, Kim IS, Han JH, Lee SG, Ahn MJ, Jung SH, Myung CS. Effect of eriodictyol on glucose uptake and insulin resistance in vitro. *J Agric Food Chem*. 2012. 8;60(31):7652-8. doi: 10.1021/jf300601z.
56. Zhang, R. Tsao, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects *Current Opinion in Food Science*. 2016; 33-42. doi: 10.1016/j.cofs.2016.02.002
57. Zou C, Shao J. Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance. *J Nutr Biochem*. 2008;19(5):277-86. PMID: 18054218.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Nome:.....RG.....
.....estado civil....., nascimento __/__/____, residente.....
....., cidade.....,
telefones de contato , declaro ter sido orientado e
esclarecido sobre o protocolo de pesquisa a seguir:

O (A) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa em que o objetivo é orientá-lo sobre a suplementação da eriocitrina combinado a uma alimentação equilibrada por Nutricionista. A Eriocitrina é um antioxidante presente na casca e suco do limão. A equipe de pesquisa irá esclarecer os procedimentos que serão realizados durante o estudo, os quais são descritos a seguir. Em quatro ocasiões distintas ao longo das 12 semanas do nosso estudo (início do estudo, semana 4, 8 e 12), o Senhor (a) participará das seguintes avaliações: (1) Avaliação bioquímica, que inclui a colheita de 30 mL de sangue a ser realizada por técnicos treinados e habilitados do Laboratório de Análises Clínicas São Lucas de Araraquara, permanecendo aproximadamente por 30 minutos em sala específica para exames clínicos laboratoriais, ambiente com temperatura confortável, revistas e TV para entretenimento (2) Avaliação antropométrica (início do estudo, semana 3, 5, 7, 9 e 11), onde serão coletados dados de peso (kg); estatura (m); circunferência da cintura (cm), circunferência abdominal (cm) e do quadril (cm), massa muscular (kg/%) e percentual de gordura por meio de equipamento de bioimpedância no Lab. de Antropometria da FCFAR-UNESP. Tudo será feito com horários marcados em consultas com duração de 30 minutos. Nosso laboratório possui ar condicionado, mesas e cadeiras adequadas para a entrevista, garantindo sua privacidade. A avaliação dietética será feita por meio de Recordatório Alimentar de 24h, Registro Alimentar de 3 dias e Questionário de Frequência de Consumo Alimentar. A sua participação na pesquisa será voluntária e livre de qualquer ônus. O (A) Senhor (a) será ressarcido (a) para o transporte (coletivo), quando houver necessidade de deslocamento para avaliações bioquímicas e antropométricas e, também receberá alimentação (café da manhã) nos dias das colheitas de sangue. É necessário informá-lo que durante a pesquisa o (a) Senhor (a) não poderá estar sob tratamento medicamentoso, ou fazendo suplementação com vitaminas, minerais ou bioflavonoides e, se necessitar de medicamentos ou suplementos, deverá informar imediatamente o pesquisador sobre esta nova condição de saúde. Os riscos que o (a) Senhor (a) será submetido (a) ao participar desta pesquisa são médios, apenas terá o desconforto das colheitas de sangue que serão realizados com material descartável, buscando o menor desconforto possível com equipamentos que minimizem a punção venosa, como por exemplo agulhas ultrafinas, e a possibilidade de hematomas (roxo) na região da punção. As avaliações antropométricas e dietéticas consistem em métodos simples e não invasivos, não ocasionando nenhum risco de ordem física ou psicológica. Os procedimentos aos quais será submetido (a) não provocarão danos físicos ou financeiros, porém, se ocorrer algum transtorno decorrente da pesquisa, este será encaminhado ao serviço público de saúde e, se eventuais gastos decorrentes, será assegurada a indenização por parte da equipe e/ou instituição responsável. Para assegurar sua privacidade, o seu nome será mantido em sigilo antes, durante e após a pesquisa, e se desejar, receberá informações sobre o resultado da pesquisa. O (A) Senhor (a) poderá desistir da pesquisa em qualquer momento, sem nenhum prejuízo ou penalização, mas deverá avisar os pesquisadores se isto ocorrer; deverá notificar qualquer situação de anormalidade relacionada à pesquisa e para

tanto deverá entrar em contato com o pesquisador responsável pelo telefone: (16) 3301-6927. Este termo trata-se de um documento que será emitido em duas vias, sendo uma via para o pesquisador e a outra para o participante. Para outros esclarecimentos e reclamações, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, Araraquara, São Paulo, telefone: (16) 3301-4627. Pelo presente esclarecimento, o (a) Senhor (a) concorda em participar deste estudo “Avaliação de parâmetros metabólicos e moleculares em indivíduos com hiperglicemia intermediária suplementados com eriocitrina: Ensaio clínico paralelo, duplo-cego, randomizado, placebo-controlado” sob responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Thais Borges Cesar.

Araraquara, ____/____/____

Assinatura do Participante

Dra. Thais Borges Cesar

ANEXO B - Questionário de seleção

Nome: _____ Telefone: _____

WhatsApp: _____ E-mail _____

Profissão: _____ Escolaridade: _____

Qual sua disponibilidade de horários para as consultas quinzenais com a nutrição na Unesp? (Pode selecionar mais de uma opção, se for o caso). Em seguida coloque a hora que lhe é conveniente:

Manhã () Horário _____ Tarde () Horário _____

Final da tarde/noite () Horário _____

Qual sua disponibilidade para a coleta de sangue mensal (Serão 4 coletas). A coleta inicia às 7:00h no Laboratório São Lucas da rua Feijó.

Seg () Terça () Quarta () Quinta () Sexta () Sábado ()

Qual sua disponibilidade para a curva glicêmica (Esse exame começa às 6:30h até 10:00h).

