UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

MONIKE GARLIPP PICCHI

**Efeitos do ácido ascórbico em biomarcadores de
estresse oxidativo em nadadores de alto rendimento
de Ribeirão Preto/SP**

Ribeirão Preto
2010

MONIKE GARLIPP PICCHI

Efeitos do ácido ascórbico em biomarcadores de estresse oxidativo em nadadores de alto rendimento de Ribeirão Preto/SP

Tese de mestrado apresentada à comissão de Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior

Ribeirão Preto
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Garlipp-Picchi, Monike

Efeitos do ácido ascórbico em biomarcadores de estresse oxidativo em nadadores de alto rendimento de Ribeirão Preto/SP.

Ribeirão Preto, 2010.

110 p. : il. ; 30 cm

Tese de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica. Opção: Investigação Biomédica

Orientador: Jordão Jr, Alceu Afonso.

1. Estresse oxidativo. 2. Vitamina C. 3. Ácido ascórbico. 4. Nadadores

FOLHA DE APROVAÇÃO

Monike Garlipp Picchi

Efeitos do ácido ascórbico em biomarcadores de estresse oxidativo em nadadores de alto rendimento de Ribeirão Preto/SP.

Tese de mestrado apresentada à comissão de Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Carla Nonino Borges

Instituição: FMRP/USP

Assinatura:

Prof. Dr. Marcelo Marcos Piva Demarzo

Instituição: Depto. Medicina - UNIFESP

Assinatura:

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior

Instituição: FMRP/USP

Assinatura:

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Luiz Cláudio pelo apoio, carinho e compreensão, aos meus pais Rita e Gunther pelo orgulho que expressam e ao meu avô Waldir por ter me incentivado à pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior pela amizade, todo auxílio e compreensão, e por ter me conduzido desde a iniciação científica até o mestrado.

Aos técnicos de laboratório e amigos Paula Payão, Virgínia e José Eduardo Bueno pelo auxílio na realização das dosagens.

Aos amigos Andresa, Gabriela, Mirele, Nilian e Rafael pelas ajudas em meus momentos de ansiedade e dúvidas, e conversas descontraídas sempre importantes.

Aos professores e funcionários do curso de Nutrição e Metabolismo que estão sempre presentes participando da minha formação científica.

Ao meu marido, pais, irmã, avós, tios e primos, que são meus maiores espectadores, torcedores e carinhosamente me fazem ter muita confiança nesta jornada.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado durante a realização deste projeto.

Aos nadadores que participaram da pesquisa, contribuindo para estes resultados.

RESUMO

GARLIPP-PICCHI, M. Efeitos do ácido ascórbico em biomarcadores de estresse oxidativo em nadadores de alto rendimento de Ribeirão Preto/SP. 2010. 110 f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O exercício físico intenso altera o sistema antioxidante, aumentando a geração de radicais livres e/ou diminuindo a concentração de antioxidantes. Assim o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da oferta de vitamina C através de um suplemento alimentar e dieta rica em ácido ascórbico no estresse oxidativo induzido pelo exercício. A amostra foi composta por 13 nadadores de elite (6 homens e 7 mulheres), com idades entre 18 e 26 anos, IMC médio 21,8kg/m², que treinavam em média 19,4h semanais. Os atletas foram submetidos à carga de exercício aguda em 3 fases, controle (C), dieta rica em vitamina C (D) e suplemento de vitamina C (S), nas quais amostras de sangue foram colhidas antes, imediatamente após e 24 horas depois do exercício, para determinação bioquímica e do estresse oxidativo. O uso de suplementos alimentares foi feito pela maioria dos nadadores (92,3%), e os suplementos mais usados eram Maltodextrina, associação de proteína e carboidrato, enquanto o relato do consumo de antioxidantes não foi muito freqüente (25%). Em relação ao consumo de antioxidantes, os nadadores apresentavam consumo alimentar variável de vitamina C, sendo que muitos deles apenas adequaram o consumo devido à adição feita pelo estudo. O consumo de vitamina E foi inadequado para todos os atletas, já o consumo de selênio, retinol e zinco tiveram uma grande oscilação. Durante as fases o único antioxidante que apresentou flutuações foi o ácido ascórbico, que foi menor na fase C em relação às outras fases. Para a maioria dos indivíduos o consumo de carboidrato e fibras se mostrou insuficiente, e o de lipídeos e calorias adequados, enquanto o consumo de proteínas variou bastante. O uso de dieta rica em vitamina C favoreceu uma menor peroxidação lipídica em nadadores de alto rendimento, já que apresentou menores valores de FOX, e diminuição da peroxidação lipídica após exercício, pela diminuição dos valores de TBARS, enquanto tiveram aumento dos níveis de vitamina C no plasma logo após o exercício. Enquanto o uso de suplemento de vitamina C, que também conteve a peroxidação lipídica após exercício, aumentou o poder antioxidante nos mesmos nadadores, devido maiores níveis do antioxidante GSH. Os quais sem uso de nenhuma adição de vitamina C tiveram um maior dano hepático e tecidual, pois apresentaram maiores níveis de TGO, menores níveis de antioxidantes, devido aos baixos níveis de vitamina C e GSH, e um aumento do ácido úrico, um antioxidante que aumenta em situações onde há grande quantidade de radicais livres presentes. Ainda pode-se verificar que, antes do exercício, quanto mais ácido ascórbico na dieta mais vitamina C, menos TGO e menos ácido úrico no sangue; e ainda logo após o exercício e 24 horas depois quanto mais ácido ascórbico menos TGO e menos ácido úrico séricos. Sendo assim as mudanças observadas com a adição de vitamina C à dieta de nadadores de alto rendimento sugere um importante papel do ácido ascórbico plasmático e da suplementação alimentar na defesa contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Vitamina C. Ácido ascórbico. Nadadores

ABSTRACT

GARLIPP-PICCHI, M. Effects of ascorbic acid on oxidative stress biomarkers in high-performance swimmers of Ribeirão Preto/SP. 2010. 110 f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The strenuous exercise alters the antioxidant system by increasing the generation of free radicals and / or decreasing the concentration of antioxidants. Then the aim of this study was to investigate the effects of supply of vitamin C through a dietary supplement and diet rich in ascorbic acid in the exercise-induced oxidative stress. The sample was compound of 13 elite swimmers (6 men and 7 women) aged between 18 and 26 years, average BMI 21.8 kg / m², who trained on average 19.4 hours per week. The athletes were submitted to acute exercise load in three phases: control (C), diet rich in vitamin C (D) and supplement vitamin C (S), in which blood samples were collected before, immediately after and 24 hours after exercise to biochemical determination and oxidative stress. The use of dietary supplements is done by most of the swimmers (92.3%), and supplements most used were maltodextrin, association of protein and carbohydrate, while the report of consumption of antioxidants was not very frequent (25%). Regarding the consumption of antioxidants, the swimmers had dietary vitamin C variable, and many of them just adjusted consumption due to addition made by the study. The consumption of vitamin E was inadequate for all athletes, while the consumption of selenium, retinol and zinc had a great oscillation. During the phases the only antioxidant that showed fluctuations was ascorbic acid, which was lower in phases C when compared to other phases. For most individuals the consumption of carbohydrates and fibers were insufficient, and lipid and calories adequate, while protein intake varied widely. The use of diet rich in vitamin C favored a lower lipid peroxidation in swimmers high performance, then showed lower values of FOX, and decreased lipid peroxidation after exercise by the decrease in TBARS values, while they had increased levels of vitamin C plasma immediately after exercise. While the use of supplement vitamin C, which also contained the lipid peroxidation after exercise, increased the antioxidant power of the same swimmers, due higher levels of the antioxidant GSH. This without use addition of vitamin C had a greater damage liver and tissue, because they showed higher levels of TGO, lower levels of antioxidants, due lower levels of vitamin C and GSH, and increased uric acid, an antioxidant that increases in situations where there are lots amount the free radicals presents. Further can be seen that, before exercise, the more ascorbic acid in vitamin C diet, less TGO and less uric acid in blood, and even after exercise and 24 hours after the more ascorbic acid less serum TGO and uric acid. Thus the observed change with the addition of vitamin C to the diet of high-performance swimmers suggests an important role of ascorbic acid and dietary supplementation in protecting against exercise-induced oxidative stress.

Keywords: Oxidative stress. Vitamin C. Ascorbic Acid. Swimmers

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Idade (anos) e valores de Índice de Massa Corporal (IMC), em kg/m ² , nas diferentes fases do estudo	49
Tabela 2 – Número de indivíduos com consumo adequado de macro e micronutrientes	53
Tabela 3 – Valores médios de consumo habitual (3 dias antes da coleta) e do dia da coleta nas diferentes fases do estudo, dos macro e micronutrientes.....	55
Tabela 4 – Valores médios e desvios-padrão dos exames bioquímicos de jejum nas diferentes fases.....	57
Tabela 5 – Valores médios e desvios-padrão dos marcadores de estresse oxidativo, antioxidantes, marcadores de lesão hepática e tecidual, e marcadores de alterações fisiológicas, antes do exercício (AE), logo após (LA) e 24 horas depois (24h).....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Consumo de suplemento alimentar, em porcentagem (%)	50
Gráfico 2 – Suplementos alimentares mais citados como consumidos	50
Gráfico 3 – Correlação entre concentração sérica de vitamina C antes do exercício e o consumo de ácido ascórbico	68
Gráfico 4 – Correlação entre os níveis séricos de vitamina C e E, 24 horas após exercício na fase S.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabolismo de redução da vitamina C.	24
Figura 2 – Fluxograma com as etapas da coleta dentro de cada fase do estudo.....	36
Figura 3 – Cronograma das temporadas de 2008 versus a intensidade de cada período, e datas dos campeonatos e das coletas de dados	43
Figura 4 – Concentrações plasmáticas médias das vitaminas antioxidantes, vitamina C e vitamina E nas diferentes fases, antes do exercício, logo após o exercício e 24 horas depois	59
Figura 5 – Concentrações plasmáticas médias dos antioxidantes glutathiona (GSH) e ácido úrico nas diferentes fases, antes do exercício, logo após o exercício e 24 horas depois	60
Figura 6 – Concentrações plasmáticas médias dos marcadores de lesão hepática (transaminase glutâmico oxalacética - TGO) e lesão muscular (creatina quinase - CK) nas diferentes fases, antes do exercício, logo após o exercício e 24 horas depois	62
Figura 7 - Concentrações plasmáticas médias dos marcadores de peroxidação lipídica TBARS total, TBARS livre e FOX nas diferentes fases, antes do exercício, logo após o exercício e 24 horas depois.....	63
Figura 8 - Concentrações plasmáticas médias dos marcadores de alterações fisiológicas (creatinina e uréia) nas diferentes fases, antes do exercício, logo após o exercício e 24 horas depois	65
Figura 9 – Gráficos de correlação entre as variáveis ácido ascórbico da dieta e TGO sérico, antes do exercício (A), logo após o exercício (B) e 24 horas depois do exercício (C).....	69
Figura 10 – Gráficos de correlação entre as variáveis ácido ascórbico da dieta e ácido úrico sérico, antes do exercício (A), logo após o exercício (B) e 24 horas depois do exercício (C)	70
Figura 11 – Correlação entre os níveis de vitamina C e ácido úrico séricos, antes do exercício (A) e logo após na fase S (B).....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI – Ingestão Adequada
ALT – Alanina Aminotransferase
AST – Aspartato Aminotransferase
ATP – Adenosina Trifosfato
BHT – Hidroxitoluenibutilato
CAT – Catalase
CK – Creatina Quinase
CT – Colesterol Total
DHA – Dehidroascorbato
DRIs – Dietary Reference Intake
EAR – Necessidade Média Estimada
EO – Estresse Oxidativo
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
FOX – Método Ferrico-Xilenol *Orange*
GPx- Glutathione Peroxidase
GR – Glutathione Redutase
GSH – Glutathione Reduzida
GSSG – Glutathione Oxidada
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
IC – Intervalo de Confiança
IMC – Índice de Massa Corpórea
LOOH – Hidroperóxidos de Lipídeo
MDA – Malonaldeído
PC – Proteínas Carboniladas
RDA – Ingestão Dietética Recomendada
SOD – Superóxido Dismutase
TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TGO – Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP – Transaminase Glutâmico Pirúvica
VCT – Valor Calórico Total
XOD – Xantina Oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Efeitos benéficos e prejudiciais das Espécies Reativas de Oxigênio	15
1.2 Sistema antioxidante	17
1.3 Medidas de estresse oxidativo	17
1.4 Exercício físico, estresse oxidativo e sistema antioxidante	19
1.5 Suplementação de antioxidantes	22
1.6 Vitamina C	23
1.6.1 Disponibilidade e transporte de vitamina C	25
1.6.2 Necessidade Nutricional de Vitamina C para atletas	26
1.6.3 Efeitos pro-oxidante da Vitamina C	27
2. HIPÓTESE	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAS E MÉTODOS	34
4.2 Indivíduos	34
4.3 Delineamento do estudo	35
4.4 Avaliação do Consumo Alimentar	36
4.5 Avaliação Bioquímica	38
4.5.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBRAS – “ <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> ”)	39
4.5.1.1 TBARS livre	39
4.5.1.2 TBARS total	39
4.5.2 Determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) pelo método férrico - xilenol <i>orange</i> (FOX)	39
4.5.3 Glutathiona reduzida (GSH) e tióis totais	40
4.5.4 Determinação de vitaminas no plasma	40
4.5.4.1 Vitamina C	40
4.5.4.2 Vitamina E	41
4.6 Protocolo de treinamento	41
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47

6. RESULTADOS	49
6.2 Uso de suplementos alimentares	50
6.3 Consumo Alimentar	51
6.3.1 Adequação de consumo alimentar	51
6.3.2 Comparação de consumo alimentar	53
6.4 Parâmetros Bioquímicos	56
6.4.1 Adequação dos valores basais de antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo	57
6.4.2 Comparações entre as fases e dentro das fases	58
6.4.2.1 Antioxidantes	58
6.4.2.2. Marcadores de lesão hepática e muscular, e peroxidação lipídica ...	61
6.4.2.3 Marcadores de alterações fisiológicas	64
6.5 Correlações	68
7. DISCUSSÃO	74
8. CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS	104
ANEXO A – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	111

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O interesse pelo estudo de radicais livres e antioxidantes tem se intensificado ultimamente, pelo possível papel dessas substâncias na patogênese de diversas doenças (VANNUCCHI et al, 1998). Radicais livres são moléculas com um ou mais elétrons não pareados na camada externa, são instáveis e muito reativas, já que tendem a emparelhar-se a um elétron de outra molécula, oxidando-a, e possuem tempo de meia-vida muito curto, de milissegundos a nanosegundos (FINAUD; LAC; FILARE, 2006). Nesta tentativa de se estabilizar, o radical livre cede ou retira elétrons de átomos ou moléculas na sua vizinhança tornando-os, por sua vez, novos radicais livres, ocorrendo verdadeiras cascatas oxidativas (ZANELLA; SOUZA; GODOY, 2007). Embora exista uma imensidão de radicais livres (átomos de hidrogênio, íons de metais de transição, radicais de carbono, radicais de enxofre), as espécies reativas de oxigênio (EROs) representam a classe mais importante de radicais gerados nos sistemas biológicos (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

As EROs são continuamente produzidas por uma variedade de estímulos ambientais, como poluição do ar, consumo excessivo de nutrientes (SIES; STAHL; SEVANIAN, 2005), exercício físico (VOLLAARD; SHEARMAN; COOPER, 2005), ainda mudanças fisiológicas como estresse físico e mental (BLOOMER, 2008), exposição à radiação, cigarro, álcool e através de fontes endógenas, como durante o metabolismo do oxigênio (FINAUD; LAC; FILARE, 2006).

Condições que aceleram ou favorecem a produção de EROs podem servir para desarmar a capacidade do sistema de defesa antioxidante, causando uma permanente mudança no balanço de redução, que pode induzir a efeitos prejudiciais de dano oxidativo à ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, assim como mudanças na expressão de genes que promovem a apoptose de células saudáveis e inflamação sistêmica (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). Então o termo estresse oxidativo (EO) é utilizado em circunstâncias nas quais o “desafio” por radicais livres resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos. Pode-se dizer que estresse oxidativo é uma condição na qual a produção celular de pró-oxidantes excede a capacidade fisiológica dos sistemas de defesa antioxidante, endógeno e exógeno (BLOOMER et al., 2005).

Os ácidos graxos poliinsaturados que estão na membrana lipídica podem ser degradados através de uma sequência de reação em cadeia da peroxidação lipídica. As proteínas podem sofrer oxidação levando a modificação na atividade enzimática, alterando assim o funcionamento celular normal. E a reação de radicais com ácidos desoxirribonucleicos (DNA) podem levar a alterações nas bases de nucleotídeos, que certamente tem o potencial mutagênico (BLOOMER, 2008).

Apesar de induzir efeitos prejudiciais, as EROs estão envolvidas em fenômenos fisiológicos importantes, como por exemplo, a imunidade (FINAUD; LAC; FILARE, 2006), sinalização celular, regulação da reorganização da transcrição do gene e apoptose. Assim, são essenciais para função fisiológica normal, e níveis saudáveis, que não excedem certo limite desconhecido, não apresentam problema (BLOOMER, 2008).

1.1 Efeitos benéficos e prejudiciais das Espécies Reativas de Oxigênio:

Entre os efeitos positivos das EROs podemos citar o envolvimento no processo de imunidade, em particular por agir contra antígenos durante o processo de fagocitose. Os neutrófilos e macrófagos são os responsáveis por destruir estas substâncias estranhas através da produção de radicais livres. E este papel aumenta durante a inflamação, que pode ser causada pelo exercício físico, particularmente por exercícios intensos e traumatizantes. Ainda, o envolvimento na ativação de enzimas, na detoxificação de drogas ou facilitando a repleção de glicogênio. As EROs também têm essencial papel na contração muscular, sua inibição leva a perda de força das fibras musculares contráteis. Contrariamente, o aumento da produção de EROs leva a um aumento da força de contração. Contudo uma grande quantidade de EROs no tecido muscular implica em fadiga muscular e pode representar um de seus efeitos negativos (FINAUD; LAC; FILARE, 2006).

Existem algumas situações onde ocorre uma formação desprogramada de EROs. Uma das principais vias de geração de radicais livres no sistema biológico envolve o transporte de elétrons na mitocôndria, onde o oxigênio (O_2) é usado para produção de Adenosina Trifosfato (ATP). Sob condições normais, na cadeia respiratória, 95-99% do oxigênio consumido é reduzido em água na mitocôndria (BLOOMER, 2008), contudo 1-5% desse O_2 formarão EROs. Sendo a formação de

EROs proporcional a atividade da cadeia respiratória (FINAUD; LAC; FILARE, 2006). As EROs também podem ser produzidas através do metabolismo das prostaglandinas, a auto-oxidação de catecolaminas e ainda atividade das enzimas xantina oxidase (geradora do radical superóxido) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH oxidase) (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

O processo de isquemia-reperfusão é a segunda maior fonte de EROs, e isto ocorre após intervenções cirúrgicas ou choques e durante atividade física. Durante exercício intenso, o fluxo sanguíneo é desviado para territórios ativos, assim como o músculo esquelético, enquanto outros tecidos (por exemplo, rins e região esplâncnica) podem estar em uma situação de hipóxia transitória. Após o exercício esses tecidos são re-oxigenados, e isto pode ser associado à produção de EROs, através da conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase (XOD), que catalisa a degradação da hipoxantina em xantina e conseqüentemente ácido úrico (COOPER et al., 2002). Ainda a atividade física aumenta a oxidação de moléculas como hemoglobina e mioglobina, tornando o ferro disponível para participar da formação de EROs, já que junto com o cobre são íons muito ativos em reações de oxido-redução (ZANELLA; SOUZA; GODOY, 2007) e induzem outros processos que também envolvem a formação de EROs, como aumento de temperatura central, aumento de catecolaminas e ácido láctico, além de acidose e inflamação, característicos de exercício físico supra máximo (FINAUD; LAC; FILARE, 2006).

Então as EROs não são inerentemente prejudiciais; contudo, em resposta a exposição crônica à produção excessiva e/ou anormal de EROs, o sistema pode tornar-se desbalanceado (radicais livres > defesas antioxidantes), resultando em uma mudança no balanço de redução intracelular para um ambiente mais oxidativo, promovendo dano oxidativo, inflamação e doenças (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). Todas essas deteriorações fazem parte de algumas doenças degenerativas como catarata, alguns tipos de cânceres, doença de Alzheimer e Parkinson (FINAUD; LAC; FILARE, 2006) e estão envolvidas na etiologia da aterosclerose, diabetes, doenças inflamatórias crônicas e envelhecimento (DUARTE; LUNEC, 2005).

1.2 Sistema antioxidante:

A produção de EROs pode, contudo, ser balanceada pela existência de defesas antioxidantes celulares (DUARTE; LUNEC, 2005), que mimetizam a formação de EROs ou neutralizam os efeitos danosos quando formados (BLOOMER, 2008). Antioxidante é uma substância que ajuda a reduzir a severidade do estresse oxidativo, ou por formar um radical menos ativo, ou por suprimir a reação em cadeia de radicais livres com os substratos, lipídeos, proteínas e DNA. Existem antioxidantes enzimáticos (endógenos) e não enzimáticos (maioria obtido pela alimentação). Enzimas antioxidantes são: superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPX). E antioxidantes não enzimáticos são: vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), flavonóides, glutathione, ácido úrico e micronutrientes (ferro, cobre, zinco, selênio, manganês), os quais agem como cofatores enzimáticos, entre outros. Entretanto, se a produção de radicais livres é maior que a atividade antioxidante, ocorre um estado de estresse oxidativo com danos celulares (FINAUD; LAC; FILARE, 2006).

A eficiência do sistema antioxidante depende do consumo nutricional (vitaminas e minerais) e da produção de enzimas antioxidantes endógenas, a qual pode ser modificada pelo exercício, treinamento, alimentação e envelhecimento. A alimentação é responsável por oferecer importante parte de antioxidantes, porém em atletas o consumo insuficiente de micronutrientes é frequentemente reportado (FINAUD; LAC; FILARE, 2006).

1.3 Medidas de estresse oxidativo:

O estresse oxidativo pode ser estimado pela mensuração de radicais livres; pela determinação de biomarcadores de danos em lipídeos, proteínas e moléculas de DNA; e atividade e concentração de enzimas antioxidantes (FINAUD; LAC; FILARE, 2006). Os resultados devem ser interpretados com cautela devido às possibilidades de contradições (JENKINS, 2000). A detecção do estresse vai depender do tipo de biomarcador escolhido (sensibilidade e especificidade), do tecido da amostra, do tempo de coleta da amostra e da análise empregada. Estas

variáveis podem explicar, parcialmente, algumas das inconsistências presentes na literatura (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

Devido à alta reatividade e tempo de meia vida relativamente muito curto dos EROs, medidas diretas são extremamente muito difíceis de serem empregadas (SOUSA; FERANDES; CYRINO, 2006). Ainda devido ao alto custo dos equipamentos e necessidade de mão de obra altamente qualificada, a maioria das pesquisas relacionando radicais livres e estresse oxidativo tem utilizado métodos indiretos de avaliação (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). A análise pode ser feita em vários fluidos corporais, sangue, saliva ou urina, e ainda nos músculos e alguns tecidos (BLOOMER, 2008).

A avaliação indireta do estresse oxidativo envolve a medida de produtos moleculares estáveis formados pela reação de EROs com certas biomoléculas. Produtos moleculares comuns incluem metabólitos estáveis (i.e, nitrato/nitrito), e/ou concentração da oxidação de produtos alvo, incluindo produtos finais da peroxidação lipídica [isoprostanos, malonaldeído (MDA), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroperóxidos de lipídeos (LOOH), entre outros], oxidação de proteínas [proteínas carboniladas (PC), oxidação individual de aminoácidos, nitrotirosina], e ácidos nucleicos [8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), oxidação de bases de DNA (via avaliação do cometa)]. Adicionalmente, o EO pode ser avaliado pela observação de alterações no sistema de defesa antioxidante endógeno. Isto é tipicamente feito pela medida de mudanças na redução do maior antioxidante endógeno, a glutathione, assim como nos níveis circulantes de vitamina E e vitamina C. Além disso, a atividade de certas enzimas antioxidantes [i.e SOD, GPx, catalase (CAT), glutathione redutase (GR)] pode ser avaliada como indicadores de EO imposto nos tecidos, e avaliações de capacidade antioxidante total (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

Os lipídeos têm recebido mais atenção em relação à carga aguda de exercício. O processo auto catalítico da peroxidação lipídica está relacionado ao aumento da respiração mitocondrial e distúrbios no transporte de elétrons associados com aumento no consumo de oxigênio durante o exercício e envolve degradação de ácidos graxos poliinsaturados e fosfolipídeos através de uma reação em cadeia (BLOOMER, 2008).

Enquanto é bem aceito que EROs promovem oxidação em lipídeos após exercício agudo, pouca atenção é dada a oxidação de proteínas. Isto pode ser

porque as proteínas sofrem constante *turnover* (rotação de estoque) dentro do corpo humano, e algum dano devido EROs pode não resultar em acúmulo significativo de proteínas estruturais modificadas. Mas algumas investigações demonstram significativo dano oxidativo de proteína, freqüentemente medido pela presença de derivados de carbonil. Em relação ao dano ao DNA induzido pelo exercício, a técnica mais comumente usada nos últimos anos é a medida da formação de 8-OHdG, que não é um intermediário normal do metabolismo de nucleotídeo. Assim sua presença indica dano oxidativo ao DNA (BLOOMER, 2008).

1.4 Exercício físico, estresse oxidativo e sistema antioxidante:

Desde os primeiros achados de aumento na peroxidação lipídica após exercício aeróbio agudo em 1978 (DILLARD et al., 1978), os estudos sobre estresse oxidativo e exercício têm expandido substancialmente, evidenciados pelo número de investigações conduzidas nos últimos 30 anos. Este interesse é devido à crescente consciência do papel de EROs nas doenças humanas, a promoção do exercício como um meio de melhorar e/ou manter a saúde, assim como o difundido desenvolvimento e disponibilidade de vários antioxidantes. Embora os primeiros trabalhos mostrassem que o exercício induzia a produção de EROs como um potencial prejuízo as funções fisiológicas (i.e. diminuição de performance e função imune, e aumento da fadiga), os trabalhos mais recentes estão investigando um papel alternativo da produção de EROs sob o aspecto das favoráveis adaptações induzidas pelo exercício (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

A formação de EROs depende do tipo de exercício (aeróbio, anaeróbio), da sua intensidade e duração, já que os exercícios diferem no requerimento de energia, consumo de oxigênio e estresse mecânico imposto aos tecidos (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). Porém várias investigações mostram um aumento na produção de EROs durante e após o exercício, através do aumento em vários biomarcadores do estresse oxidativo, tanto após exercício aeróbio agudo (VOLLAARD; SHEARMAN; COOPER, 2005) como exercício anaeróbio (BLOOMER; GOLDFARB, 2004). Este aumento na produção pode ou não resultar em estresse oxidativo. Para ocorrer estresse oxidativo a produção de EROs durante o exercício

deve superar o sistema de defesa antioxidante (BLOOMER; GOLDFARB; MCKENZIE, 2006).

O exercício aeróbio é acompanhado por um aumento do consumo de oxigênio ($VO_2\text{max}$), em 10 a 15 vezes que em condições de repouso (AGUILÓ et al., 2007), e ainda, aumento em 100 a 200 vezes o fluxo de oxigênio no músculos ativos (ZANELLA; SOUZA; GODOY, 2007), o que pode aumentar a produção de radicais livres, e levar ao estresse oxidativo. Contudo este fenômeno não pode ocorrer com exercício de baixa intensidade ($<50\% VO_2\text{max}$). Em alguns casos, a capacidade antioxidante não é superada e o dano induzido pelo radical livre não aparece (FINAUD; LAC; FILARE, 2006). O exercício precisa ter volume, intensidade e duração suficientes para levar a um aumento na produção de EROs, e levar a oxidação de moléculas biológicas (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). Quanto maior a intensidade do exercício maior a produção de radicais livres e estresse oxidativo. Já durante exercício anaeróbio ou misto, a cadeia respiratória mitocondrial não é o principal local de produção de radicais livres, as principais fontes geradoras são, produção de xantina oxidase, processo de isquemia reperusão, atividade de quebras de fagócitos respiratórios e ainda acidose e oxidação de catecolaminas (FINAUD; LAC; FILARE, 2006).

Por outro lado, sabe-se que a atividade física é uma conhecida forma de estresse e a exposição crônica a ela, chamada treinamento físico, é capaz de disparar adaptações em resposta a uma maior produção de radicais livres (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). A adaptação do músculo esquelético para exercícios repetidos não somente aumenta a tolerância ao exercício, mas também limita o estresse oxidativo induzido pelo mesmo através da super-regulação dos sistemas de defesa antioxidantes (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009; NIESS; SIMON, 2007), com um aumento na mobilização de uma variedade de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos nas células ou no plasma (FINAUD; LAC; FILARE, 2006). Ou seja, EROs produzidas durante o exercício, agem como um sinal para induzir repostas adaptativas, incluindo a manutenção da homeostase oxidativa e a prevenção de dano oxidativo (AGUILÓ et al., 2007), ativando as vias de sinalização que aumentam a expressão de enzimas antioxidantes (SOUSA; FERANDES; CYRINO, 2006).

Para a adaptação ocorrer, o estímulo fisiológico aplicado (neste caso a produção de EROs) deve exceder um limite mínimo, efetivamente sobrecarregando

o sistema antioxidante. Se a sobrecarga é atingida, a capacidade fisiológica do corpo desenvolverá ou adaptará; enfim levando a melhora na saúde e/ou desempenho humano. Para isso o programa de treino deve ser suficientemente longo e intenso para causar elevação na produção de EROs (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). Em condições fisiológicas estáveis e com uma fundamentada escolha de cargas de treino, a adaptação do sistema antioxidante endógeno é proporcional a carga de treino (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008). Entretanto o EO após carga aguda de exercício submáximo não é tipicamente eliminado, apenas bem reduzido (BLOOMER, 2008).

Ainda, dados sugerem que um acúmulo de exercício intenso (intensos períodos de treino e/ou competição) pode provocar um aumento no EO (GOMEZ-CABRERA; DOMENECH; VIÑA, 2008), que pode ser a origem da fadiga muscular e injúria. Se a capacidade de recuperação individual é ultrapassada, estas mudanças podem contribuir para o aparecimento de *overtraining*, o qual pode agravar o EO. Ou seja, atividade física regular, associada com uma dieta balanceada, é conhecida como um importante fator para saúde. Contudo atividade física exaustiva e/ou intensa pode levar à doenças, injúrias e fadiga crônica, parcialmente devido à toxicidade dos radicais livres (FINAUD; LAC; FILARE, 2006).

Além da intensidade e duração do exercício, outros fatores parecem ter impacto no grau de defesa antioxidante presente, incluindo idade, status de treinamento e consumo alimentar (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). Se durante a sobrecarga de treino os sistemas antioxidantes endógenos não forem capazes de neutralizar o excesso de EROs produzido, o EO é gerado. A manutenção de um status nutricional normal é determinante (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008). Uma interdependência entre o consumo de antioxidantes e os efeitos do treinamento no sistema antioxidante endógeno tem sido observada em relação à modulação da carga de treino (MARGARITIS et al., 2003; PALAZZETTI et al., 2004). Isto supõe que a necessidade de antioxidantes durante períodos de treinamento de alto ou baixo estresse, difere do requerido durante um período de treinamento normal (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008).

Apesar da super-regulação do sistema de defesa antioxidante endógeno em indivíduos treinados, como uma adaptação do treino, a capacidade antioxidante do corpo não é suficiente para prevenir totalmente o EO induzido pelo exercício. Portanto é possível que atletas de elite possam se beneficiar com suplementação

antioxidante, porém esta questão permanece aberta para debate (BLOOMER, 2008).

Poucas pesquisas têm investigado a extensão do EO após dias consecutivos de treinamento em atletas treinados de médio e alto nível, que freqüentemente treinam em altas intensidades por períodos de tempo prolongados (SHING et al., 2007).

1.5 Suplementação de antioxidantes:

A suplementação de substâncias exógenas pode oferecer suporte ao sistema de defesa antioxidante endógeno para ajudar a suportar o aumento da produção de EROs (BLOOMER; GOLDFARB; MCKENZIE, 2006). Baseado nisto, o requerimento de nutrientes antioxidantes tem despertado grande interesse. A razão para considerar estes micronutrientes está relacionada com a suposição de que o treino induz respostas bioquímicas adaptativas que podem requerer um aumento na ingestão e/ou absorção de vitaminas e minerais. Em consequência, vários autores propuseram a hipótese de que para alguns atletas, a ingestão de alguns micronutrientes antioxidantes pode ser abaixo do que eles realmente precisam. Até o momento, se o exercício agudo ou crônico induz uma mudança no requerimento de antioxidantes e minerais não está suficientemente discutido. A questão da Ingestão Dietética Recomendada (RDA) para atleta tem que ser abordada. O primeiro passo é interpretar as relações estabelecidas entre o consumo de micronutrientes e a resposta adaptativa do sistema antioxidante. E o segundo passo é expor as principais questões relacionadas com as necessidades de micronutrientes antioxidantes por atletas, levando em conta a interação entre carga de treino e a alimentação (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008).

Os efeitos de suplementos antioxidantes são principalmente visíveis quando o indivíduo tem uma deficiência prévia ou quando há uma limitação da ingestão de antioxidantes. Tal déficit é também visível em alguns sujeitos durante o período de sobrecarga de treinamento. Em casos específicos, um complexo antioxidante pode ajudar atletas com baixo consumo inicial de antioxidantes a manter um status antioxidante durante um período de sobrecarga de treinamento (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008).

Porém um excesso de antioxidantes através de suplementação pode atrapalhar na própria proteção antioxidante. Por reduzir o efeito adaptativo do sistema antioxidante endógeno induzido pelo treinamento físico, devido à diminuição dos efeitos das próprias EROs, que desempenham um papel nos mecanismos de sinalização que desencadeiam a expressão de enzimas antioxidantes. No entanto parece que a manutenção de um status antioxidante normal por meio do consumo alimentar é essencial para o processo de adaptação (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008). A suplementação é particularmente importante durante períodos de treinamento intenso e/ou competição, os quais causam maior necessidade de antioxidantes (FINAUD et al., 2006; GOMEZ-CABRERA; DOMENECH; VIÑA, 2008; MARGARITIS et al., 2003; PALAZZETTI et al., 2004).

Alguns dados sugerem um claro benefício tanto da dieta rica em antioxidantes ou da suplementação, entretanto outros sugerem nenhum efeito positivo ou até consequências negativas, dependendo da vitamina suplementada, quando comparado a indivíduos recebendo placebo. A controvérsia quanto aos benefícios da suplementação como proteção ao estresse oxidativo é em parte devido ao tipo de antioxidante assim como das quantidades utilizadas (BLOOMER; GOLDFARB; MCKENZIE, 2006), o período de suplementação, a sua biodisponibilidade durante o exercício, fatores dietéticos e a defesa antioxidante endógena relacionada com o status de treinamento dos participantes (PEAKE; SUZUKI; COOMBES, 2007).

Tem sido demonstrado que o uso de suplementos antioxidantes em concentração e quantidades semelhantes às quantidades consumidas através de uma dieta qualitativamente completa, incluindo frutas e verduras, maximiza os benefícios e minimiza efeitos adversos (BLOOMER; GOLDFARB; MCKENZIE, 2006).

1.6 Vitamina C:

A vitamina C ou ácido ascórbico é um micronutriente hidrossolúvel requerido para múltiplas funções biológicas. É cofator para muitas enzimas participantes da hidroxilação pós translacional do colágeno, na biossíntese da carnitina, na conversão do neurotransmissor dopamina em norepinefrina, na amidação do peptídeo e no metabolismo da tirosina. Além disso, a vitamina C é um regulador

importante da produção de ferro. Reduz o ferro férrico (Fe^{3+}) em ferroso (Fe^{2+}), assim promovendo sua absorção no trato gastrointestinal e estabilizando proteínas ligadoras de ferro. Em humanos a falta da enzima envolvida na síntese de vitamina C (gulonolactona oxidase) torna necessária a presença desta vitamina na dieta. Assim a privação prolongada de vitamina C gera defeitos na modificação pós translacional de colágeno que causa escorbuto e eventualmente morte (DUARTE; LUNEC, 2005).

Em adição a ação anti-escorbuto, a vitamina C é provavelmente o antioxidante extracelular mais importante, além de efetiva no citosol (FINAUD; LAC; FILARE, 2006), por ser um potente agente redutor e varredor de radicais livres nos sistemas biológicos. Resumidamente, a forma mono-anion (ascorbato) é a espécie química predominante no PH fisiológico. O ascorbato, facilmente, sofre duas consecutivas, e reversíveis oxidações de um elétron para gerar dehidroascorbato (DHA) e um intermediário, o radical livre ascorbato (AFR) (Figura 1) (DUARTE; LUNEC, 2005).

Figura 1 – Metabolismo de redução da vitamina C. A oxidação de um elétron do ascorbato gera o radical ascorbato, com um elétron deslocado entre três átomos de oxigênio, o qual promove oxidação originando o dehidroascorbato (DHA). DHA é uma molécula instável e pode ser decomposta ou reduzida novamente a ascorbato.

O AFR é, contudo, um radical livre relativamente não reativo, com um potencial de redução consideravelmente baixo comparado a outros radicais como radical α -tocoferol, radical glutatona e virtualmente todas as EROs que parecem estar envolvidas nas doenças humanas. Estas propriedades fazem do ascorbato um eficiente doador de elétrons em muitas reações biológicas de redução, capaz de

substituir radicais altamente danosos por radical ascorbato pouco reativo, de acordo com a equação abaixo, onde AscH^- representa o ascorbato, $\text{Asc}^{\bullet-}$ representa o radical ascorbato e $\text{X}^\bullet$ representa as espécies oxidadas (DUARTE; LUNEC, 2005).

1.6.1 Disponibilidade e transporte de vitamina C:

A vitamina C é bem absorvida no trato gastrointestinal, quase completamente absorvida no íleo por um transportador ativo, que se torna passivo no caso de ingestão de altas doses. Falta de estoque implica uma necessidade de consumo dietético regular. Porém alto consumo aumenta sua excreção na urina, a principal via de eliminação. O ácido ascórbico plasmático é fortemente relacionado ao consumo de vitamina C, para consumos entre 50 e 90mg/dia (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008).

Níveis médios de vitamina C no plasma são entre 0,6 e 2,0 mg/dl para indivíduos saudáveis, bem nutridos e não fumantes (YOUNG, 1987). Não são observados níveis plasmáticos superiores com doses suplementares maiores que 500mg/dia, devido à eficiente excreção de vitamina C na urina. Alguns estudos mostram que o aumento de vitamina C no plasma é acompanhado pelo aumento nos níveis intracelulares desta vitamina; contudo, este aumento frequentemente não é dose dependente, presumivelmente devido à saturação celular (DUARTE; LUNEC, 2005). O tempo de meia vida da vitamina C é 10 horas e sua biodisponibilidade pode ser reduzida quando administrada em altas doses (PEAKE; SUZUKI; COOMBES, 2007).

A vitamina C está presente em grande quantidade nos tecidos em que a produção de EROs é importante, fenômeno este conhecido como adaptação contra o estresse oxidativo. Em fluídos a vitamina C tem a habilidade de neutralizar EROs, enquanto no interior da célula reforça a atividade da vitamina E e da GSH, por regenerar suas formas ativas depois de terem reagido com EROs (EVANS, 2000; FINAUD; LAC; FILARE, 2006). A vitamina C regenera a vitamina E por aceitar o elétron do radical vitamina E, formando o radical vitamina C, o qual é excretado na

urina ou regenerado em vitamina C via doação de elétron da GSH. Assim, vitamina E e C funcionam como vassouras de radical superóxido e radical hidroxil na fase lipídica e aquosa, respectivamente, inibindo a peroxidação lipídica e dano oxidativo a outras moléculas. A vitamina E funciona como antioxidante quebrador de cadeia durante a peroxidação lipídica, interrompendo os radicais e formando o radical vitamina E como produto (BLOOMER, 2008).

1.6.2 Necessidade Nutricional de Vitamina C para atletas:

Devido a sua implicação em várias vias metabólicas relacionadas com o exercício, como síntese de carnitina, noradrenalina e colágeno, assim como defesa antioxidante, é legítimo dizer que as necessidades de ácido ascórbico (vitamina C) de atletas são maiores. Como consequência de uma taxa mais elevada de consumo endógeno em comparação com indivíduos sedentários, devido aumento na utilização, metabolismo e excreção desta vitamina (PEAKE, 2003).

Assim a suplementação de vitamina C tem sido freqüentemente estudada em atletas, discutindo seus efeitos preventivos contra estresse oxidativo. A deficiência de vitamina C tem efeitos negativos na performance e a sua suplementação (especialmente em combinação com outros antioxidantes como a vitamina E) ajuda a manter uma concentração adequada de ácido ascórbico nos tecidos (FINAUD; LAC; FILARE, 2006). Embora em outro estudo a vitamina C não pareça melhorar o desempenho atlético, atletas podem ter aumento das necessidades de vitamina C e a suplementação pode ter efeitos importantes que são mais perspicazes que a melhora da capacidade aeróbica ou desempenho (PEAKE, 2003).

Embora uma dieta bem balanceada, que cobre as necessidades energéticas, ofereça a quantidade necessária de vitamina C, os períodos estressantes de alto treinamento são períodos chaves para atentar à deficiência dessa vitamina. Este risco nutricional de déficit pode ser reduzido por um consumo regular de frutas e verduras. Contudo, em atletas bem treinados, o status de ácido ascórbico em condições basais é normal. Em muitos casos, atletas têm mais ácido ascórbico basal que aqueles observados em indivíduos menos ativos (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008).

A maioria dos estudos sobre o consumo de vitamina C em atletas indica que grande parte deles recebe quantidades adequadas de vitamina C pela dieta, com base nas recomendações diárias da RDA. A média de consumo dos atletas é entre 90 a 140 mg por dia (PEAKE, 2003). Mesmo que haja uma alta ingestão de vitamina C, como observado entre atletas altamente treinados, paradoxalmente estes atletas são grandes consumidores de suplementos. No entanto, quando o consumo é acima de 500mg/d, pode gerar efeitos pro-oxidantes (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008).

Atletas têm sido suplementados com quantidades de vitamina C entre 85 a 1500 mg por dia, por período de 1 dia a 8 meses. Alguns estudos sugerem que há pouco ou nenhum efeito da suplementação nas concentrações sanguíneas de ácido ascórbico, entretanto outros demonstram aumento da concentração após suplementação (PEAKE, 2003).