Sim () Não ()

I- Antropometria

Peso _____ Altura _____ IMC _____

Perdeu peso nos últimos 3 meses? () Não () Sim Se sim, quanto? _____

II- História Clínica

Glicemia em jejum do último exame _____ (valor) _____ (data)

Glicemia em jejum do penúltimo exame _____ (valor) _____ (data)

1 – Você tem ou teve alguma destas doenças citadas abaixo:

() Colesterol elevado	() Triglicerídeos elevado	() Derrame	() Diabetes
() Hipertensão	() Câncer	() Hepática	() Renal
() Hipotireoidismo	() Hepatite	() HIV	

Outras: _____

2 – (Apenas para mulheres). Você está atualmente grávida ou amamentando?

() Não () Sim (grávida) () Sim (amamentando)

3 - Você faz uso de algum remédio?

() Não () Sim. Qual (s): _____

Quanto tempo: _____

4 – Você tem alguma **alergia** a remédios, alimentos ou outras substâncias?

☐ Não ☐ Sim. Qual (s): _____

5 – Você fuma ?

☐ Não ☐ Sim. Quantos cigarros (ou outro tipo de fumo) por dia? _____

6 – Você consome álcool?

☐ Não ☐ Sim. Qual (s): _____ Quantidade por semana: _____

7- Você pratica atividade física regular?

☐ Não ☐ Sim. Qual (s): _____

Tempo por dia: _____ Dias por semana: _____

8 - Como é o seu funcionamento intestinal?

☐ regular ☐ irregular

III – Informações Dietéticas

9 – Você está atualmente seguindo alguma dieta?

☐ Não

☐ Sim. Qual tipo: _____

☐ prescrita por profissional de nutrição ou médico

☐ prescrita por você mesmo

10 – Você utiliza alguma forma de suplemento alimentar? (ex: vitaminas, minerais, proteínas, etc.)

☐ Não

☐ Sim

ANEXO C- Registro Alimentar

As instruções abaixo irão auxiliar no procedimento do seu registro alimentar. Siga-as corretamente e releia-as sempre que tiver alguma dúvida.

1. Anote tudo o que você comer em 3 dias não consecutivos (exemplo: segunda-feira e quarta-feira ou terça-feira e quinta-feira), sendo um dia do final de semana (sábado ou domingo).
2. Quando você relatar um alimento ou uma bebida, seja o mais claro e preciso possível. Anote tudo no momento em que estiver comendo. Evite reconstruir as refeições de memória, não deixe para anotar depois que tiver acabado de comer. Coloque a marca do produto se for o caso.
3. Registre todos os alimentos que ingerir durante o dia inteiro, até mesmo uma bala, chicletes, etc. Com exceção de água.
4. Forneça o máximo de informações, como por exemplo, se na preparação foi utilizado molho (creme de leite, tomate, branco, etc.), se a carne foi à milanesa, assada ou frita. Indique se os legumes e verduras são cozidos ou crus, servidos com margarina, manteiga, azeite, etc... Indique se o peso correspondente aos alimentos crus ou cozidos.
5. Informe com precisão, sempre que possível, o peso dos alimentos e o volume dos líquidos. Informe se a colher utilizada na medida era café, chá, sobremesa ou sopa, se estava cheia ou rasa; o tamanho da concha ou escumadeira utilizada. Tente descrever bem as porções:
 - a. 1 coxa média de frango, frita com pele.
 - b. 4 colheres (sopa) de cenoura crua ralada
6. Coloque o tamanho dos alimentos caso não saiba o peso (pequeno, médio e grande). Por exemplo: uma maçã pequena, uma pera grande, 1 fatia média de abacaxi.
7. Informe o tipo de pão que você costuma comer; pão de forma, branco/ francês, integral, etc. Anote tudo que foi utilizado no pão (manteiga, margarina, geleia, requeijão, queijo, etc.). Anote todos os ingredientes utilizados nas saladas e sanduíches (alface, tomate, vinagrete, cenoura, etc.).

Registro Alimentar

Nome:

Data: __/__/__ Dia da semana: D S T Q Q S S

	Quantidade	Alimento
Café da Manhã Hora: Local:		
Lanche Manhã Hora: Local:		
Almoço Hora: Local:		
Lanche Tarde Hora: Local:		
Jantar Hora: Local:		
Ceia Hora: Local:		

Marque a melhor opção: A alimentação de hoje foi: ____ Fora do hábito ____ Habitual

ANEXO D- Questionário Efeitos Colaterais

Nome: _____ Data: ____/____/____

Marque (+) naquelas reações que você apresentou:

Reações	Ocorrência (+)
Gastrointestinais	
Náuseas	
Vômitos	
Falta de apetite	
Diarreia	
Cólicas intestinais	
Boca seca	
Prisão de ventre	
Cardiovasculares	
Palpitações	
Queda da pressão	
Aumento da pressão	
Dor no peito	
Psiquiátricas	
Ansiedade	
Sonolência	
Desorientação	
Insônia	
Irritabilidade	
Neurológicos	
Dor de cabeça	
Formigamento	
Zumbidos	
Tonturas	
Cutâneos	
Manchas	
Coceiras	
Outros	

Começou a fazer uso de algum medicamento? (Qual? Quanto tempo?)

ANEXO E- Acompanhamento Exames Bioquímicos



Nome: _____

	1° exame	2° exame	3° exame	4° exame
DATA				
Colesterol				
Triglicérides				
HDL-C				
LDL-C				
ALT				
AST				
Fosfatase Alcalina				
Gama GT				
Creatina				
PCR-US				
Hemoglobina Glicada				
Glicose				
Insulina				
HOMA- IR				

Observações: _____