A dose de vitamina C suplementada, o consumo regular da mesma pela dieta, e as concentrações basais de ácido ascórbico são parâmetros importantes que influenciam a resposta à suplementação. Alguns autores mostraram que os atletas têm um maior consumo dietético de vitamina C que indivíduos sedentários, por isso conseqüentemente apresentam uma menor resposta à suplementação. Por outro lado atletas com baixos níveis séricos de ácido ascórbico provavelmente respondem melhor a suplementação, entretanto este pode ser apenas um aumento inicial, com diminuição após suplementação prolongada (PEAKE, 2003).

1.6.3 Efeitos pro-oxidante da Vitamina C:

Paradoxalmente, a vitamina C é também conhecida por agir como pro-oxidante em estudos *in vitro*, contribuindo para formação de dano oxidativo pela redução de ferro férrico (Fe^{3+}) em ferro ferroso (Fe^{2+}) (e Cu^{2+} em Cu^{1+}), o que por sua vez pode reduzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em radical hidroxil. Contudo, em geral, esta reação de Fenton mediada pela vitamina C deve ser controlada no corpo humano devido ao eficiente seqüestro de ferro pelas proteínas ligadoras de metal como a ferritina e transferrina. Conseqüentemente, tem sido debatido que o efeito pró-oxidante pode não ser relevante *in vivo*. Autores têm defendido que no maior contexto fisiológico do plasma humano incubado *in vivo*, a vitamina C previne a

peroxidação lipídica mesmo na presença de metais de transição ativos e H_2O_2 acrescentados. Entretanto, o suplemento de vitamina C não tem sido recomendado em pessoas com altos níveis de ferro ou em condições patológicas associadas com sobrecarga de ferro como talassemia ou hemocromatose (DUARTE; LUNEC, 2005).

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que a vitamina C, obtida por meio da alimentação usual, da adição de suco de laranja à dieta ou da suplementação, auxilia o sistema antioxidante endógeno contra os danos provocados pelo exercício físico em atletas de alto rendimento.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Comparar os efeitos da oferta de vitamina C através de um suplemento alimentar ou de uma dieta rica em ácido ascórbico em biomarcadores de estresse oxidativo induzido por exercício físico, em nadadores de alto rendimento de Ribeirão Preto/SP.

3.2 Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar o uso de suplementos de antioxidantes;
- ✓ Avaliar o padrão dietético de nadadores de elite, principalmente o consumo de ácido ascórbico e outros antioxidantes; e relacionar com a resposta a adição de vitamina C;
- ✓ Verificar a ocorrência do estresse oxidativo em nadadores de alto rendimento submetidos à carga de exercício agudo, através de exames bioquímicos de biomarcadores;
- ✓ Relacionar o uso de suplemento de vitamina C e dieta rica nesta vitamina com o perfil antioxidante antes e após o exercício; e assim avaliar as necessidades nutricionais desta vitamina em atletas;
- ✓ Comparar as diferenças entre dieta rica em ácido ascórbico e suplemento de vitamina C.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Tipo e campo de estudo:

Este estudo é um ensaio clínico, de intervenção prospectiva, e a seleção de elementos da amostra não é aleatória, mas sim por alcance (conveniência ou fácil acesso). O estudo foi feito com nadadores de alto rendimento da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), onde foram realizados o exercício e a coleta de material biológico. Os critérios de exclusão foram uso de tabaco e uso de suplementos antioxidantes duas semanas antes das coletas.

4.2 Indivíduos:

A amostra foi composta por 13 atletas de alto rendimento, de ambos os sexos, 6 homens e 7 mulheres, com idades entre 18 e 26 anos e média de 20,62 anos com desvio-padrão de 2,29 anos. Todos possuíam 3º grau incompleto e nenhum indivíduo fazia uso de tabaco.

Os atletas eram federados, competidores ranqueados em campeonatos estaduais e nacionais, seguiam ritmo de preparação com orientação de um educador físico e o treinamento objetivava melhora dos índices de desempenho nas categorias disputadas.

Os nadadores foram contactados pessoalmente, e através do treinador, para esclarecimento sobre a pesquisa, verificação dos critérios de inclusão e divulgação dos resultados. Para participação na pesquisa os indivíduos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto em 23 de junho de 2008 de acordo com o Processo HCRP nº 4105/2008 (Anexo A).

4.3 Delineamento do estudo:

Primeiramente foi aplicado um questionário para avaliação do uso de suplementos nutricionais, dados pessoais, tabagismo e etilismo. Os indivíduos que faziam uso de suplementos antioxidantes foram orientados a suspender o uso por pelo menos duas semanas antes das coletas de sangue e durante as mesmas. Já que todos os indivíduos aceitaram abster o uso e não havia nenhum tabagista, todos foram incluídos na pesquisa.

A pesquisa consistiu na avaliação de parâmetros bioquímicos e dietéticos em três fases, com intervalo de 2 meses entre elas. A primeira denominada fase controle (C), na qual os parâmetros analisados reproduziram os valores basais dos indivíduos. Na segunda fase, fase dieta (D), os indivíduos receberam uma dieta rica em vitamina C por 3 dias antes das mensurações, através do consumo de 1 litro de suco de laranja por dia, que forneceu 425,65 mg/d de ácido ascórbico, de acordo com análise feita em nosso laboratório. E a terceira fase, denominada fase suplemento (S), os atletas receberam 500 mg de suplemento de vitamina C 3 dias antes das análises.

Em cada fase foram feitas coletas de sangue antes do treino (AE), logo após (LA) e 24 horas após o exercício (24h). Em todas as fases os indivíduos fizeram registro alimentar de 3 dias antes do dia da coleta de sangue e do dia da coleta. Os participantes compareceram ao laboratório, em jejum de 12 horas, para coleta de sangue antes do exercício, neste período foram autorizados a consumir apenas água. Para a realização das dosagens 24 horas após o exercício os indivíduos foram orientados a não praticar nenhum tipo de exercício físico e fazer novamente jejum de 12 horas. A figura 2 apresenta o fluxograma com as etapas da coleta dentro de cada fase.

Figura 2 – Fluxograma com as etapas da coleta dentro de cada fase do estudo

4.4 Avaliação do Consumo Alimentar:

Os indivíduos foram instruídos a manter alimentação normal durante o período do estudo e orientados a fazer registro alimentar de 3 dias antes do dia da coleta de sangue, e ainda do dia da coleta, nas três fases do estudo, perfazendo um total de 4 registros alimentares por fase. Para avaliação de adequação do consumo alimentar habitual dos participantes foi utilizada a média de consumo alimentar dos três dias antes da coleta, que incluía 1 dia do final de semana. O único nutriente que não representa o consumo habitual é o ácido ascórbico, nas fases D e S, devido à adição de vitamina C pelo estudo.

O objetivo foi avaliar o padrão dietético de nadadores de elite, além de quantificar a quantidade ingerida de ácido ascórbico (vitamina C), outros antioxidantes e nutrientes, e então avaliar uma possível correlação com os níveis circulantes de ácido ascórbico e marcadores séricos do estresse oxidativo nas diferentes fases. O registro alimentar do dia da coleta teve como objetivo avaliar se houve diferença de consumo antes e no dia da coleta. A análise do consumo alimentar também serviu para detectar se os resultados do estudo foram devido ao uso adicional de vitamina C adicional, e não mudanças aleatórias.

Todos os registros alimentares foram analisados pelo Software DietPro 4.0 (Agromídia Software LTDA, Viçosa, MG, 2002) que foi complementado pelas seguintes tabelas de composição de alimentos: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO/Versão II (NÚCELO DE ESTUDOS EM PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO, 2006) e Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras (NEVES, 2004). Foram analisados os antioxidantes ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E, selênio, zinco e retinol, os macronutrientes carboidrato, proteína e lipídeo, e ainda colesterol, fibras e consumo calórico. Tanto o consumo do suco de laranja, como o uso de suplementos foram adicionados as análises.

Para avaliação da adequação da ingestão de energia, diferentemente de outros nutrientes, foi considerado o peso corpóreo, que é um marcador do equilíbrio ou desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia. Para isso, essa adequação ou inadequação, foi realizada em função do índice de massa corpórea (IMC) (CUPPARI; SCHOR, 2005). Os macronutrientes, carboidrato, proteína e lipídeo foram avaliados de acordo com os valores disponíveis para atletas da *American Dietetic Association*, *Dietitians of Canada* e *American College of Sports Medicine* (2009). Já para avaliação do colesterol, fibras e dos micronutrientes, que ainda não possuem valores de referência para atletas, utilizou-se os valores propostos pelas *Dietary Reference Intakes* (DRIs) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005; PADOVANI, 2006), e neste caso podemos fazer uma adequação aparente, respeitando os seguintes critérios (CUPPARI; SCHOR, 2005):

- ✓ Valores médios de ingestão menor que a *Necessidade Média Estimada* (EAR) → a ingestão deve ser implementada;
- ✓ Valores médios de ingestão entre EAR e *Ingestão Dietética Recomendada* (RDA) → há risco de inadequação e provavelmente a ingestão deve ser aumentada;
- ✓ Valores médios de ingestão acima da RDA → pouco provável que a ingestão seja inadequada.

Quando o micronutriente não possui valores de EAR utilizamos a *Ingestão Adequada* (AI):

- ✓ Valores médios de ingestão menores que AI → adequação não pode ser determinada;
- ✓ Valores médios de ingestão maiores que AI → ingestão média provavelmente esta adequada se avaliada por um grande número de dias.

4.5 Avaliação Bioquímica:

Em cada uma das fases foi colhido aproximadamente 4 ml de sangue por punção venosa em tubo a vácuo estéril (Vacutainer - BD®), contendo ativador de coagulação, antes do exercício (AE), logo após o exercício (LA) e 24 horas depois (24h). Logo após as coletas, as amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 3500 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante (soro) foi separado, transferido para um tubo de Ependorf, armazenado a -30°C e o sedimento foi descartado. A glicose foi dosada dentro de 8 horas após a coleta para evitar falsos resultados.

Para caracterização bioquímica dos participantes do estudo e para garantir que os mesmos eram saudáveis, foram determinados níveis séricos de colesterol total, frações *High Density Lipoprotein* (HDL-c) e *Low Density Lipoprotein* (LDL-c), triglicérides, glicemia, e uréia e creatinina, que também servem como marcadores de alterações fisiológicas; como marcadores de lesão hepática, transaminase glutâmico oxalacética (TGO) ou aspartato aminotransferase (AST) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) ou alanina aminotransferase (ALT); e creatina quinase (CK), para determinar lesão muscular, todos por meio de Kits comerciais Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, MG, Brasil).

Quanto ao metabolismo antioxidante e estresse oxidativo foram dosados, biomarcadores de peroxidação lipídica, através da Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos pela Oxidação do Ferro em Xilenol Laranja (FOX), glutathiona reduzida (GSH), e vitaminas C e E, por métodos padronizados no laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP, descritos logo abaixo. E para dosagem do ácido úrico foi utilizado kit comercial Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, MG, Brasil).

Para avaliar a adequação dos exames bioquímicos em relação aos níveis normais, nas diferentes fases, foi utilizada amostra de sangue de jejum, que corresponde, a amostra antes do exercício de cada fase. Já, com o objetivo de comparar os efeitos do exercício no metabolismo antioxidante e o estresse oxidativo, foram utilizadas as amostras coletadas em todos os momentos, antes do exercício, logo após o exercício e 24 horas após, de todas as fases.

4.5.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBRAS – “*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*”):

4.5.1.1 TBARS livre:

A peroxidação lipídica no soro foi quantificada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e determinada por método colorimétrico que consiste na reação dos aldeídos formados, cujo principal representante é o malonaldeído (MDA), com ácido tiobarbitúrico em meio ácido e sobre aquecimento por 15 minutos a 100°C em banho-maria (Modelo 100, FANEN, Guarulhos, SP, Brasil). Esta reação produz um composto de coloração amarela que é lido em espectrofotômetro (Modelo SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) no comprimento de onda de 535nm (BUEGE; AUST, 1978).

4.5.1.2 TBARS total:

Para quantificar o MDA ligado a macromoléculas, MDA total, as amostras de soro foram submetidas à hidrólise alcalina seguindo protocolo proposto por Cighetti et al (1999) com as seguintes modificações: em tubo de ensaio 200µL de soro foram homogeneizados com 0,3ml de água nanopura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) e 0,5 ml de NaOH 2M. Após agitação em agitador de tubos tipo “vortex” (Modelo AP-56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) os tubos foram aquecidos a 60°C por 30 minutos em banho-maria (Modelo 100, FANEN, Garulhos, SP, Brasil) e então neutralizados com 0,5 mL HCl 2M para seguirem à reação com ácido tiobarbitúrico da mesma forma que o TBARS livre.

4.5.2 Determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) pelo método férrico - xilenol *orange* (FOX):

Os hidroperóxidos foram determinados pelo método da oxidação dos íons férrico na presença de xilenol laranja, em que 1 ml de solução contendo 100 µmol/L de xilenol laranja, 4mmol/L de hidroxitoluenobutilato (BHT), 25mmol/L de ácido

sulfúrico e 250µmol/L de sulfato ferroso em metanol:água (9:1 v/v) foi adicionada a uma alíquota de 100µL de soro. Após agitar e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente, o homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 3000rpm. A absorbância do sobrenadante foi lida a 560nm e comparada com a curva padrão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em espectrofotômetro (Modelo SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Os resultados foram expressos em µmols de H_2O_2 /L. (SÖDERGREN et al, 1998).

4.5.3 Glutathiona reduzida (GSH) e tióis totais:

A quantificação da glutathiona reduzida e dos tióis totais foram realizados por método colorimétrico que consiste na reação do grupo sulfidril com 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), produzindo uma coloração amarela que é lida em espectrofotômetro (Modelo SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) no comprimento de onda de 412nm. A concentração foi calculada utilizando-se uma curva padrão de GSH (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

4.5.4 Determinação de vitaminas no plasma:

4.5.4.1 Vitamina C:

A determinação de vitamina C foi realizada por reação colorimétrica com 2,4-dinitrofenilhidrazina e posterior leitura espectrofotométrica (Modelo SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) no comprimento de onda de 520nm. No preparo da amostra, adiciona-se 1 ml de ácido tricloroacético (5%) a 0,25 ml do plasma, que então é centrifugado em centrífuga refrigerada (Modelo Sorval Legend Mach 1.6-R, Buckinghamshire, England) por 10 minutos a 2500rpm. Em seguida, retira-se 0,6 ml do sobrenadante para um tubo de ensaio e adiciona-se 0,2 ml do reagente de cor (DTC – dinitrofenilhidrazina+tiouréia+sulfato de cobre). Após 4 horas de reação em banho-maria a 37°C, adiciona-se 1 ml de H_2SO_4 (65%). A leitura é realizada após 20 minutos. A concentração de vitamina C é realizada por meio da curva de calibração (BESSEY, 1960).

4.5.4.2 Vitamina E:

A análise de vitamina E foi feita no HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Shimadzu Co, Kyoto, Japan) a 292nm. As amostras foram preparadas em tubos de ensaio protegidos com papel alumínio, e foram compostas por 200µL de soro, 100µL de etanol 100% com 0,125% BHT, 100µL da solução de padrão interno (acetato de alfa-tocoferila). As amostras foram agitadas em vortex (Modelo AP-56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) por 5 segundos, em seguida a vitamina foi extraída com a adição de 400µL de hexano, agitadas por 2 minutos, e centrifugadas a 3500rpm por 5 minutos. Então foram retirados 200µL da fase hexânica para outro tubo e secas em fluxo de nitrogênio. As amostras foram então ressuspensas em 200µL de fase móvel (acetonitrila, diclorometano e metanol). Para quantificação foi utilizada a razão entre a área do analito (vitamina) e a área do padrão interno, e a comparação com a curva de calibração (JORDÃO et al, 2004).

4.6 Protocolo de treinamento:

Os atletas treinavam há pelo menos 3 anos, 6 vezes por semana, com duração média de 19,4 horas semanais, o que corresponde a aproximadamente 3,23 horas por dia. Durante os treinos utilizavam como fonte de energia, tanto o metabolismo aeróbio, como o anaeróbio, dependentes do tipo de exercício e intensidade do mesmo.

A temporada de natação foi dividida em unidades menores durante o ano, sendo que o final de cada temporada culminou com uma competição importante. Isso com objetivo de produzir adaptações sistemáticas que conduzissem os nadadores aos seus picos de acordo com as competições mais importantes, que foram o Campeonato Paulista e Campeonato Brasileiro.

Cada temporada foi dividida em 3 períodos:

- ✓ Período de base ou período de endurance geral: no qual a ênfase está na melhora da capacidade aeróbia em geral, força, flexibilidade, mecânica de nado, saídas e viradas, e resistência ao estresse psicológico. Neste período os atletas devem nadar todos os estilos e distâncias, sem qualquer ênfase em suas especialidades. Os treinos são mais longos, porém de baixa intensidade;

- ✓ Período específico ou período de endurance específico: o objetivo deste período é melhora da endurance, para obtenção de um desempenho pico. Grande parte do treino deve ser realizado no estilo do nadador e grande quantidade deve ser realizada nos níveis do limiar e em sobrecarga. Envolve treinos mais intensos e musculação;
- ✓ Período de polimento: neste período há uma redução no volume e intensidade de treinamento, para melhores desempenhos nas competições, duram normalmente, entre 2 e 5 semanas.

O cronograma das temporadas e seus períodos, as competições do ano de 2008 e as datas das coletas estão apresentados na figura abaixo (Figura 3).

Figura 3 – Cronograma das temporadas de 2008 versus a intensidade de cada período, e datas dos campeonatos e das coletas de dados

Base 1: período de base da 1ª temporada de 2008 – de 01 de fevereiro a 10 de março (5 semanas)
Específico 1: período específico da 1ª temporada de 2008 – 11 de março a 30 de abril (7 semanas)
Polimento 1: período de polimento da 1ª temporada de 2008 – 1 de maio a 26 de maio (3,5 semanas)
Base 2: período de base da 2ª temporada de 2008 – 27 de maio a 24 de junho (4 semanas)
Específico 2: período específico da 2ª temporada de 2008 – 25 de junho a 30 de agosto (9 semanas)
Polimento 2: período de polimento da 2ª temporada de 2008 – 31 de agosto a 20 de setembro (2,5 semanas)

Como podemos observar na figura acima, nas 3 fases do estudo os indivíduos encontravam-se no período de treinamento específico. Entretanto, sabendo que as intensidades são variáveis ao longo dos períodos e para que fosse possível padronizá-la nas diferentes fases, foi combinado com o treinador que fizesse uma padronização do treino na semana das coletas. Para que dessa maneira fosse possível avaliar os indivíduos em situação de estresse semelhantes.

O treino no dia da coleta totalizou 2200m, foi composto por 86,3% de *Endurance training* (treino de Endurance) e 13,7% de *Sprint training* (treino curto e intenso). Já o treino do dia anterior a coleta totalizou 5100m, com 78,4% de *Endurance training* e 21,6% de *Sprint training*. A intensidade do treino foi declarada mais alta no dia anterior a coleta em relação ao treino do dia da coleta. Segue abaixo a descrição dos treinos:

✓ Treino do dia da coleta:

- 1000m nadando – aquecimento – 1000m (Endurance)
- 12 x 50m perna – 600m (Endurance)
- 4 x 1 extensão total – 100m (Potência)
- 4 x 25m – 100m (Potência)
- 2 x 50m corretivo – 100m (Potência e velocidade)
- 300m solta (Endurance)

✓ Treino do dia anterior a coleta:

- 800m crown – 800m (Endurance)
- 400m Medley – 400m (Endurance)
- 10 x 50m corretivo – 500m (Endurance)
- 15 x 100m a cada 1:30 (nadar, descansar e sair) – 1500m (Endurance)
- 200m solta – 200m (Endurance)
- 10 x 50m perna para 1:00 – 500m (Velocidade)
- 200m solta – 200m (Endurance)
- 12 x 50m progressivo de 1 a 4 – 600m (Potência)
- 400m solta – 400m (Endurance)

O *Endurance training* é um treino para melhorar a capacidade aeróbia, permitindo aos atletas nadarem mais rápido com menor apoio no metabolismo anaeróbio, de modo que o ácido láctico irá acumular-se numa velocidade mais lenta. Dessa forma a acidose sofrerá um retardo. A finalidade é ajudar os nadadores a manter um ritmo médio mais veloz na parte intermediária da prova, mas sem ficar nitidamente cansado. A importância do *Endurance training* aumenta à medida que as provas vão ficando mais longas. Neste tipo de treinamento ocorre uma variação das velocidades de treino, que pode ser abaixo do limiar (aumenta a taxa do metabolismo das gorduras durante o exercício, poupando glicogênio muscular), no limiar (melhoram a capacidade aeróbia, sem que o nadador fique excessivamente cansado) e acima do limiar (sobrecarga – reais condições metabólicas que o atleta se depara durante uma competição, melhora o $VO_2\text{max}$)

Enquanto o *Sprint training* é para melhorar o metabolismo anaeróbio e potência, e tem como finalidade aumentar a velocidade de nado, de modo que os nadadores possam iniciar e terminar as provas mais rapidamente, e melhorar a capacidade de tamponamento, de forma que os nadadores possam manter sua velocidade a despeito do acúmulo de ácido láctico.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis são apresentadas como média $\pm$ desvio padrão, para uma análise descritiva dos dados. Para comparação entre as fases e etapas foi utilizado o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). Os modelos lineares de efeitos mistos são utilizados na análise de dados em que as respostas estão agrupadas (medidas repetidas para um mesmo indivíduo) e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada (SCHALL, 1991). Esses modelos têm como pressuposto que seus resíduos têm distribuição normal com média 0 e variância σ^2 . Nas situações em que tal pressuposto não foi observado, transformações na variável resposta foram utilizadas. Este procedimento foi realizado através do *software* SAS® 9.1, utilizando a *PROC MIXED*. E a significância estatística foi definida em $p < 0,05$.

Para avaliar a força de associação entre as variáveis do estudo e os níveis de ácido ascórbico (os níveis plasmáticos de marcadores do estresse oxidativo), foi feito o coeficiente de correlação de Spearman nas correlações por fase e etapas. Este varia entre -1 e 1, quando ele assume o valor -1 tem uma forte correlação negativa, quando assume o valor 1 tem uma forte correlação positiva e quando ele é igual a 0 não existe nenhuma correlação entre as variáveis. Quando as correlações foram feitas no geral, utilizou-se o coeficiente de correlação com medidas repetidas, pois neste caso existe mais de uma medida por indivíduo (PAGANO; GAUVREAU, 2004). Este coeficiente de correlação é obtido a partir de uma tabela de Análise de Variância (ANOVA), este procedimento foi realizado através do *software* SAS® 9.1, utilizando a *PROC GLM*.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização da amostra:

O estudo iniciou com 18 nadadores, porém 5 indivíduos não participaram de toda a pesquisa, pois destes, 2 foram nadar no exterior e os outros 3 se ausentaram de alguma das fases por motivo particular. Sendo assim apenas 13 deles participaram das 3 fases da pesquisa e por isso contribuíram para as análises dos dados.

Os atletas apresentaram Índice de Massa Corporal (IMC) médio de 21,8kg/m², sendo que 12 indivíduos encontravam-se dentro da faixa de normalidade e apenas 1 indivíduo com os valores de IMC na faixa de sobrepeso nas 3 fases do estudo, ou seja, não houve variação de classificação do estado nutricional nas diferentes fases do estudo (Tabela 1) e também não existiu diferença estatística.

Tabela 1 – Idade (anos) e valores de Índice de Massa Corporal (IMC), em kg/m², nas diferentes fases do estudo

Indivíduos	IDADE	IMC (Kg/m ²)		
		1ª FASE CONTROLE	2ª FASE DIETA	3ª FASE SUPLEMENTO
1	22	20,73	21,18	21,12
2	18	22,87	22,81	22,90
3	22	21,84	21,07	20,93
4	18	22,56	22,27	23,05
5	19	22,46	22,86	22,98
6	19	18,55	18,57	18,44
7	21	21,48	21,63	21,65
8	21	23,01	23,09	23,01
9	22	25,37	25,62	25,75
10	26	20,69	20,59	20,29
11	20	20,86	21,16	21,30
12	22	22,34	22,19	22,32
13	18	20,06	20,59	20,31
MÉDIA	20,62	21,75	21,82	21,85
DP	2,29	1,67	1,67	1,80

DP – desvio padrão

Não houve diferença estatística entre as fases

6.2 Uso de suplementos alimentares:

Em relação ao uso de suplementos alimentares 92,3% (n=12) dos nadadores referiram fazer uso de algum tipo de suplemento (Gráfico 1), destes, 50% (n=6) diziam ser associação de suplementos protéicos e carboidratos, 41,6% (n=5) apenas uso de suplementos de carboidratos, 25% (n=3) vitamínicos e minerais e 25% (n=3) outros tipos de suplementos (Gráfico 2). A orientação para tal uso foi advinda principalmente do treinador (58,33%). O suplemento alimentar mais relatado foi a Maltodextrina, seguido por aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) e Whey Protein, respectivamente por 11 e 5 atletas. O tempo de uso variou entre 5 anos a 2 meses. Os indivíduos que relataram fazer uso de suplementos vitamínicos e de minerais citaram suplementos que possuíam vitamina C, sendo que 1 deles referia fazer uso há 6 meses, o outro há 2 meses, e o outro há 5 anos; estes foram orientados a suspender o uso por pelo menos 2 semanas antes das coletas. Dois indivíduos que já haviam feito o uso de suplemento vitamínico e de minerais, tinham suspenso o uso há 3 e 9 meses.

Gráfico 1 - Consumo de suplemento alimentar, em percentagem (%)

Gráfico 2 - Suplementos alimentares mais citados como consumidos

Apesar dos atletas referirem fazer uso de suplementos alimentares, através dos registros alimentares, pode-se perceber que este uso é variável, de acordo com as condições financeiras dos mesmos. Sendo assim, nem todos os atletas que referiram fazê-lo, relataram o consumo nos diários de registro alimentar. O consumo de suplemento de carboidrato foi registrado por 4 indivíduos (30,7%) na 1ª fase, 7 indivíduos (53,8%) na segunda, e 7 indivíduos (53,8%) na terceira. E o consumo de

associação de carboidrato e proteína foi registrado por 1 indivíduo (7,7%) na 1ª e 2ª fase, e por 2 indivíduos (15,4%) na 3ª fase. De acordo com os registros alimentares, nenhum atleta consumiu algum tipo de suplementos de vitaminas e minerais em nenhuma das fases.

6.3 Consumo Alimentar:

Sobre a alimentação dos indivíduos estudados, dos 13 atletas apenas 4 disseram fazer algum tipo de dieta, dois deles com objetivo de melhora do rendimento, outro reeducação alimentar e outro restrição de gordura. Novamente seguindo a orientação principalmente do treinador (50%).

Para análise de adequação do consumo alimentar foi utilizada média de ingestão de 3 dias, sendo 2 dias do meio da semana e 1 dia do final de semana, refletindo o consumo alimentar habitual dos atletas. Nesta análise incluem-se os suplementos alimentares descritos pelos atletas nos registros alimentares. O único nutriente que não representa o consumo habitual é o ácido ascórbico nas fases D e S, já que a adição foi feita como intervenção do estudo.

6.3.1 Adequação de consumo alimentar:

Em relação ao consumo de antioxidantes a maioria apresentou consumo adequado de vitamina C, apenas na fase C 2 indivíduos apresentaram consumo insuficiente, abaixo da EAR. Na 2ª e 3ª fases o consumo foi adequado para todos os indivíduos devido à adição de vitamina C. Porém para análise do consumo habitual, sem considerar a vitamina C adicional 61,5% dos indivíduos (n=8) apresentariam consumo insuficiente, abaixo da EAR, se não tivessem feito uso de 1 litro de suco de laranja (fase D); e 38,4% (n=5) na fase S (3 indivíduos abaixo da EAR e 2 indivíduos entre EAR e RDA), se não tivessem feito uso de suplemento de vitamina C. O uso adicional de vitamina C não resultou em consumo acima dos limites máximos recomendados (UL), que variam de 1800 a 2000mg por dia para os atletas do presente estudo.

Todos os indivíduos apresentaram consumo insuficiente, abaixo da EAR para vitamina E nas 3 fases. Já o consumo de selênio foi adequado, maior que RDA, para 7 indivíduos nas 3 fases do estudo, para os outros seis o consumo oscilou fase maior que RDA, fase menor que EAR e fase entre EAR e RDA. O consumo de zinco, nas três fases do estudo, foi adequado, maior que RDA, apenas para 2 indivíduos, e insuficiente, menor que EAR, para 1 indivíduo. E o consumo de retinol adequado, acima da RDA, apenas para 1 indivíduo, e outro indivíduo apresentou consumo insuficiente, entre EAR e RDA, nas 3 fases do estudo.

Em relação à ingestão de macronutrientes, o consumo de carboidratos, em g/kg de peso corporal, de acordo com a recomendação para atleta, foi insuficiente para a maioria dos indivíduos (11 indivíduos na fase C, 10 na fase D e 12 na fase S), mesmo com a utilização de suplemento nutricional a base de carboidrato. Apenas 1 indivíduo apresentou ingestão adequada nas 3 fases do estudo. Já o consumo de lipídeos para a maioria dos indivíduos esteve dentro da faixa de normalidade para atletas, que é de 20 a 35% do valor calórico total (VCT), apenas 2 indivíduos apresentaram ingestão excessiva na fase C e 5 na fase S. O consumo de proteína, em g/kg de peso corporal, variou bastante entre os indivíduos. Na 1ª fase, 3 apresentavam ingestão excessiva e 3 ingestão insuficiente, na 2ª fase, 7 ingestão excessiva, assim como na 3ª fase que, além disso, teve 1 indivíduo com ingestão insuficiente. Apenas 1 indivíduo apresentou consumo excessivo nas 3 fases. Em relação ao consumo de colesterol alguns indivíduos apresentaram elevada ingestão, acima de 300mg/dl, sendo 3 indivíduos na fase C, 2 na fase D e 5 na fase S. Porém apenas 1 indivíduo consumiu mais de 300mg de colesterol nas 3 fases do estudo. O consumo calórico se mostrou adequado para 12 dos 13 indivíduos, visto que se enquadram na faixa de normalidade para a classificação do IMC. O consumo de fibras foi abaixo da ingestão adequada (AI) na maioria dos indivíduos, sendo 12 na 1ª e 2ª fase e todos na 3ª fase. Neste caso a adequação não pode ser determinada.

Na Tabela 2 podemos observar o número de indivíduos que apresentou ingestão adequada de macro e micronutrientes nas diferentes fases do estudo. Apenas o consumo de fibras não pôde ser analisado, já que não possui valores de RDA, mas apenas de AI.

Tabela 2 – Número de indivíduos com consumo adequado de macro e micronutrientes nas diferentes fases do estudo

NUTRIENTES	1ª FASE CONTROLE	2ª FASE DIETA	3ª FASE SUPLEMENTO
Calorias (Kcal)	12 (92,30%)	12 (92,30%)	12 (92,30%)
Carboidrato (g/Kg)	2 (15,4%)	3 (23,07%)	1 (7,69%)
Colesterol (mg)	10 (76,92%)	11 (84,61%)	8 (61,53%)
Lípídeos (%)	11 (84,61%)	13 (100%)	8 (61,53%)
Proteína (g/Kg)	7 (53,84%)	6 (46,15%)	5 (38,46%)
Retinol (Eq)	4 (30,76%)	5 (38,46%)	5 (38,46%)
Selênio (mg)	8 (61,53%)	9 (69,23%)	11(84,61%)
Vitamina C (mg)*	11 (84,62%)	13 (100%)	13 (100%)
Vitamina E (mg)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Zinco (mg)	5 (38,46%)	9 (69,23%)	6 (46,15%)

*não representa o consumo habitual nas fases D e S. Nestas 2 fases todos apresentam consumo adequado devido à adição de vitamina C pelo estudo

6.3.2 Comparação de consumo alimentar:

O consumo de ácido ascórbico, correspondente a média dos 3 dias de registro alimentar antes da coleta, foi 257,2% maior que no dia da coleta na fase D ($p<0,01$; IC:268,36-437,4) e 306,68% maior na fase S ($p<0,01$; IC:393,93-562,98). Na fase S os indivíduos tiveram um consumo de ácido ascórbico 29,46% maior que na fase D ($p<0,01$; IC:59,86-228,91) e 343,27% que na fase C ($p<0,01$; IC:406,82-575,87), que por sua vez também teve consumo 242,4% menor que a fase D ($p<0,01$; IC:262,44-431,48). No dia da coleta não houve diferença de consumo entre as fases. O consumo de vitamina C na fase S foi maior que na fase D, devido ao maior consumo de vitamina C pela alimentação, enquanto na fase D os indivíduos consumiram quantidades menores de alimentos fonte de vitamina C, além do suco de laranja oferecido pelo estudo.

O consumo dos outros antioxidantes, vitamina E (tocoferol total), alfa-tocoferol, retinol, selênio e zinco foram iguais tanto em relação ao consumo habitual (média de 3 dias) e no dia das coletas, como entre as fases.

Tanto o consumo habitual de calorias como o consumo no dia da coleta foram maiores na fase D em relação à fase C, respectivamente, 16,41% ($p=0,03$; IC:32,14-729,09) e 15,36% ($p=0,05$; IC:4,22-701,16). No entanto, em nenhuma fase o consumo habitual de calorias foi diferente do consumo do dia da coleta. O consumo habitual de lipídeos (%) não foi diferente do dia da coleta em nenhuma fase. Porém a fase D apresentou consumo habitual de lipídeos 15,15% menor que na fase C ($p=0,02$; IC:0,88-8,62) e 21,17% menor que na fase S ($p>0,01$; IC:2,58-9,83), e com isso um consumo habitual de carboidrato, em porcentagem, maior (fase C: $p<0,02$; IC:0,63-9,11/ fase S: $p<0,0009$; IC:3,14-11,62). Mas o consumo de carboidratos, em g/kg de peso corporal, não diferiu entre os grupos. O consumo de proteínas (g/Kg), colesterol e fibras não apresentaram diferença dentro das fases e nem entre as fases.

Resumindo, o único antioxidante que apresentou flutuações foi o ácido ascórbico, o que era esperado como objetivo do estudo, na fase C o consumo habitual foi menor que nas fases D e S. Para os outros nutrientes, o consumo habitual e do dia da coleta foram iguais em todas as fases. Agora quando comparamos a diferença de consumo entre as fases, apenas a fase D apresentou maior consumo habitual de calorias que a fase C, e menor de lipídios que as fases C e S.

Os valores de consumo habitual (média de 3 dias) e do dia das coletas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores médios de consumo habitual (3 dias antes da coleta) e do dia da coleta nas diferentes fases do estudo, de macro e micronutrientes

NUTRIENTES	1ª FASE CONTROLE		2ª FASE DIETA		3ª FASE SUPLEMENTO		REFERÊNCIAS
	Consumo habitual	Dia da coleta	Consumo habitual	Dia da coleta	Consumo habitual	Dia da coleta	
Calorias (kcal)	2318,71 ± 643,84 ^a	2295,79 ± 557,87 ^a	2699,32 ± 549,83 ^b	2648,48 ± 739,90 ^b	2526,88 ± 554,53	2305,56 ± 873,44	¹
Carboidrato (g/kg)	4,46 ± 1,39	4,55 ± 1,26	5,53 ± 0,57	5,29 ± 1,18	4,48 ± 0,83	4,80 ± 0,77	6-10g/Kg ²
Proteína (g/kg)	1,49 ± 0,4	1,45 ± 0,4	1,66 ± 0,3	1,53 ± 0,54	1,70 ± 0,42	1,53 ± 0,5	1,2-1,7g/Kg ²
Lípídeos (%VCT)	31,92 ± 3,72 ^a	30,06 ± 2,48	27,72 ± 5,64 ^b	29,35 ± 5,2	33,59 ± 3,59 ^a	32,65 ± 8,7	20-35%VCT ²
Colesterol (mg)	247,55 ± 133,8	216,89 ± 97,37	218,78 ± 78,85	209,39 ± 119,95	271,04 ± 113,15	8,70 ± 129,21	<300mg/d ³
Fibras (g)	16,52 ± 9,83	19,04 ± 6,22	15,96 ± 6,14	14,48 ± 10,13	14,98 ± 7,08	16,00 ± 8,01	H: 38g/d M: 25-26g/d ³
Ácido ascórbico (mg) #	143,13 ± 73,84 ^a	171,90 ± 150,41	490,08 ± 45,01 * ^b	137,20 ± 152,35 **	634,46 ± 118,34 * ^c	156,01 ± 117,69 **	H: 75-90mg/d M: 65-75mg/d ³
Vitamina E (mg)	3,91 ± 3,0	4,56 ± 4,3	3,26 ± 1,89	3,39 ± 2,83	4,10 ± 2,34	3,41 ± 2,5	H/M: 15mg/d ³
Retinol (Eq)	699,42 ± 195,99	512,30 ± 267,64	759,57 ± 333,29	788,56 ± 579,56	807,87 ± 220,52	899,97 ± 1075,41	H: 900Eq/d M: 700Eq/d ³
Selênio (mg)	84,70 ± 62,06	61,34 ± 35,22	70,32 ± 34,21	70,35 ± 38,59	79,39 ± 23,69	66,96 ± 30,14	H/M: 55mg/d ³
Zinco (mg)	8,68 ± 3,53	8,12 ± 3,67	10,65 ± 4,19	7,82 ± 3,88	11,52 ± 5,24	8,67 ± 4,18	H: 11mg/d M: 8-9mg/d ³
α - tocoferol (mg)	1,2 ± 1,17	1,16 ± 1,05	1,45 ± 1,21	1,42 ± 1,82	2,01 ± 2,01	1,40 ± 1,26	⁴

(*) em números diferentes indicam diferença estatística dentro da fase (p<0,05).

(a, b, c) letras diferentes indicam diferença estatística entre as fases (p<0,05).

¹ Para avaliar a adequação da ingestão calórica, utilizou-se como parâmetro a classificação nutricional do Índice de Massa Corporal (IMC). Dentro da faixa de eutrofia, consumo adequado; acima, consumo excessivo; e abaixo, consumo inadequado (CUPPARI; SCHOR, 2005).² Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada and American College of Sports Medicine: Nutrition and Athletic Performance, 2009.³ PADOVANI et al. Dietary Reference Intakes: Aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais, 2006.⁴ Não possui valores de referência.

% VCT – porcentagem do valor calórico total/ H: homem/ M: mulher

Ácido ascórbico na 2ª e 3ª fases não representam o consumo habitual, pois possuem a adição de vitamina C pelo estudo.

6.4 Parâmetros Bioquímicos:

As concentrações de colesterol total e LDL-c estavam dentro dos limites de normalidade na 1ª e 2ª fase, porém na 3ª fase 46,1% (n=6) e 15,4% (n=2) dos atletas apresentaram valores acima do normal para CT e LDL-c, respectivamente. Os valores de glicemia, TGO e TGP encontraram-se alterados apenas na 1ª fase, a glicemia em 1 indivíduo e TGO e TGP em outro. Triglicérides apresentou-se elevado em apenas 1 atleta em cada fase. Os valores de HDL-c foram menores que os valores recomendados para 2 indivíduos na 1ª fase, 6 na 2ª fase, e 6 na 3ª fase; no entanto apenas 2 indivíduos (15,4%) apresentaram esta inadequação nas 3 fases do estudo. Os níveis de creatinina encontraram-se elevados em 46,1% (n=6), 53,8% (n=7) e 92,3% (n=12) dos indivíduos respectivamente, na 1ª, 2ª e 3ª fase, porém apenas 3 indivíduos apresentaram valores elevados nas 3 fases do estudo. Já os níveis de uréia foram elevados em 3 indivíduos em cada uma das fases, sendo que 3 indivíduos apresentaram valores elevados em apenas 2 fases. A creatina quinase (CK) estava dentro da faixa de normalidade para atleta em todos os indivíduos e em todas as fases. Os valores médios e desvios-padrão dos exames bioquímicos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios e desvios-padrão dos exames bioquímicos de jejum nas diferentes fases

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	1ª FASE CONTROLE	2ª FASE DIETA	3ª FASE SUPLEMENTO	VALORES DE REFERÊNCIA
Glicemia (mg/dl)	74,66 ± 12,59	84,81 ± 7,37	74,86 ± 11,61	<100mg/dl ¹
Triglicérides (mg/dl)	92,81 ± 35,67	77,88 ± 34,86	100,13 ± 42,18	<150mg/dl ²
Colesterol total (mg/dl)	160,64 ± 25,54	148,80 ± 27,12 ^a	192,67 ± 44,88 ^b	<200mg/dl ²
HDL-c (mg/dl)	55,95 ± 12,18	47,75 ± 9,9	48,74 ± 11,13	♂ >40mg/dl ² ♀ >50mg/dl
LDL-c (mg/dl)	86,13 ± 21,9 ^a	85,47 ± 24,96 ^a	118,44 ± 41,15 ^b	<160mg/dl ²
TGO (U/L)	25,99 ± 6,47 ^a	20,47 ± 0,93 ^b	20,95 ± 0,85 ^b	♂ 11 – 39U/L ³ ♀ 10 – 37U/L
TGP (U/L)	22,16 ± 7,93 ^a	16,75 ± 0,99 ^b	18,56 ± 0,57	♂ 11 – 39U/L ³ ♀ 10 – 37U/L
Uréia (mg/dl)	40,53 ± 6,75	40,26 ± 6,11	43,64 ± 5,76	15-45mg/dl ³
Creatinina (mg/dl)	1,15 ± 0,41	1,10 ± 0,16	1,23 ± 0,09	♂ 0,7 – 1,2mg/dl ³ ♀ 0,53 – 0,99mg/dl
Creatina quinase (U/L)	135,47 ± 52,68	140,77 ± 44,89	129,35 ± 69,2	♂ 82 – 1083U/L ⁴ ♀ 47 – 513U/L

¹ Sociedade Brasileira de Diabetes² Sociedade Brasileira de Cardiologia³ Labtest⁴ MOUGIOS, V. Reference intervals for serum creatine kinase in athlete, 2007.

(a,b) – letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05)

6.4.1 Adequação dos valores basais de antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo:

Em relação aos antioxidantes, a vitamina C encontrou-se menor que os valores adequados em apenas 1 indivíduo na 1ª fase. Já a vitamina E esteve abaixo dos valores normais em 2 indivíduos na 1ª fase, 4 na 2ª fase e 12 na 3ª fase. O ácido úrico apresentou grande variação, na 1ª fase 3 indivíduos apresentaram valores elevados, já nas 2ª e 3ª fases, respectivamente, 6 e 3 indivíduos apresentaram valores abaixo do normal. Como não existem valores de referência para TBARS livre, TBARS total, FOX e GSH, não foi possível analisar as adequações.

6.4.2 Comparações entre as fases e dentro das fases:

6.4.2.1 Antioxidantes:

A fase na qual os indivíduos receberam dieta rica em ácido ascórbico (fase D) apresentou valores 28,37% maiores de vitamina C sérica logo após o exercício que na fase C ($p=0,02$ IC:0,08-1,06), enquanto na fase S tinha 36,84% mais vitamina C antes do exercício que a fase C ($p=0,03$ IC:0,06-1,36). Ou seja, a fase C sempre apresentou valores de vitamina C menores que as outras fases, mas não apresentou variação dos níveis de vitamina C durante as etapas (AE, LA e 24h). Já a fase D apresentou valores logo após o exercício 15,85% maiores que antes ($p=0,04$ IC:0,01-0,5) e 23,37% maiores que 24 horas depois do exercício ($p=0,01$ IC:0,11-0,6). E ainda a fase S apresentou valores de 24h após o exercício 26,38% menores que antes ($p<0,01$ IC:0,13-0,63) e 19,44% menores que logo após o exercício ($p=0,03$ IC:0,04-0,53).

A fase S começou o exercício com níveis de vitamina E 60,63% menores que a fase C ($p=0,02$ IC: 2,61-27,46) e 79,43% menores que a fase D ($p<0,01$ IC:5,54-18,02). E por isso os valores 24 horas após o exercício foram 68,75% maiores que antes do exercício na fase que os indivíduos receberam suplemento de vitamina C ($p<0,01$ IC:3,7-14,08). Nesta fase, os valores médios de vitamina E antes do exercício e logo após são menores que os valores considerados normais.

A fase S apresentou valores de GSH 52,51% maiores que a fase C ($p<0,01$ IC:0,56-1,76) e 78,43% maiores que a fase D ($p<0,01$ IC:1,03-1,53) em todos os momentos, e ainda apresentou valores de 24 horas após o exercício 91,41% maiores que antes do exercício ($p<0,01$ IC:0,17-0,81) e 26,83% maiores que logo após ($p<0,01$ IC:0,34-0,97).

Os valores de ácido úrico na fase C foram 163,57% maiores que na fase D ($p<0,01$ IC:3,32-7,46) e 130,94% maiores que na fase S ($p<0,01$ IC:2,23-8,01), as quais mantiveram constante os níveis de ácido úrico, enquanto na fase C houve aumento de 20,36% logo após o exercício ($p=0,05$ IC:0,02-2,36) em relação à antes do exercício, este aumento se manteve 24 horas depois do mesmo ($p<0,01$ IC:0,9-3,3).

As figuras 4 e 5 apresentam os gráficos com a variação das concentrações plasmáticas dos antioxidantes.

Figura 4 – Concentrações plasmáticas médias das vitaminas antioxidantes, vitamina C e vitamina E nas diferentes fases, antes do exercício, logo após o exercício e 24 horas depois. (*) em números diferentes indicam diferença estatística dentro da fase ($p < 0,05$). (a, b) letras diferentes indicam diferença estatística entre as fases ($p < 0,05$).

Figura 5 – Concentrações plasmáticas médias dos antioxidantes glutatona (GSH) e ácido úrico nas diferentes fases, antes do exercício, logo após o exercício e 24 horas depois.

(*) em números diferentes indicam diferença estatística dentro da fase ($p < 0,05$).

(a, b) letras diferentes indicam diferença estatística entre as fases ($p < 0,05$).

6.4.2.2. Marcadores de lesão hepática e muscular, e peroxidação lipídica:

Os níveis de TGO, marcador de lesão hepática e tecidual, na fase C foram 36,01% maiores em relação à fase D ($p < 0,01$ IC:6,62-15,73) e 36,14% maiores que na fase S ($p < 0,01$ IC:6,53-19,29) em todos os momentos. E ainda na fase C, antes da intervenção, os valores logo após o exercício são 20,39% maiores que antes do exercício ($p < 0,01$ IC:2,83-7,78) e 9,37% maiores que 24 horas depois ($p = 0,03$ IC:0,21-5,16). No geral os níveis de CK, marcador de lesão muscular, logo após o exercício foram 31,35% maiores que 24 horas após o exercício (fase C $p = 0,01$ IC:8,72-63,95 / fase D $p = 0,01$ IC:8,88-64,1 / fase S $p = 0,01$ IC:12,16-67,38). Não houve diferença nos níveis de CK entre as fases (Figura 6)

Em relação aos biomarcadores de peroxidação lipídica, os valores de TBARS total não tiveram diferença entre as fases. Porém a fase D apresentou valores antes do exercício 24,14% maiores que logo após ($p = 0,02$ IC:0,19-2,61) e 41,01% maiores que 24 horas depois do exercício ($p = 0,01$ IC:0,57-2,99). E ainda a fase S valores de 24h após o exercício 33,75% menores que logo após o mesmo ($p = 0,03$ IC:0,15-2,57). Na fase C houve aumento de TBARS total após o exercício, mas esse aumento não foi significativo. O TBARS livre se comportou da mesma maneira que o TBARS total, sem diferença entre as fases. E na fase S os valores antes do exercício foram 75,65% maiores que logo após ($p = 0,01$ IC: 0,24-1,49) e 129,54% maiores que 24 horas depois do exercício ($p < 0,01$ IC:0,51-1,76). E na fase D os valores antes do exercício 60,52% maiores que 24h após ($p = 0,04$ IC: 0,02-1,37). Na fase C também houve aumento de TBARS livre, mas também não foi estatisticamente significativo. Os valores de FOX, outro biomarcador de peroxidação lipídica, na fase D foram 35,99% menores que na fase C ($p < 0,01$ IC: 2,55-8,26) e 31,34% menores que na fase S ($p = 0,02$ IC: 0,33-3,41). Mas a fase C apresentou valores maiores em todos os momentos em relação à fase D, 55,61% antes do exercício ($p < 0,01$ IC:3,69-10,08), 23,72% logo após ($p = 0,01$ IC:1,23-7,68) e 29,39% 24 horas depois ($p < 0,01$ IC:1,69-8,06); enquanto a fase S apenas apresentou valores 45,81% maiores que a fase D apenas antes do exercício ($p = 0,01$ IC:0,82-5,02). No entanto nenhuma fase apresentou alterações dos níveis de FOX, a fase C teve um aumento após o exercício, porém não foi significativo (Figura 7).

Figura 6 – Concentrações plasmáticas médias dos marcadores de lesão hepática (transaminase glutâmico oxalacética - TGO) e lesão muscular (creatina quinase - CK) nas diferentes fases, antes do exercício, logo após o exercício e 24 horas depois.

(*) em números diferentes indicam diferença dentro da fase ($p < 0,05$).

(a, b) letras diferentes indicam diferença entre as fases ($p < 0,05$).

Figura 7 - Concentrações plasmáticas médias dos marcadores de peroxidação lipídica TBARS total, TBARS livre e FOX nas diferentes fases, antes do exercício, logo após o exercício e 24 horas depois. (*) em números diferentes indicam diferença dentro da fase ($P < 0,05$). (a, b) letras diferentes indicam diferença entre as fases ($p < 0,05$).

6.4.2.3 Marcadores de alterações fisiológicas:

A creatinina, além de marcador de função renal, pode indicar alterações na massa muscular. Quando os nadadores não receberam adição de vitamina C à dieta (fase C) tiveram um aumento de 25,22% de creatinina, logo após a atividade ($p<0,01$ IC:0,12-0,47) e uma diminuição aos níveis anteriores ao treino, 24 horas após a atividade ($p<0,01$ IC:0,12-0,47). Porém não houve diferença dos níveis de creatinina entre as fases.

Já os níveis de uréia podem refletir um maior catabolismo protéico e tem sido usada como marcador da intensidade de treino do dia anterior. Os atletas apresentaram níveis de uréia, antes do exercício, iguais nas 3 fases. E 24 horas após o exercício, não houve diferença das fases D e S com a fase controle. Porém a fase S apresentou valores 11,87% maiores que a fase C logo após o exercício ($p=0,01$ IC: 1,2-8,73) e 14,55% maiores que fase D 24 horas após o exercício ($p=0,05$ IC:1,75-9,65). Apenas na fase D houve uma variação dos níveis de uréia com o exercício e esta variação ocorreu 24 horas após o mesmo ($p<0,01$ IC: 2,38-10,46), com uma diminuição de 15,58%, enquanto nas outras fases a uréia se comportou de maneira constante (Figura 8).

Figura 8 - Concentrações plasmáticas médias dos marcadores de alterações fisiológicas (creatinina e uréia) nas diferentes fases, antes do exercício, logo após o exercício e 24 horas depois. (*) em números diferentes indicam diferença dentro da fase ($p < 0,05$). (a, b) letras diferentes indicam diferença entre as fases ($p < 0,05$).

Resumindo, a fase C apresentou valores maiores de ácido úrico e TGO que as outras fases e menores de vitamina C, além de elevação dos níveis de ácido úrico, TGO e creatinina logo após o exercício. A fase D apresentou menores valores de FOX em todas as etapas e mais vitamina C logo após o exercício que a fase C. Imediatamente após o exercício houve aumento de vitamina C e diminuição de TBARS total, e 24 horas após o exercício o TBARS total continuou menor que antes do exercício e o TBARS livre diminuiu em relação à antes do exercício. E na fase S os níveis de GSH foram maiores que nas outras fases e havia mais vitamina C antes do exercício que a fase C. Os valores de vitamina E antes do exercício foram menores e ainda, 24 horas após o exercício, apresentou valores menores de vitamina C, de TBARS total e TBARS livre, maiores de vitamina E e GSH. Em nenhuma fase, sem intervenção ou com intervenção, houve aumento significativo de FOX após o exercício e também não houve diferença de valores de TBARS total, TBARS livre e CK entre as fases.

A Tabela 5 apresenta os valores médios e desvios-padrão dos marcadores de estresse oxidativo, antioxidantes, marcadores de lesão hepática e tecidual, e marcadores de alterações fisiológicas, antes do exercício, logo após e 24 horas depois.

Tabela 5 – Valores médios e desvios-padrão dos marcadores de estresse oxidativo, antioxidantes, marcadores de lesão hepática e tecidual, e marcadores de alterações fisiológicas, antes do exercício (AE), logo após (LA) e 24 horas depois (24h)

	1ª FASE – CONTROLE			2ª FASE – DIETA			3ª FASE – SUPLEMENTO			VALORES DE	
	AE	LA	24h	AE	LA	24h	AE	LA	24h	REFERÊNCIA	
Vitamina C	1,33 ±	1,48 ±	1,35 ±	1,64 ±	1,9 ±	1,54 ±	1,82 ±	1,72 ±	1,44 ±	0,6 – 2,0mg/dl ¹	
(mg/dl)	0,36 ^a	0,36 ^a	0,73	0,31*ab	0,27**b	0,3*	0,35*ab	0,32*ab	0,25**		
Vitamina E	20,77 ±	19,31 ±	20,05 ±	23,2 ±	19,13 ±	18,18 ±	12,93 ±	17,41 ±	21,82 ±	18 – 29 µmol/L ¹	
(µmol/L)	4,7 ^a	5,19	4,87	8,19 ^a	7,03	3,28	6,12* ^b	13,24	7,17**		
GSH	1,77 ±	1,83 ±	1,79 ±	1,52 ±	1,68 ±	1,38 ±	2,63 ±	2,46 ±	3,12 ±	#	
(nmol/gPtn)	0,5 ^a	0,24 ^a	0,2 ^a	0,32 ^a	0,32 ^a	0,34 ^a	0,48* ^b	0,6* ^b	0,49** ^b		
Ácido úrico	6,04 ±	7,27 ±	8,14 ±	2,28 ±	3,13 ±	2,68 ±	2,44 ±	3,47 ±	3,29 ±	♂ 2,5 – 7,0mg/dl ²	
(mg/dl)	0,86* ^a	1,56** ^a	3,18** ^a	1,34 ^b	1,8 ^b	2,1 ^b	0,76 ^b	1,62 ^b	1,05 ^b		♀ 1,5 – 6,0mg/dl
TGO	25,99 ±	31,29 ±	28,61 ±	20,47 ±	21,8 ±	20,87 ±	20,95 ±	21,3 ±	20,83 ±	♂ 11 – 39U/L ²	
(U/L)	6,47* ^a	7,65** ^a	5,44 ^a	0,93 ^b	1,26 ^b	0,9 ^b	0,85 ^b	1,68 ^b	0,98 ^b		♀ 10 – 37U/L
CK	135,47 ±	160,36 ±	124,02 ±	140,77 ±	160,85 ±	124,35 ±	129,35 ±	152,08 ±	112,31 ±	♂ 82 – 1083U/L ³	
(U/L)	52,68	57,75*	48,02**	44,89	41,8*	52,09**	69,2	88,17*	53,7**		♀ 47 – 513U/L
TBARS total	5,36 ±	5,71 ±	5,38 ±	6,12 ±	4,93 ±	4,34 ±	5,25 ±	5,43 ±	4,06 ±	#	
(nmol/gPtn)	1,24	1,5	1,58	1,03*	0,88**	1,57**	2,01	2,22*	1,66**		
TBARS livre	0,78 ±	1,14 ±	1,01 ±	1,83 ±	1,53 ±	1,14 ±	2,02 ±	1,15 ±	0,88 ±	#	
(nmol/gPtn)	0,38	0,48	0,62	1,12*	0,66	0,63**	1,16*	0,91**	0,6**		
FOX	13,18 ±	11,63 ±	11,93 ±	8,47 ±	9,4 ±	9,22 ±	12,35 ±	12,19 ±	11,04 ±	#	
(µmol/L)	3,43 ^a	1,81 ^a	1,92 ^a	1,22 ^b	2,31 ^b	2,21 ^b	2,06 ^a	3,97	2,45 ^a		
Creatinina	1,15 ±	1,44 ±	1,15 ±	1,10 ±	1,20 ±	1,13 ±	1,23 ±	1,35 ±	1,13 ±	♂ 0,70 – 1,2mg/dl ²	
(mg/d)	0,41*	0,61**	0,27*	0,16	0,24	0,12	0,09	0,14	0,14		♀ 0,53 – 0,99mg/dl
Uréia	40,53 ±	39,58 ±	39,78 ±	40,26 ±	41,47 ±	35,88 ±	43,64 ±	44,28 ±	41,10 ±	15 – 45 mg/dl ²	
(mg/dl)	6,75	6,9 ^a	4,68	6,11*	4,81*	4,40** ^a	5,76	8,39 ^b	7,60 ^b		

não possui valor de referência; ¹YOUNG, D.S. Implementation of SI Units for Clinical Laboratory Data: Style Specifications and Conversion Tables, 1987.; ²Labtest;

³MOUGIOS, V. Reference intervals for serum creatine kinase in athlete, 2007.

(*) em números diferentes indicam diferença estatística dentro da fase (p<0,05).

(a, b) letras diferentes indicam diferença estatística entre as fases (p<0,05).

6.5 Correlações:

Através do Gráfico 3 podemos observar que, como era esperado, quanto maior o consumo de ácido ascórbico exógeno, maiores os níveis de vitamina C sérica antes do exercício.

Gráfico 3 – Correlação entre concentração sérica de vitamina C antes do exercício e o consumo de ácido ascórbico

O consumo de ácido ascórbico ainda apresenta correlação com os níveis de TGO e ácido úrico séricos. Através dos gráficos abaixo podemos perceber que estas correlações são negativas, ou seja, quanto mais vitamina C exógena menos TGO (Figura 9) e menos ácido úrico (Figura 10) no sangue, tanto antes do exercício, como logo após e 24 horas depois do exercício.

Figura 9 – Gráficos de correlação entre as variáveis ácido ascórbico da dieta e TGO sérico, antes do exercício (A), logo após o exercício (B) e 24 horas depois do exercício (C).

Figura 10 – Gráficos de correlação entre as variáveis ácido ascórbico da dieta e ácido úrico sérico, antes do exercício (A), logo após o exercício (B) e 24 horas depois do exercício (C).

O consumo de ácido ascórbico não teve correlação com as variáveis TBARS total, TBARS livre, FOX e GSH, nem com o consumo de fibras. A vitamina C sérica não apresentou correlação com quase nenhuma das variáveis do estudo, apenas correlação negativa com os níveis séricos de ácido úrico na fase S antes do exercício e logo após o mesmo (Figura 11), e correlação positiva com os níveis séricos de vitamina E 24 horas após o exercício na fase S (Gráfico 4).

Figura 11 – Correlação entre os níveis de vitamina C e ácido úrico séricos, antes do exercício (A) e logo após na fase S (B).

Gráfico 4 – Correlação entre os níveis séricos de vitamina C e E, 24 horas após exercício na fase S

Ainda, não houve correlação entre as variáveis TBARS total e FOX. Nem entre o consumo de lipídeos (%) e carboidratos (g/Kg) nem proteínas (g/Kg). Também não houve correlação entre a ingestão de lipídeos (%) e colesterol (mg) com os níveis séricos de colesterol total e LDL-c, apesar de ter sido observado que na fase S, a qual apresentou maior número de indivíduos com valores séricos elevados de colesterol e LDL-c, houve uma maior prevalência de consumo excessivo de lipídeos e colesterol. Em relação ao consumo de proteína, não houve correlação com os níveis de creatinina e ácido úrico, apesar de um grande número de indivíduos com consumo elevado de proteína apresentarem níveis elevados de creatinina, como dito anteriormente.

Resumindo, antes do exercício quanto mais ácido ascórbico na dieta mais vitamina C, menos TGO e menos ácido úrico no sangue. Logo após o exercício e 24 horas depois quanto mais ácido ascórbico menos TGO e menos ácido úrico séricos.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Muitos atletas fazem uso de suplementos antioxidantes, porém sem a devida orientação e às vezes sem necessidade. No presente estudo os atletas apresentaram um elevado consumo de suplementos alimentares, sendo que a associação de suplementos protéicos e energéticos foi o relato mais freqüente (41,6%), porém na prática, o uso de suplementos energéticos foi o mais descrito. Nestes nadadores, o consumo de suplementos antioxidantes não foi comum, apenas 25% dos atletas referiram fazê-lo. Concordando com os achados de Paschoal e Amancio (2004), em que 25% dos nadadores, homens, consumiam suplementos antioxidantes, porém discordando em relação ao uso de suplemento de aminoácidos, feito por 62,5% deles. Já em um grupo de ultramaratonistas o uso de suplementos de vitaminas e minerais foi habitual, em ambos os sexos, o que resultou em uma ingestão diária de micronutrientes acima das recomendações. Do mesmo modo ocorreu com jogadores de futebol que apresentaram uma freqüente utilização destes suplementos (PANZA et al., 2007). Ainda em nadadores de alto rendimento, acompanhados por 8 meses de treino, o consumo de suplementos de ferro e polivitamínicos foram os mais usuais; a média de consumo de ferro e vitamina E foram bem acima das recomendações de consumo para homens e mulheres, e apenas nas mulheres a oferta de folato e vitamina C foram muito maiores que as correspondentes DRIs, porém as recomendações de vitamina E só foram atingidas com a adição de suplemento (KABASAKALIS et al., 2007).

O irresistível número e aumento da disponibilidade de suplementos esportivos são desafiadores para os praticantes de atividade física e atletas. Apesar de serem altamente utilizados, poucos melhoram a performance e alguns causam até preocupação, já que geralmente os consumidores de suplementos utilizam estas substâncias em doses muito acima do recomendável (BARROS NETO, 2001).

Atletas representam uma população potencialmente exposta ao dano oxidativo. Em adição, alterações do status antioxidante podem ser relacionadas a deficiências específicas resultante de um consumo alimentar inadequado e desbalanceado. Por isso o consumo de suplementos antioxidantes em atletas tem gerado grande interesse. Ao mesmo tempo um consumo excessivo de suplementos antioxidantes pode falhar em oferecer uma proteção antioxidante e ainda reduzir o

efeito adaptativo do sistema antioxidante endógeno (ROUSSEAU et al., 2004). Porém é fato que, a grande procura por práticas dietéticas que possam otimizar o rendimento esportivo, tem levado a um maior interesse pela utilização de suplementos nutricionais do que por condutas alimentares ajustadas aos objetivos do treinamento (PANZA et al., 2007).

Suplementos nutricionais nunca substituirão a composição genética, anos de treino e alimentação ideal (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION; DIETITIANS OF CANADA; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2009). Escolhas alimentares apropriadas podem levar a melhora da performance e habilidade de treino, enquanto inadequadas práticas de alimentação podem ser prejudiciais para a saúde e performance (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2009).

O consumo de antioxidantes exógenos, através da alimentação, auxilia na capacidade antioxidante do organismo. O consumo alimentar de vitamina C pelos nadadores do presente estudo, através da alimentação habitual, foi insuficiente para um grande número deles, só apresentaram adequação devido ao uso adicional nas fases em que foram feitas intervenções. Ao mesmo tempo o consumo de selênio, outro antioxidante, foi adequado para a maioria da amostra estudada, enquanto o consumo de vitamina E foi inadequado em todos os indivíduos. O consumo de zinco e retinol, que também possuem funções antioxidantes, foi muito variável, e por isso não é capaz de auxiliar e/ou contribuir para a defesa antioxidante de maneira constante. Além disso, o único antioxidante que apresentou flutuações nas diferentes fases foi o ácido ascórbico, com a adição de vitamina C à dieta, ou pela dieta rica ou pelo uso de suplemento alimentar, e por isso pode-se dizer que essas diferenças devem ser responsáveis pelos resultados obtidos, ou seja, o único antioxidante da dieta que pode estar influenciando nos resultados do estudo é a vitamina C.

Ao mesmo tempo o consumo alimentar dos atletas do estudo é baixo em carboidratos e fibras, adequado em lipídeos e apresenta uma variação intra-individual de consumo de proteína. A carência de carboidrato pode afetar o desempenho dos atletas, uma vez que não permite uma adequada reposição dos estoques de glicogênio na fase de recuperação (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION; DIETITIANS OF CANADA; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2009), otimização dos estoques iniciais de glicogênio muscular, manutenção dos níveis de glicose sanguínea durante o exercício, além de

atenuação das alterações negativas no sistema imune devido exercício (PANZA et al., 2007). Vale lembrar que os valores de referência de consumo de gorduras para atletas, de acordo com a American Dietetic Association, Dietitians of Canada; American College of Sports Medicine (2009), aumentou para até 35% do valor calórico total (VCT) e por isso a maioria dos atletas apresentou consumo adequado. Se fossem considerados os valores de referência para a população saudável, até 30% do VCT, a maioria dos atletas (64,1%) apresentaria consumo excessivo de gorduras totais.

Analisando o consumo calórico em função do IMC, a maioria dos atletas apresentou um consumo adequado. Porém quando é feita uma análise através do planejamento dietético de energia, calculando a necessidade estimada de energia (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002) considerando idade, sexo, peso, altura e atividade física, além do desvio-padrão (homens $\pm 199\text{kcal}$, mulheres $\pm 162\text{kcal}$) com intervalo de confiança de 95% para equação, apenas 1 indivíduo apresentaria um consumo ideal de calorias nas 3 fases do estudo, 8 indivíduos em 2 fases, 3 indivíduos consumo insuficiente nas 3 fases, e 1 indivíduo baixo consumo em 2 fases. No entanto vale lembrar que para a avaliação do consumo dietético de energia o correto é utilizar o peso corporal como marcador biológico do equilíbrio ou desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia. Para indivíduos com IMC dentro da faixa de normalidade ($18,5 - 24,9 \text{ kg/m}^2$), a ingestão habitual provavelmente está adequada em quantidade, o que não significa que também estará adequada em qualidade (CUPPARI; SCHOR, 2005). O consumo calórico adequado é necessário para manter a saúde do atleta, o peso corporal e maximizar os efeitos do treino (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION; DIETITIANS OF CANADA; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2009). A baixa ingestão de energia pode resultar em fornecimento insuficiente de importantes nutrientes relacionados ao metabolismo energético, à reparação tecidual, ao sistema antioxidante e à resposta imunológica (PANZA et al., 2007).

Atletas com maior risco de consumo insuficiente de micronutrientes são aqueles que restringem o consumo de calorias, tem prática de severa perda de peso, aqueles que eliminam um ou mais grupos de alimentos de sua dieta, ou que consomem dietas desbalanceadas e com baixa densidade de micronutrientes. Estes atletas podem se beneficiar de um suplemento de vitamina e mineral. Porém é bem descrito que o uso deste tipo de suplemento não aumenta performance em

indivíduos que consomem dietas nutricionalmente adequadas (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION; DIETITIANS OF CANADA; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2009). O consumo de uma dieta variada e balanceada parece atender o incremento nas necessidades de micronutrientes gerado pelo treinamento. Porém o poder aquisitivo do atleta e os aspectos culturais podem constituir-se em importantes determinantes da qualidade e da quantidade de alimentos consumidos (PANZA et al., 2007).

A necessidade de vitaminas e minerais antioxidantes para atletas ainda é a mesma que para indivíduos saudáveis. Porém se houver uma maior utilização de antioxidantes para conter o estresse oxidativo gerado pelo exercício, as suas necessidades nutricionais podem ser maiores (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION; DIETITIANS OF CANADA; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2009). Além da defesa antioxidante, as vitaminas e minerais participam de processos celulares relacionados ao metabolismo energético, contração, reparação, crescimento muscular e resposta imune. Já que o exercício agudo e treinamento podem levar a alterações no metabolismo, na distribuição e na excreção de vitaminas e minerais, as necessidades de micronutrientes específicos podem ser afetadas conforme as demandas fisiológicas, em resposta ao esforço. Alguns autores supõem que atletas possam apresentar as necessidades relativas a determinados tipos de micronutrientes acima da *Recommended Dietary Allowance* (RDA) (PANZA et al., 2007).

De acordo com Paschoal e Amancio (2004), nadadores de alto rendimento apresentaram um consumo adequado de calorias, vitaminas e minerais, com exceção do cálcio, para o qual somente metade da amostra atingiu a recomendação. Também apresentaram um baixo consumo de carboidrato e alto consumo de proteína e colesterol. Estudos mostram um consumo alimentar deficiente em nadadores, que ainda, nem sempre ajustam as necessidades de nutrientes ao estresse do treino. Em estudo com 9 nadadores, o consumo de energia e macronutrientes não mudaram em relação aos períodos de treino, já o consumo de micronutrientes teve uma pequena modificação; estes atletas possuíam baixo consumo de carboidrato, alto consumo de lipídeos e inadequado consumo de alguns micronutrientes (KABASAKALIS et al., 2007).

Diferente dos nossos achados, um estudo que avaliou homens bem treinados observou que eles consumiam quantidades suficientes de calorias, carboidratos,

proteínas, lipídeos, vitaminas C, E e A; e ainda o consumo de vitamina C excedeu a recomendação de 90mg/d (BLOOMER et al., 2005). Em outro estudo, com atletas franceses, o consumo de vitamina C, E e beta-caroteno foram abaixo das recomendações diárias francesas para 60%, 81% e 43% dos atletas, respectivamente (ROUSSEAU et al., 2004). Atletas profissionais de rúgbi apresentam consumo de carboidratos menor que a recomendação diária e consumo de lipídeos maior que os valores ideais, e, em relação à ingestão de antioxidantes, a média de consumo de vitamina A e E foram maiores que os valores recomendados, enquanto a de vitamina C foi menor (FINAUD et al., 2006).

Estas diferenças nos resultados podem ser em consequência das diferentes tabelas de composição de alimentos e softwares utilizados para as análises dos dados, assim como o número de dias de recordatório alimentar e ainda diferentes modalidades esportivas e valores de referência utilizados na análise. Ao mesmo tempo nos mostra que falta orientação nutricional adequada para uma grande quantidade de atletas. Esta ausência de orientação profissional e a influência de treinadores, parentes e amigos podem também contribuir com as razões que levam à adoção de certos comportamentos alimentares que tornam os atletas vulneráveis às deficiências nutricionais, comprometendo o desempenho. Por isso a importância da educação nutricional para promover um consumo balanceado, oferecendo todos os nutrientes em ótimas quantidades, evitando a ingestão desnecessária de suplementos nutricionais, mantendo o desempenho ideal e melhorando a saúde de nadadores (PASCHOAL; AMANCIO, 2004).

Tem sido sugerido que quando a dieta não satisfaz as necessidades de antioxidantes, a suplementação deve ser recomendada. Contudo muitos estudos têm mostrado nenhum benefício da suplementação antioxidante de vitamina E, vitamina C e beta-caroteno em atletas. Também se deve lembrar que a qualidade dos dados de alguns antioxidantes, como o conteúdo de carotenóides dos alimentos é considerada limitada (ROUSSEAU et al., 2004), por isso existe uma dificuldade em afirmar a deficiência no consumo de alguns micronutrientes.

Além do consumo habitual foi quantificado o consumo alimentar no dia da coleta de dados para que fosse possível observar se existiram diferenças entre as fases. Em relação aos nutrientes antioxidantes analisados, o único que apresentou variação foi o consumo de ácido ascórbico, o que era objetivo do trabalho, a fim de relacionar os resultados com seu poder antioxidante durante o exercício, em relação

à fase controle (C). Ainda, como no dia das coletas não houve diferença de consumo de vitamina C entre as fases, pode-se dizer que os indivíduos encontravam-se com o mesmo perfil metabólico em relação a todos os antioxidantes analisados. A explicação para um consumo de vitamina C maior na fase S do que a fase D, é que o uso de 1 litro de suco de laranja por dia pode ter sido responsável pelo menor consumo de outros alimentos fonte de vitamina C em relação à fase S.

Um dos parâmetros que refletem o consumo alimentar, além de fundamental para avaliação do estado nutricional, são os exames bioquímicos. Neste sentido os atletas não apresentaram alterações de glicemia, triglicérides, TGO e TGP. Porém os valores de colesterol total e LDL-c apresentaram-se acima da normalidade para alguns atletas, mas apenas na fase S, na qual houve maior prevalência de consumo excessivo de lipídeos e colesterol, justificando os achados. A maioria dos atletas apresentou valores normais de HDL-c.

De acordo com Zanella, Souza e Godoy (2007), indivíduos fisicamente ativos apresentam níveis séricos mais baixos de colesterol, triglicérides e LDL-c, e concentrações mais elevadas de HDL-c que indivíduos inativos. Estas alterações que o exercício físico proporciona são devido: aumento da atividade da lipase lipoprotéica, que aumenta o catabolismo dos triglicérides e diminui formação de LDL-c; aumento da atividade da enzima lecitina-colesterol aciltransferase, que aumenta a conversão de colesterol livre em éster de colesterol, tornando as partículas mais densas e formando HDL2; diminuição da atividade da lipase hepática, que diminui os ésteres de colesterol que vão para o fígado e com isso impede a transformação de HDL2 em HDL3, e assim, maior permanência de HDL2 na circulação, que capta triglicérides e colesterol livre; e aumento da sensibilidade à insulina, que aumenta o efeito antilipolítico no tecido adiposo diminuindo assim a ida de ácidos graxos livres para o fígado, e conseqüentemente, diminuindo o triglicérides plasmático.

Baixos valores de HDL-c podem ser justificados pela privação alimentar prolongada e pelo uso de tabaco, no entanto nenhum destes fatores estiveram presentes no estudo. Assim é necessário repetir os exames para comprovar o baixo nível deste parâmetro em alguns indivíduos, que pode estar envolvido com algumas doenças como hipertireoidismo, diabetes e doença hepática (LEÃO; GOMES, 2007). No entanto vale lembrar que os valores de HDL-c só apresentaram inadequação nas 3 fases do estudo em apenas 2 indivíduos.

A **creatinina** é um composto nitrogenado e não protéico formado a partir da creatina. Pode ser mensurada no sangue ou na urina e sua concentração permanece praticamente inalterada ao longo de 24 horas. O músculo esquelético é o seu maior sítio de produção; dessa forma, variações em sua produção indicariam alterações diretamente proporcionais na massa muscular. A diminuição da massa muscular é um dos sintomas clássicos observados no supertreinamento (DA SILVA et al., 2006). Quando os nadadores do presente estudo não receberam adição de vitamina C à dieta (fase C) tiveram um aumento de creatinina logo após a atividade e uma diminuição aos níveis anteriores ao treino 24 horas após o exercício, indicando alteração de massa muscular com o treino, enquanto as fases com adição de vitamina C não apresentaram essa variação. Porém ao mesmo tempo não houve diferença estatística das concentrações de creatinina entre as fases, sugerindo iguais alterações musculares. Por outro lado, um alto consumo protéico pode estar associado a maiores níveis de creatinina, já que ela é formada a partir da creatina. No presente estudo dos indivíduos que tiveram um elevado consumo de proteína, 76% apresentaram concentrações séricas elevadas de creatinina, apesar de não existir nenhuma correlação entre estas variáveis. Sendo assim pode-se dizer que neste caso os valores elevados de creatinina devem estar associados ao elevado consumo protéico e não especificamente a alterações de massa muscular.

Já em relação aos níveis de **uréia**, nos indivíduos que estavam com valores elevados pode estar ocorrendo um maior catabolismo protéico (ANTUNES NETO et al., 2008). A uréia é sintetizada no fígado pelo dióxido de carbono e amônia, que são formados como produtos finais do catabolismo protéico. Após sua síntese, a uréia é transportada através do sangue para os rins, onde é filtrada pelos glomérulos. Muitos autores têm associado o aumento das concentrações de uréia com o aumento do catabolismo protéico e da gliconeogênese em resposta a cargas de treinamento intenso. Por isso ela tem sido utilizada como marcador da intensidade de treino do dia anterior, em atletas de endurance (CHEVION et al., 2003). No presente estudo os níveis de uréia antes do exercício, foram iguais nas 3 fases, indicando mesma intensidade de treino no dia anterior as coletas. Porém como a fase S apresentou valores maiores que a fase D 24 horas após o exercício, pode-se dizer que pelo marcador uréia, o treino do dia da coleta foi mais intenso na fase S que na fase D; no entanto em relação à fase C, não houve diferença.

Comparando os efeitos da oferta de vitamina C através de um suplemento alimentar ou de dieta rica em ácido ascórbico nos marcadores diretos e indiretos do estresse oxidativo, pode-se perceber que estas intervenções aumentaram o poder antioxidante, diminuíram a formação de radicais livres e dano celular em relação à fase em que os indivíduos não fizeram uso adicional do antioxidante vitamina C.

A **creatina quinase** (CK), um determinante de dano muscular, serve como marcador indireto de estresse oxidativo, uma vez que, a peroxidação lipídica induz a dano de membrana celular, e esta mais permeável, permite a liberação de substâncias intracelulares (FINAUD; LAC; FILARE, 2006). Ao mesmo tempo, o dano muscular resultante de exercício vigoroso é provavelmente a causa de reações inflamatórias locais e os fagócitos envolvidos com o dano tecidual são fontes de reações oxidantes (PEAKE, 2003). Por isso, os valores de CK mais elevados em atletas que em indivíduos sedentários saudáveis, pode ser resultado do persistente dano muscular, perda da integridade da membrana da célula e conseqüente liberação de proteína para o sangue. Em corredores os níveis de CK antes da corrida eram no mínimo 3 vezes maior que para a população saudável (CHEVION et al., 2003). No presente estudo os valores séricos de CK estão dentro da faixa de normalidade para atletas, porém se fosse considerado os valores para população saudável, todos os indivíduos apresentariam valores altos, acima do normal.

Além disso, a creatina quinase, serve como indicador direto da severidade do exercício, altos níveis de CK no plasma refletem a intensidade do programa (CHEVION et al., 2003). Já que não houve diferença dos níveis de CK entre as fases podemos dizer que a intensidade do treino foi semelhante nas 3 fases do estudo. E ainda, que o consumo adicional de ácido ascórbico não foi determinante para redução do dano estrutural de células musculares na amostra estudada, discordando de um estudo que diz que alguns destes danos, que são devido à produção de radicais livres, devem ser prevenidos pela alimentação otimizada, particularmente pelo aumento do consumo de antioxidantes (GOMEZ-CABRERA; DOMENECH; VIÑA, 2008). Porém, concorda com estudo feito com triatletas, no qual o uso de complexo antioxidante (selênio, retinol, ácido ascórbico e alfa tocoferol) não beneficiou o dano muscular (MARGARITIS et al., 2003). Enquanto de acordo com Palazzetti et al (2004), a suplementação de um complexo antioxidante (selênio, acetato retinil, ácido ascórbico e alfa tocoferol) induziu a uma redução do aumento de CK após atividade, sugerindo assim a necessidade de um complexo antioxidante

para redução do dano muscular e não apenas a utilização de um único antioxidante. Em um estudo com jogadores de futebol durante treino regular, os níveis plasmáticos de CK no grupo placebo foram 50% maiores que no grupo que recebeu suplementação de vitamina C (1000mg) e E (800mg) por 90 dias apenas no final da temporada de treino, refletindo uma maior intensidade de treino nesta fase e indicando um menor dano muscular com uso de suplemento antioxidante. Porém não houve diferença dentro dos grupos durante o período de treinamento (90 dias), os valores de CK no meio e no fim da temporada de treino não foram diferentes do início (ZOPPI et al., 2006).

De acordo com Chevion et al (2003) e Peake, Suzuki e Coombes (2007), o dano muscular pode contribuir para a produção de EROs quando a capacidade dos suplementos antioxidantes em neutralizar as EROs é derrubada. Porém, dados recentes indicam que os efeitos de suplementos antioxidantes no dano muscular induzido pelo exercício são variáveis.

A variação dos valores de CK com o exercício ocorreu apenas 24 horas após o treino, quando os valores séricos foram reduzidos, retomando aos valores basais. Logo após o exercício houve aumento de CK, porém este aumento não apresentou diferença estatística significativa. Diferente dos achados do presente trabalho, um estudo que avaliou estes níveis após corridas de longa duração, observou um grande aumento de CK entre o começo e o fim de cada corrida, e os valores não retomaram aos valores basais antes de outra corrida (CHEVION et al., 2003).

A **transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO)** ou aspartato aminotransferase (AST) é um indicador da função hepática. Valores elevados refletem injúria das células do fígado. Conseqüentemente existe a possibilidade da interação indireta entre o status antioxidante e a injúria hepática, assim como a muscular descrita acima (CHEVION et al., 2003). Diferente da TGP, a elevação de TGO não reflete apenas injúria hepática, mas sim injúria e morte celular em geral (LEÃO; GOMES, 2007).

Os valores de TGO foram maiores quando os nadadores não receberam adição de ácido ascórbico a dieta, em relação a quando receberam dieta rica em vitamina C (425,65mg) ou suplemento de vitamina C (500mg). Ainda, na fase C, houve aumento de dano tecidual e hepático com o exercício, evidenciado pelo aumento dos valores de TGO logo após a atividade, que foi diminuído 24 horas após o exercício, mas continuaram maiores que os valores basais. O uso de maiores

quantidades de vitamina C, não permitiu que isto ocorresse, como observada pela correlação negativa entre o consumo de vitamina C e os valores séricos de TGO, antes, logo após e 24 horas depois do exercício. Quanto maior o consumo de vitamina C, menores os níveis de TGO. Em estudo com corredores, que não ingeriram nenhum tipo de suplemento antioxidante, apenas uma alimentação balanceada, após corrida de 50 e 80km, houve aumento de AST (CHEVION et al., 2003).

Um estudo feito com camundongos, sob treinamento de natação, mostrou que o processo oxidativo gerado pelo exercício físico contribui com eventos de lesão celular, observados pelo aumento nos valores de CK e AST; e observou ainda que o treinamento físico exaustivo, mal estruturado, sem períodos de recuperação adequados, aumenta a ação das EROs, fazendo com que o sistema de defesa antioxidante não consiga modular-se a esse processo oxidativo, caracterizando uma situação de estresse oxidativo, com maiores danos celulares, que um treinamento sistematizado e devidamente controlado (ANTUNES NETO et al., 2008).

O **ácido úrico** representa grande parte da capacidade antioxidante total, aproximadamente 50% dizem alguns estudos, e o exercício crônico usualmente eleva sua concentração no soro (FINAUD; LAC; FILARE, 2006; GOUGOURA et al, 2007). Ele serve como um varredor de radicais livres *in vivo*. Durante o exercício físico intenso ocorre elevação da atividade do ciclo de degradação das purinas, onde fosfatos de purina, ricos em energia, são utilizados e catabolizados, resultando em acúmulo de hipoxantina, xantina e ácido úrico nos tecidos. A conversão de hipoxantina em xantina e ácido úrico, através da enzima xantina oxidase no fígado, é associada com a formação de radicais livres. Ou seja, umas das fontes de EROs durante o exercício incluem o aumento da oxidação de purinas (CHEVION et al., 2003; TAULER et al., 2003; ZANELLA; SOUZA; GODOY, 2007). Como o ácido úrico é um produto final do ciclo das purinas, apesar de ser caracterizado um antioxidante, seu aumento não pode ser considerado como uma adaptação específica contra o estresse oxidativo (FINAUD; LAC; FILARE, 2006).

No presente estudo, quando os indivíduos não receberam intervenção na oferta de vitamina C, apresentaram maiores níveis séricos de ácido úrico e aumento de 20,36% logo após atividade, o que pode refletir uma maior formação de radicais livres. Ou seja, em relação a quando receberam adição de vitamina C, apresentaram um maior grau de estresse oxidativo e, além disso, tiveram um aumento ainda maior

deste com o treinamento físico. Então o uso de 425,65 a 500mg de ácido ascórbico, ou através da dieta, ou pelo uso de suplemento alimentar, conteve o aumento de valores séricos de ácido úrico na amostra estudada, evidenciado pela correlação negativa entre o consumo de vitamina C e os níveis séricos de ácido úrico. Concordando com estes achados, um estudo feito com atletas participantes de competição de duatlon, o grupo que usava suplemento de vitamina C não teve elevação dos níveis de ácido úrico, ao contrário do grupo que não consumiu suplemento e teve um aumento de 37%, sugerindo que este aumento depende dos níveis plasmáticos de ácido ascórbico antes do exercício. Neste mesmo estudo, os valores de ácido úrico elevados logo após o exercício foram mantidos após 1 hora de recuperação (TAULER et al., 2003), no presente estudo estes níveis permaneceram elevados mesmo após 24 horas de recuperação.

Ainda, um estudo feito com corredores, evidenciou o aumento de ácido úrico no plasma durante a corrida, e associou esta alteração ao mecanismo de aumento do catabolismo dos nucleotídeos purina, que contribui com a produção de radicais livres (CHEVION et al., 2003). Da mesma maneira, foi observado em atletas de rúgbi, um aumento de ácido úrico no sangue e músculos após períodos de treino intenso e competição. Neste caso, sugerem que o aumento de ácido úrico no plasma pode estar compensando a depleção de outros antioxidantes, e por isso, deve ser interpretado como um indicador de efeito cumulativo de treino intenso e competição (FINAUD et al., 2006). Ainda após competição de meio *Ironman* houve aumento significativo de aproximadamente 48% nas concentrações plasmáticas de ácido úrico, que protegeu os atletas do aumento de peroxidação lipídica (SCHNEIDER et al., 2009). Por outro lado, um estudo com corredores altamente treinados, que treinavam entre 80 a 147 km por semana, observaram níveis menores de ácido úrico em relação a sujeitos sedentários (CHEVION et al., 2003).

Em um estudo cego, com atletas do sexo masculino, bem treinados, o uso diário de 1000 mg de suplemento de vitamina C evitou alterações de ácido úrico após 3 semanas de treinamento (20 ± 3 Km de corrida e treino isométrico 2 horas por dia, 3 vezes por semana), enquanto no grupo placebo os níveis aumentaram. Eles defendem que níveis elevados de ácido úrico são comumente observados em pessoas fisicamente ativas. Porém a interação ou compensação entre o ácido úrico e ácido ascórbico, fortes determinantes da capacidade antioxidante plasmática, seria

uma possível explicação para o aumento de ácido úrico no grupo placebo (YANAI; MARIMOTO, 2004).

Tanto o ácido ascórbico como o ácido úrico varrem as reações de radicais livres, formando radicais intermediários, que podem ser extintos como parte de um efeito antioxidante global. O ácido úrico pode substituir ou complementar algumas das funções do ácido ascórbico em humanos, poupando-o. O que pode ser comprovado no presente estudo pela correlação negativa entre os níveis de vitamina C e ácido úrico na fase S, em que os indivíduos apresentavam menores níveis de outro antioxidante, a vitamina E. Ainda, segundo Sevanian, Davies e Hochstein (1991), o ácido úrico é capaz de inibir uma série de reações oxidativas sem ele mesmo ser consumido. Esta observação desvia do mecanismo clássico de ação antioxidante e é também observada em reações de redução envolvendo metais ativos de redução, tais como ferro. Em tampões e fluídos biológicos a oxidação do ácido ascórbico e peroxidação lipídica foi prevenida pela adição de ácido úrico sem a aparente perda de urato.

Não existe um valor de ácido úrico considerado ideal para exercer sua ação como antioxidante, o que dificulta a interpretação dos seus dados de modo isolado em humanos. Por outro lado fica estabelecido que alterações na produção de radicais livres podem levar a mudanças nos valores de ácido úrico, como mecanismo de resposta. E seu aumento pode ser responsável por efeitos protetores ao estresse oxidativo, como ocorreu na fase C, em que o aumento de ácido úrico, quando os níveis de vitamina C eram menores, conteve a peroxidação lipídica.

O método mais comumente utilizado para indicar dano oxidativo induzido por exercícios aeróbios e não excêntricos tem sido a avaliação da peroxidação lipídica, e as análises mais utilizadas são: dosagem de malonaldeído (MDA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Malonaldeído é um aldeído de 3 carbonos produzido durante a decomposição de um hidroperóxido de lipídeo. Enquanto, TBARS é um método usado para medir os aldeídos (principalmente MDA) formados via decomposição de hidroperóxidos de lipídeos. A maioria dos autores tem notado um aumento de TBARS seguindo uma variedade de exercícios, com valores retomando ao basal dentro de uma hora após o exercício, enquanto nenhuma modificação parece ocorrer quando se mede especificamente MDA. Outro marcador de peroxidação lipídica inclui o hidroperóxido de lipídeo (LOOH), os resultados em relação a este parâmetro têm sido variados, alguns estudos notam aumento e outros

nenhuma mudança após o exercício (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). TBARS, apesar de muitas críticas de medida, é o método mais utilizado como marcador de peroxidação lipídica na literatura (ZOPPI et al., 2006).

Como marcadores de peroxidação lipídica, foram analisados **TBRAS total e TBARS livre**, que não foram diferentes com uso de dieta rica em vitamina C ou suplemento de vitamina C, em relação ao grupo controle. Enquanto **FOX**, outro marcador de peroxidação lipídica, com ação nos hidroperóxidos, foi menor com o uso de dieta rica em ácido ascórbico, ou seja, na fase C os atletas apresentavam maior grau de peroxidação lipídica enquanto com uso de dieta rica em vitamina C os atletas encontravam-se em menor nível de peroxidação lipídica com ação nos peróxidos.

De acordo com um grande número de estudos epidemiológicos, as frutas cítricas protegem contra câncer e doenças cardiovasculares. Os benefícios para saúde têm sido atribuídos a presença de compostos bioativos, como os fenólicos, entre eles os flavonóides e vitamina C, que funcionam como antioxidantes. Em relação aos flavonóides, estudos mostram que após ingestão de suco de laranja eles podem atingir concentrações relativamente elevadas no plasma. Por isso quando utilizamos uma dieta rica em vitamina C através do uso de suco de laranja, a presença de flavonóides é inevitável, acarretando em maior concentração de antioxidantes em relação ao uso de um suplemento de vitamina C. Por isso o uso de deita rica em vitamina C permite tirar vantagem do efeito aditivo e sinérgico dos fenólicos, o que pode ter sido responsável por menores níveis de FOX (GUIMARÃES et al. 2010; VANAMALA et al., 2006).

Em função do exercício físico, na fase C, tanto o TBARS total como o livre, se comportaram de maneira constante, enquanto nas fases D e S, houve diminuição dos níveis após o exercício. Os maiores níveis de vitamina C séricos nestas duas fases foram suficientes para conter a peroxidação lipídica.

Jogadores profissionais de basquete, com idade média de $16,8 \pm 1,06$ anos, que receberam suplemento de vitamina E (150mg/d) e vitamina C (500mg/d) durante 35 dias sucessivos ao treinamento, apresentaram menores níveis de peroxidação lipídica, medida pelo método de TBARS, em relação aos jogadores que receberam placebo. Sendo assim a suplementação causou uma diminuição dos níveis de peroxidação lipídica em reposta a um treino intenso (NAZIROGLU et al., 2010). Após ultra maratona de 50km, houve aumento na peroxidação lipídica, medida

através dos F2-isoprostanos plasmáticos, apenas no grupo não suplementado, o grupo que recebeu suplementação de vitamina C e E foi protegido (SCHNEIDER et al., 2009). Por outro lado, em triatletas, a suplementação de um complexo antioxidante, com selênio, acetato de retinil, ácido ascórbico e alfa-tocoferol, não mostrou nenhuma diferença nos níveis plasmáticos de TBARS em relação ao grupo controle, após dupla maratona; nos dois grupos houve aumento de TBARS após a maratona, independente do tipo de treino que haviam sido expostos 4 semanas antes (PALAZZETTI et al.; 2004).

Em jogadores de futebol o grupo que foi suplementado com vitamina C (1000mg) e E (800mg) por 90 dias, apresentou níveis de TBARS 66% menores que o grupo não suplementado apenas no fim da temporada de treino, enquanto no meio e início do período de treino não houve diferenças entre os grupos, indicando maior intensidade de esforço nesta fase. Porém não houve diferença dentro dos grupos durante o período de treinamento (90 dias). Neste caso, defendem que a suplementação associada de vitamina C e E pode trazer um modesto benefício para jogadores de futebol sob exercício extenuante, mas não tem efeito ergogênico direto sobre o desempenho físico. Neste mesmo estudo, os autores mostram que, apesar de existirem controvérsias, a peroxidação lipídica parece ser um mecanismo fundamental para o dano muscular induzido pelo exercício, já que um grande número de estudos correlaciona os níveis de CK liberados e peroxidação lipídica (DEMENICI et al., 2009; ZOPPI et al., 2006).

Estudo utilizando suplementação de alopurinol em corredores de maratona preveniu o aumento de MDA plasmático induzido pela corrida de maratona (GOMEZ-CABRERA; DOMENECH; VIÑA, 2008). Em outro estudo, ciclistas bem treinados receberam 1000mg de vitamina C por 2 semanas, e com isso a concentração de MDA no plasma permaneceu inalterada após o exercício. De acordo com Peake, Suzuki e Coombes (2007), nem 1000mg de vitamina C por dia durante 1 semana, e nem 400mg por dia durante 3 dias, modificaram as concentrações plasmáticas de MDA, IL-6 e cortisol, após o exercício. Já Thompson et al (2001) reportaram que a suplementação com 400mg de vitamina C por dia por 2 semanas antes do exercício atenuou IL-6 2h após o exercício, mas não modificou as concentrações séricas de proteína C reativa, cortisol e MDA.

A suplementação antioxidante parece ter um efeito favorável contra a peroxidação lipídica em sujeitos altamente treinados ou em sobrecarga, por isso

tem-se sugerido que a recomendação das necessidades de antioxidantes exógenos deve ser aumentada para aqueles com alto gasto de energia (PEAKE, 2003). No presente estudo, a não diferença nos níveis de TBARS total e livre entre a fase controle e as fases com adição de vitamina C a dieta, pode ser devido ao curto tempo de intervenção, 3 dias. Talvez se este período fosse maior pudesse trazer maiores benefícios em relação a estes biomarcadores. Ou ainda pelo fato de que os sujeitos do estudo eram altamente treinados e apresentam-se protegidos das EROs pela melhora do sistema de defesa antioxidante (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

Por outro lado, a intensidade e volume do exercício parecem afetar o grau de peroxidação lipídica. De acordo com Deminice et al (2009) um decréscimo no volume e intensidade do treino, após o período de polimento, resulta em uma diminuição nos marcadores de peroxidação lipídica, tanto TBARS como FOX, em relação ao período de treino intenso, e esta diminuição coincide com um significativo aumento da *performance* em nadadores de nível competitivo. Sendo assim o período de treino parece influenciar nos marcadores de peroxidação lipídica.

Em relação à intensidade do exercício Bloomer et al (2005) reportaram aumento de TBARS, imediatamente após exercício aeróbio, utilizando corrida em esteira, quando o VO_2 max foi entre 75-80%. Enquanto outro estudo, com ciclistas, onde a média de VO_2 max foi 73%, não houve aumento significativo de MDA, da mesma maneira que outras investigações que utilizaram exercício de mesma intensidade não encontraram aumento de MDA (BLOOMER et al., 2005). De acordo com Muñoz et al (2010), teste incremental máximo em cicloergômetro até a exaustão, produz aumento nos níveis de MDA, enquanto em teste submáximo, que não excedeu 80% do VO_{2max} , não houve mudança nos níveis.

Para aumento de MDA parece ser necessário protocolo de exercício aeróbio de intensidade maior que 80% do VO_{2max} (BLOOMER et al., 2005), este aumento do consumo de oxigênio a valores máximos pode explicar significativos aumentos nos níveis de MDA. Além disso, exercício de intensidade máxima pode levar a uma redistribuição do fluxo de sangue, produzindo áreas de isquemia e, após o exercício, reperfusão e aumento dos níveis de MDA, enquanto no exercício de intensidade submáxima não há menor redistribuição de sangue, evitando a produção de maiores níveis de EROs através deste mecanismo (MUÑOZ et al., 2010). Dessa maneira, seria possível que a intensidade e/ou duração do treinamento no presente estudo,

não foram suficientes para produzir um significativo aumento de TBARS após o exercício. Ou então, a atividade do sistema antioxidante dos sujeitos do estudo foi suficiente para não permitir aumento de TBARS, tendo um equilíbrio entre a produção de radicais livres e a resposta antioxidante, nesta determinada intensidade e duração do treino, que seria o aumento de ácido úrico na fase C e o aumento de vitamina C nas fases D e S.

Já o mecanismo requerido para aumento durante exercício anaeróbio não é claro. Muitas investigações têm reportado nenhuma mudança no MDA ou TBARS após exercício anaeróbio isotônico ou exercício excêntrico, enquanto algumas reportam aumento após exercício isométrico e isotônico (BLOOMER et al., 2005). Nadadores que realizaram um treino intervalado de alta intensidade e anaeróbio (confirmado pelas concentrações de lactato sanguíneo) apresentaram aumento de TBARS, após 8 seções de nado em esforço máximo, demonstrando que este tipo de exercício pode promover peroxidação lipídica (DEMINICE et al., 2010). Entretanto, Bloomer et al (2006) não verificaram aumento no estresse oxidativo induzido por seção de seis repetições de 10 segundos em esforço máximo em cicloergômetro. Eles ainda concluem que, em indivíduos bem treinados, seções extenuantes de curta distância não são capazes de aumentar o estresse oxidativo e isso pode ser atribuído ao nível de treinamento dessa população, demonstrando que ainda há controvérsia sobre a modulação do metabolismo oxidativo pelo exercício anaeróbio em atletas.

Outros reportam aumento em hidroperóxidos de lipídeos sem aumento em MDA após exercício, sugerindo que a escolha do biomarcador pode ser importante. É possível que as elevações do MDA devido à produção de EROs são mais dependentes do aumento do consumo de oxigênio ou períodos transitórios de isquemia/reperfusão. Estudos comparando exercício aeróbio e anaeróbio têm reportado resposta similar de peroxidação lipídica ou um aumento mais pronunciado após anaeróbio. Então estes resultados sugerem que exercício anaeróbio pode aumentar mais a peroxidação lipídica que aeróbio, porém os protocolos usados diferem do usado no atual estudo (BLOOMER et al., 2005). Adicionalmente, como os indivíduos do presente estudo são bem treinados, é possível que a falta de aumento de TBARS seja devido a uma maior proteção celular contra oxidação mediada por EROs.

Muitos fatores podem ter contribuído para esta variação, como período de suplementação antes do exercício, biodisponibilidade da vitamina durante o exercício, defesas antioxidantes endógenas relacionadas ao status de treino dos participantes e ainda, diferenças de intensidade e duração nos protocolos de exercício, bem como tipo de exercício. Estudos clínicos têm reportado que 2 semanas de suplementação com 200mg de vitamina C são necessárias para saturar as concentrações plasmáticas de ácido ascórbico. Portanto antioxidantes podem alterar as respostas inflamatórias ao exercício depois de um período mínimo de 2 semanas (PEAKE; SUZUKI; COOMBES, 2007).

Os níveis circulantes de alguns antioxidantes, como a vitamina E e vitamina C também podem ajudar na avaliação do estresse oxidativo. Vitamina E é o maior antioxidante na fase lipídica, uma vez que pode terminar a reação em cadeia da lipoperoxidação por reagir com o radical peroxil, tornando-se o radical vitamina E, o qual é subsequente reduzido pela vitamina C (o maior antioxidante do meio aquoso), que formará por sua vez o radical vitamina C, que então será reduzido pela GSH. Em termos de circulação de antioxidantes, nenhuma mudança tem sido comumente observada, apesar de algumas investigações reportarem um aumento transitório ou diminuição imediatamente após o exercício. Durante condições de estresse oxidativo, como durante o exercício, aumento na circulação de antioxidantes pode resultar de um aumento na liberação dos estoques teciduais, por sua vez poupando a supressão (eliminação) de outros componentes do sistema de defesa antioxidante (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

Após exercício agudo têm sido demonstradas alterações transitórias nas concentrações sanguíneas de **ácido ascórbico**, porém os efeitos do exercício nos seus níveis plasmáticos são controversos. De acordo com Deminice et al (2010), em nadadores, houve aumento da concentração sérica de ácido ascórbico após treino intervalado anaeróbio, esse aumento foi considerado uma modulação do sistema de defesa antioxidante à este tipo de treino.

Geralmente ocorre aumento de ácido ascórbico circulante nas horas seguintes ao exercício e um declínio abaixo dos níveis pré-exercício alguns dias após. Em muitos estudos as concentrações plasmáticas nos dias que seguem o exercício estão abaixo dos valores normais, sugerindo alterações na demanda antioxidante dos tecidos nos dias após o exercício (PEAKE, 2003). No presente estudo, observaram-se valores 24 horas após o exercício menores que logo após o

mesmo nas fases com adição de vitamina C a dieta, porém esses valores não estavam abaixo dos valores normais, mostrando que a demanda antioxidante dos tecidos não estavam aumentadas a ponto de diminuir tanto os valores séricos de vitamina C. Já na fase C, na qual não foi feita intervenção, os níveis de ácido ascórbico não variaram, o que pode ter sido consequência do grande aumento de ácido úrico, poupando o uso de vitamina C, como descrito anteriormente.

Segundo Rousseau et al (2004) atletas possuem maior concentração plasmática de ácido ascórbico, que é diretamente induzida por maior consumo de vitamina C. No presente estudo o uso de adição de vitamina C à dieta, favoreceu maiores níveis séricos, em relação ao grupo controle. Antes do exercício, quanto maior o consumo de vitamina C maior seus níveis plasmáticos, os quais puderam conter a peroxidação lipídica nas fases D e S e evitar o dano tecidual e hepático. Em estudos com ultramaratonistas o consumo de 500mg e 1000mg de vitamina C uma semana antes da ultra maratona, causaram aumento da concentração plasmática de ácido ascórbico antes da corrida. Este aumento de ácido ascórbico antes do exercício foi responsável pela atenuação do cortisol sérico após a atividade, sugerindo que durante o exercício o ácido ascórbico é utilizado para conter o estresse oxidativo, enquanto o cortisol é liberado para conter as reações inflamatórias resultantes do dano muscular causado pelo exercício (PEAKE, 2003).

Ainda, de acordo com Tauler et al (2003), atletas suplementados com vitamina C têm níveis plasmáticos de ácido ascórbico 1,3 vezes maiores que atletas não suplementados e maiores que os valores de referência para indivíduos adultos saudáveis. Porém o excesso de vitamina C ingerida é eliminado rapidamente devido à solubilidade em água e existência de um mecanismo homeostático que regula os níveis de ácido ascórbico no plasma. Eles descrevem que os efeitos do exercício no ácido ascórbico plasmático dependem dos níveis anteriores ao exercício. Observaram diminuição dos níveis após 1 hora de recuperação nos atletas com altos níveis iniciais, que foram os suplementados com vitamina C, e esta diminuição após a recuperação pode sugerir que o estresse oxidativo induzido pelo exercício ocorreu principalmente logo após a atividade. Altos níveis plasmáticos podem produzir uma mobilização rápida e mais efetiva do ácido ascórbico contra os efeitos do estresse oxidativo (TAULER et al., 2003).

Segundo Peake (2003), o consumo dietético regular e a resposta à suplementação entre atletas e não atletas sugerem que o exercício regular não

aumenta o requerimento de vitamina C em atletas. O predominante consenso de um grande número de pesquisas bem conduzidas é que a vitamina C não tem efeito ergogênico em pessoas que não apresentam deficiência dela (EVANS, 2000), ou seja, que consomem uma dieta com quantidades adequadas deste nutriente. Mas exercício vigoroso e prolongado tem mostrado aumento da necessidade de vitamina C, sendo que, o desempenho pode ser prejudicado quanto suas quantidades são baixas e deficientes. Assim atletas que participam habitualmente de exercício prolongado e vigoroso deveriam consumir entre 100 a 1000mg de vitamina C diariamente (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, DIETITIANS OF CANADA, AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2009).

O conteúdo de vitamina C nos suplementos, o consumo dietético e a concentração de ácido ascórbico no plasma antes da suplementação parecem ser importantes determinantes da resposta a suplementação. Muitos autores indicam que mesmo a suplementação de vitamina C a curto prazo pode aumentar significativamente a concentração plasmática dessa vitamina, e este aumento pode ser de 40-50%. Lembrando que atletas com baixos níveis de ácido ascórbico circulante têm uma melhor resposta a suplementação. Porém, tem-se sugerido que este aumento inicial pode ser transitório, e diminui com a suplementação prolongada (NAZIROGLU et al., 2010). No presente estudo, em relação à fase C, na qual apenas 1 indivíduo apresentou valores baixos de vitamina C, a fase D apresentou aumento 23,31% de ácido ascórbico basal (AE) e um aumento significativo de 28,37% logo após o exercício, e com o uso de suplemento de vitamina C esse aumento foi de 36,84% antes do exercício e também houve aumento, porém não significativo, de 16,22% após o exercício.

Além do ácido ascórbico ser um efetivo antioxidante e inibir a propagação das reações em cadeia da peroxidação lipídica nas membranas das células, ele ajuda a regenerar a vitamina E do radical tocoferol (CHEVION et al., 2003). O consumo alimentar de **vitamina E**, no presente estudo, foi deficiente em todos os atletas. Porém, os valores de vitamina E sérica só foram inadequados para a maioria dos atletas na fase em que receberam suplementação de vitamina C. Mas o aumento de vitamina C no sangue, antes do exercício, foi capaz de recuperar seus níveis, confirmado pela correlação positiva entre os valores séricos de vitamina C e vitamina E 24 horas após o exercício na fase S. Desta maneira, na fase S, a vitamina C foi

usada para regenerar a vitamina E, como visto pela diminuição de ácido ascórbico no plasma e aumento de alfa tocoferol, ao longo das etapas.

Tem sido mostrado que concentrações plasmáticas de vitamina C e E tendem a aumentar com o exercício. Este aumento de antioxidantes no plasma pode aumentar as defesas no sangue, mas pode possivelmente prejudicar as defesas dos lugares onde foram mobilizados (COOPER et al., 2002). Ainda alguns estudos reportam nenhuma variação nos níveis plasmáticos de vitamina E após diferentes exercícios e outras investigações reportam diminuição das concentrações de vitamina E no plasma e tecidos após exercício máximo, que tem sido atribuída à geração de radicais livres e peroxidação lipídica (TAULER et al., 2003).

Em estudo com jogadores de basquete, a suplementação de vitamina C e E permitiu maiores concentrações séricas de ácido ascórbico e alfa tocoferol e com isso menores níveis de peroxidação lipídica, devido à inibição de EROs (NAZIROGLU et al., 2010). Em ciclistas, o treino incremental até a exaustão aumentou os níveis séricos de vitamina C e não modificou os níveis de vitamina E, enquanto sob treino submáximo não houve alteração em nenhuma destas vitaminas antioxidantes. O aumento da vitamina C pode ser devido a uma maior atividade da glândula supra-renal, onde há reserva de vitamina C, que pode ter sido positivamente correlacionada com concentrações plasmáticas de cortisol e norepinefrina após exercício, indicando uma estimulação desta glândula em situações de estresse. A não modificação dos níveis de vitamina E sugere que a resposta antioxidante da vitamina C foi capaz de neutralizar a produção de EROs em certa intensidade e duração de exercício e o possível dano oxidativo causado pelo exercício. Em relação à vitamina E parece que apenas é mobilizada de estoques teciduais quando outro sistema antioxidante não é capaz de neutralizar as EROs (MUÑOZ et al., 2010).

Com atletas de rúgbi houve uma depleção de vitamina E em resposta a período de treino intenso e período competitivo, esta depleção não pôde ser atribuída a mudanças nutricionais uma vez que o consumo de vitamina E foi inalterável (FINAUD et al., 2006). No presente estudo também não houve variação de consumo de vitamina E entre as fases, porém apesar de nas fases C e D não haver variação dos níveis séricos de vitamina E, na fase S, que começou o exercício com valores abaixo do normal, teve aumento 24 horas após, no mesmo momento em que os níveis de vitamina C diminuíram. Concordando com o descrito acima, de

que a vitamina E só é utilizada quando outro sistema antioxidante não é capaz de neutralizar as EROs, independente do consumo alimentar.

De acordo com Finaud et al (2006) a diminuição de alguns antioxidantes pode ser compensada pelo aumento de outros hidrossolúveis como ocorreu com o ácido úrico, em atletas de rúgbi e no presente estudo. Tauler et al (2003) observaram em atletas concentrações de vitamina E dentro dos limites normais, porém não houve aumento dos níveis plasmáticos com o exercício e nem com suplementação de vitamina C, o que pode sugerir uma diferente mobilização de vitamina E de acordo com a intensidade do exercício.

A deficiência de vitamina E aumenta a susceptibilidade do dano celular induzido pelo radical livre e leva a exaustão prematura (FINAUD et al., 2006). Um estudo sugere que suplementação de vitamina E reduz o estresse oxidativo e taxas de peroxidação lipídica e que as necessidades de vitamina E podem ser maiores com o exercício. Esta suplementação levou a redução dos níveis de peroxidação lipídica e da AST (EVANS, 2000).

Em relação à **glutathiona reduzida** (GSH), maior antioxidante não enzimático endógeno, a medida de mudança na sua redução tem sido rotineiramente utilizada como representação do estresse oxidativo induzido pelo exercício. Tem sido reportada uma diminuição da glutathiona após exercício aeróbio não excêntrico e retorno aos valores basais dentro de 15 a 30 minutos de recuperação (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). Diferente deste achado, um treino de natação intervalado e anaeróbio promoveu aumento nas concentrações de GSH após a seção de treino, evidenciando uma ação moduladora do sistema antioxidante ao tipo específico de treino utilizado (DEMINICE et al., 2010).

Ainda parece que as concentrações de GSH podem ser influenciados pelo consumo de aminoácidos, que são essenciais para a sua síntese (GOUGOURA et al, 2007). Porém no presente estudo não houve diferença de consumo de proteína entre as fases e na fase em que os nadadores receberam suplemento de vitamina C tiveram maiores níveis de GSH no sangue, ou seja, a suplementação permitiu que os atletas tivessem uma maior capacidade antioxidante.

Por outro lado, como não houve variação dos níveis de GSH em decorrência da atividade física em nenhuma das fases, podemos dizer que em nenhuma fase houve aumento da oxidação de GSH após o exercício. Porém com a adição de suplemento de vitamina C os atletas apresentam maiores teores do antioxidante

GSH, facilitando assim o combate a radicais livres, ou seja, os atletas apresentaram maior poder antioxidante com uso de suplemento de vitamina C. Em estudo com nadadores de idade média $10,1 \pm 1,6$ anos, que não estavam recebendo suplemento alimentar, observou que crianças que treinam apresentam aumento de estresse oxidativo, devido maiores níveis de TBARS, e menor capacidade antioxidante, de acordo com menores valores de GSH, em relação a crianças sedentárias. Sugerindo que crianças podem ser mais susceptíveis ao estresse oxidativo induzido por exercício crônico. Alguns estudos dizem que crianças usam menos metabolismo anaeróbico que adultos, e por isso teriam um maior fluxo de oxigênio para músculos em trabalho, a consequência disso seria maior estresse oxidativo induzido pelo exercício (GOUGOURA et al, 2007).

Quando ocorre diminuição da GSH há evidências de que o sistema biológico esta experimentando um desafio por radicais livres (JENKINS, 2000). A redução da GSH pode ser explicada pelo consumo em regenerar ácido ascórbico e alfa tocoferol ou por varrer certas EROs (BLOOMER et al., 2005). Ou seja, a menor oxidação de GSH, pode nos mostrar uma redução da magnitude do aumento de EO. Em estudo com triatletas, mesmo sem variação de peroxidação lipídica e sem aumento de dano muscular, com a redução do volume de treinamento após 4 semanas de treino em sobrecarga, houve maiores valores de GSH no sangue, sugerindo redução da magnitude do estresse oxidativo (MARGARITIS et al., 2003).

De acordo com Palazzetti et al (2004) a suplementação de um complexo antioxidante, que continha selênio, acetato de retinil, ácido ascórbico e alfa tocoferol, aumentou os níveis de GSH, que permaneceram elevados após 4 semanas de treino em sobrecarga. Em jogadores de basquete o uso de suplemento de vitamina C e E contribuíram para aumento das concentrações séricas de GSH após um período de 35 dias de suplementação e exercício máximo, enquanto o grupo placebo apresentou redução dos níveis. O aumento nos valores de GSH tem sido atribuído a inibição de radicais livres e peroxidação lipídica (NAZIROGLU et al., 2010). Em outro estudo o teste de Wingate induziu a uma diminuição dos níveis de GSH, ao mesmo tempo em que houve aumento das concentrações plasmáticas de ácido úrico e vitamina C e diminuição de vitamina A e E. Portanto neste caso, sem uso de suplemento antioxidante, o GSH pode ter sido usado na regeneração de vitamina C e vitamina E (FINAUD; LAC; FILARE, 2006).

De maneira similar a peroxidação lipídica, a oxidação da glutathione parece ser mais dependente da utilização de glicogênio. Bloomer et al (2005) encontraram valores de glutathione oxidada (GSSG) maiores após ciclismo, e nenhuma modificação após agachamento. Já Inal et al (2001) compararam cargas de 800 metros e 100 metros da natação em nadadores treinados, com idades entre 15 e 21 anos, e notou uma mudança similar após as duas intensidades de exercício, com diminuição de GSH durante os primeiros minutos após o exercício e aumento após 20 e 40 minutos. Entretanto a carga de exercício anaeróbio usada é diferente do protocolo de agachamento, tornando difícil a comparação entre estas investigações (INAL et al., 2001). No presente estudo, já que os atletas encontravam-se no mesmo período de treinamento e passaram pelo mesmo tipo de treino nos dias das coletas, as diferenças de GSH não podem ser atribuídas ao exercício físico.

Nos estudos sobre estresse oxidativo e exercício, os suplementos mais utilizados tem sido vitamina C, vitamina E e beta-caroteno, sozinhos ou em combinação por uma variedade de durações, administrados cronicamente (1-8 semanas antes do exercício) ou agudamente (1-2 dias antes do exercício). Vitamina E parece ser o mais importante e efetivo antioxidante na fase lipídica da célula, que contribui para a estabilidade e fluidez da membrana para prevenir a peroxidação lipídica, enquanto a vitamina C tem igual importância de prevenir a peroxidação lipídica no plasma e fluídos intersticiais. Além disso, vitamina C e E trabalham em conjunto durante condições de estresse oxidativo, uma vez que a vitamina C é utilizada para regenerar a vitamina E após reação com EROs, como já dito anteriormente. Muitos estudos têm notado uma atenuação do estresse oxidativo seguindo administração de uma variedade de suplementos antioxidantes, contudo a atenuação não tem ocorrido para todos os biomarcadores, mostrando que de maneira similar a suplementação crônica, nenhum tratamento antioxidante elimina completamente o estresse oxidativo. E ainda poucos estudos têm reportado nenhum efeito da suplementação. A suplementação aguda antes ou durante o exercício aeróbio não excêntrico, embora não comumente investigada, tem resultado em achados mais consistentes que a suplementação crônica. Isto é evidente pela atenuação em vários biomarcadores de estresse oxidativo seguindo o tratamento, em todos os estudos sem exceção (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

Levando em consideração todos os estudos supracitados, pode-se dizer que a atividade física é uma conhecida forma de produção de radicais livres, porém o

exercício crônico aumenta a eficiência do sistema de defesa antioxidante e por isso pode reduzir o estresse oxidativo gerado pelo mesmo (GOUGOURA et al, 2007). Contudo, períodos de treino intenso ou sobrecarga podem causar efeitos opostos por causa da intensa oxidação de antioxidantes para inibir as ações prejudiciais das EROs (FINAUD; LAC; FILARE, 2006; FINAUD et al., 2006), e isto pode trazer o aumento do requerimento de antioxidantes com aumento do gasto de energia (PALAZZETTI et al.; 2004). Tem sido reportado que a suplementação com vitaminas e minerais antioxidantes pode oferecer proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício em algumas, mas não em todas as investigações (BLOOMER et al., 2005), contudo dosagens precisas e duração do tratamento precisam ser determinadas (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

No contexto da homeostase os radicais livres devem ser vistos como benéficos, já que agem como sinal para melhorar as defesas antioxidantes. A consequência prática da administração de antioxidantes impede as adaptações, assim a recomendação de suplementos antes do exercício moderado deve ser revisada já que pode impedir adaptações benéficas induzidas pelo exercício (GOMEZ-CABRERA; DOMENECH; VIÑA, 2008). Porém, atualmente não é claro se a produção de EROs induzidas pelo exercício e subsequente dano oxidativo representam um estímulo necessário ou prejudicial à função fisiológica que deve ser utilizado ou minimizado, respectivamente. Pode ser que um nível ótimo, atualmente indefinido, de produção de EROs e dano oxidativo seja necessário para adaptações nas defesas antioxidantes e outros parâmetros fisiológicos que levam a melhora da própria saúde. Se assim for, pode oferecer critérios sobre a relação entre atividade física regular, diminuição do risco de doenças, e aumento da expectativa de vida. No entanto, excessiva produção de EROs e dano oxidativo através exercício crônico de longa duração e/ou super treinamento pode exceder o referido ideal, talvez levando a um dano oxidativo irreparável, potencialmente resultando desenvolvimento ou progressão de doenças. Se este for o caso, este achado pode fornecer critérios sobre a relação entre exercício excessivo, aumento do risco de doenças e diminuição da expectativa de vida. Claramente, mais pesquisas são necessárias nesta área a fim de gerar respostas firmes relacionadas a estas questões (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

Alguns estudos descrevem desvantagens da suplementação de vitamina C, como retardo do processo de recuperação, diminuição da melhora do VO_2max e

menor capacidade de corrida em ratos (GOMEZ-CABRERA; DOMENECH; VIÑA, 2008). Outros mostram que a associação de vários antioxidantes tem melhor efeito que a suplementação de um único antioxidante. Na grande maioria dos estudos a suplementação não melhora performance ou capacidade de exercício, por outro lado oferece proteção contra as consequências negativas dos radicais livres na saúde, causadas pelo exercício. Assim, ajuda os atletas a manter uma saúde adequada, a qual é a chave para obter melhor performance. Por outro lado, grandes quantidades de antioxidantes podem trazer efeitos negativos (FINAUD; LAC; FILARE, 2006). Ainda deve-se frisar que como existe um baixo consumo de antioxidantes pelos atletas, que consomem produtos alimentares com baixa densidade de nutrientes, a suplementação antioxidante pode ser apropriada (FINAUD; LAC; FILARE, 2006; MARGARITIS et al., 2003)

Então quando a atividade física é vigorosa e causa estresse oxidativo e dano muscular, os suplementos antioxidantes devem ser utilizados, assim como antes de competições, quando o exercício é exaustivo e resulta na geração de EROs que derrubam os mecanismos de defesa (FINAUD; LAC; FILARE, 2006; GOMEZ-CABRERA; DOMENECH; VIÑA, 2008). Por isso atletas devem considerar o consumo de suplementos antioxidantes completos como um componente de seu treino e plano alimentar, no esforço de atenuar algum aumento potencial de estresse oxidativo (BLOOMER et al., 2005). Mas o uso de suplementos deve ser extremamente controlado por composição, duração e dose para ser eficiente para saúde e performance de atletas (FINAUD; LAC; FILARE, 2006). Lembrando ainda que atletas com baixo consumo de antioxidantes são mais beneficiados por suplementos (PEAKE; SUZUKI; COOMBES, 2007).

As divergências entre os estudos sobre estresse oxidativo, são provavelmente, devido às diferenças metodológicas, tipo, intensidade e duração do exercício (GOUGOURA et al, 2007), nível de aptidão dos sujeitos, alimentação (CHEVION et al., 2003), idade e gênero (COOPER et al., 2002). Em adição, a escolha do biomarcador, o tipo de amostra, a quantidade e duração do tratamento antioxidante (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). O número de indivíduos na amostra também pode influenciar nos resultados, uma vez que amostras pequenas podem não reproduzir de maneira eficiente o status antioxidante plasmático em reposta ao consumo alimentar, devido à extensão ou fonte de variabilidade individual (MARGARITIS et al., 2003). Além de tudo, os estudos sobre EO induzido pelo

exercício tem tipicamente sido feito em animais devido aos procedimentos invasivos que são requeridos. O desenvolvimento de técnicas melhores, não invasivas, ou minimamente invasivas é necessário para permitir a expansão das pesquisas na população humana (JENKINS, 2000). Portanto é recomendado que futuras investigações empreguem protocolos de exercício suficientes, utilizem uma completa avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo e façam múltiplas amostras após o exercício (horas e dias após) na tentativa de oferecer achados válidos e significativos (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

No presente estudo a amostra foi composta por homens e mulheres uma vez que trabalhos mostram que tanto homens como mulheres possuem resposta similar de estresse oxidativo induzido pelo exercício (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION; DIETITIANS OF CANADA; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2009). O estrogênio parece envolvido na super-regulação da longevidade associada aos genes e tem propriedades antioxidantes *in vitro*, por isso poderia oferecer proteção contra a produção de EROs. Portanto, tem-se sugerido que mulheres são mais protegidas do ataque oxidante e sofrem um menor estresse oxidativo com o exercício comparado aos homens. Contudo, tanto estudos com animais e humanos têm falhado em suportar esta teoria (BLOOMER, 2008). Por exemplo, uma carga aguda de exercício executada por ratos machos e fêmeas resultou em significante, porém igual, estresse oxidativo em ambos os gêneros, indicado pelo status de glutathione tecidual. Ginsburg et al (2001) descreveram que mulheres são mais susceptíveis a peroxidação lipídica que homens após uma competição de triatlon *Ironman* e Kaikkonen et al (2002) demonstraram nenhuma diferença de gêneros no estresse oxidativo induzido pelo exercício em resposta a 42km de corrida. Um recente trabalho indica que embora mulheres tenham maiores concentrações séricas de glutathione e vitamina E comparado aos homens, a oxidação de proteína, lipídeo e glutathione aumenta de maneira similar em homens e mulheres após exercício. Também parece não haver diferença em repouso e nos biomarcadores de estresse oxidativo após exercício entre mulheres durante as fases folicular e luteal do ciclo menstrual, apesar das diferenças estrogênicas. Portanto, baseado nas evidências disponíveis, parece que não existe diferenças entre os gêneros em relação ao estresse oxidativo induzido pelo exercício. Apesar disso, devido a possibilidade que o estrogênio pode oferecer na proteção antioxidante *in vivo*, muitos estudos têm escolhido usar exclusivamente homens na amostra.

A avaliação da influência de vitamina e minerais antioxidantes sobre o estresse oxidativo na atividade física, tem o intuito de minimizar os efeitos prejudiciais do excesso de EROs e melhorar a capacidade antioxidante dos atletas pela adequação do seu estado nutricional (ZANELLA; SOUZA; GODOY, 2007).

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

O uso de dieta rica em vitamina C favoreceu uma menor peroxidação lipídica em nadadores de alto rendimento e diminuição da peroxidação lipídica após exercício. Enquanto o uso de suplemento de vitamina C, que também conteve a peroxidação lipídica após exercício, aumentou o poder antioxidante nos mesmos nadadores. Sem uso de nenhuma adição de vitamina C houve um maior dano hepático e tecidual, menores níveis de antioxidantes (vitamina C e GSH) e o aumento de um antioxidante, o ácido úrico, que aumenta em situações onde há grande quantidade de radicais livres presentes, e que protegeu os atletas da peroxidação lipídica, quando possuíam menor poder de outros antioxidantes. As mudanças observadas com a adição de vitamina C à dieta de nadadores de alto rendimento sugere um importante papel do ácido ascórbico plasmático e da suplementação alimentar na defesa contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício. Porém parece que as necessidades nutricionais de antioxidantes são maiores apenas em períodos de treino intenso.

A prática de atividades esportivas pode proporcionar benefícios à composição corporal, à saúde e à qualidade de vida. No entanto, o esporte competitivo nem sempre representa sinônimo de equilíbrio no organismo. As alterações fisiológicas e os desgastes nutricionais gerados pelo esforço físico podem conduzir o atleta ao limiar entre a saúde e a doença, se não houver a compensação adequada desses eventos.

Por isso o consumo de dietas desbalanceadas e com baixa densidade nutricional, a falta de orientação nutricional adequada e adoção de comportamentos alimentares inadequados, que tornam os atletas vulneráveis a deficiências nutricionais, sugere a urgente necessidade de **educação nutricional**. Tanto o consumo adequado de antioxidantes através da alimentação como pelo uso correto de suplementos alimentares pode trazer benefícios. Porém é melhor evitar uma ingestão desnecessária de suplementos alimentares, que muitas vezes possuem substâncias ilícitas, quando é possível de atingir as recomendações pela alimentação, que permite tirar vantagem do efeito aditivo e sinérgico de outros antioxidantes, mantendo o desempenho ideal e melhorando a saúde.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGUILÓ, A. et al. Antioxidant diet supplementation enhances aerobic performance in amateur sportsmen. **Journal of Sports Sciences**, v. 25, n. 11, p. 1203-1210, set. 2007.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, DIETITIANS OF CANADA, AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Position of American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance. **Journal of the American Dietetic Association**, v.109, n.3, p. 509-527, mar. 2009.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. American Dietetic Association Standards of Practice and Standards of Professional for Registered Dietitians (Generalist, Specialty, Advanced) in Sports Dietetics. **Journal of the American Dietetic Association**, v.109, n.3, p. 544-552, mar. 2009.

ANTUNES NETO, J. M. F. et al. Níveis Comparativos de Estresse Oxidativo em Camundongos em Duas Situações do Limite Orgânico: *Overreaching* Induzido por Treinamento de Natação e Câncer. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 6, nov./dez. 2008.

BARROS NETO, T. L. A Controvérsia dos Agentes Ergogênicos: Estamos Subestimando os Efeitos Naturais da Atividade Física? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 45, n. 2, mar./abr. 2001.

BESSEY, O. A. Ascorbic acid microchemical methods. In: **Vitamin Methods**. New York: Academic Press, 1960. v. 1, p. 303.

BLOOMER, R. J. Effect of exercise on oxidative stress biomarkers. **Advances in Clinical Chemistry**, v.46, p.1-50, 2008.

BLOOMER, R. J. et al. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 19, n. 2, p. 276-285, 2005.

BLOOMER, R. J.; GOLDFARB, A. H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 29, n. 3, p. 245-263, 2004.

BLOOMER, R. J.; GOLDFARB, A. H.; MCKENZIE, M. J. Oxidative Stress Response to Aerobic Exercise: Comparison of Antioxidant Supplements. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 38, n. 6, p. 1098-1105, 2006.

BLOOMER, R. J. et al. Oxidative stress response in trained men following repeated squats or sprints. **Medicine Science Sports Exercise**, v. 38, n. 8, p. 1432-1442, ago. 2006.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.

CHEVION, S. et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n. 9, p. 5119-5123, April, 2003.

CIGHETTI, G. et al. Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by gas chromatography mass spectrometry: What is needed for an accurate detection. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 266, n. 2, p 222-229, 1999.

COOPER, C.E. et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, n. 2, p. 280-285, 2002.

CUPPARI, L. (Coord); SCHOR, N. (Ed). **Guia de Nutrição: nutrição clínica do adulto**. 2. ed., Barueri, SP, Manole, 2005.

DA SILVA, A. S. R. et al. Comportamento das concentrações séricas e urinárias de creatinina e uréia ao longo de uma periodização desenvolvida em futebolistas profissionais: relações com a taxa de filtração glomerular. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niterói, v. 12, n. 6, nov./dez. 2006.

DEMENICE, R et al. Oxidative stress biomarkers response to high intensity interval training and relation to performance in competitive swimmers. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 50, n. 3, p.356-362, set. 2010.

DEMENICE, R, et al. Evolução de Biomarcadores de Estresse Oxidativo e Relação com a Performance Competitiva em Dois Momentos da Temporada de Treinamento de Natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 4, jul./ago. 2009.

DILLARD, C. J. et al. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. **Journal of Applied Physiology**, v. 45, n. 6, p. 927-932, 1978.

DUARTE, T. L; LUNEC, J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. **Free Radical Research**, v.39, n. 7, p. 671-686, jul. 2005.

EVANS, W. J. Vitamin E, vitamin C, and exercise. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 647-652, 2000.

FINAUD, J. et al. Antioxidant status and oxidative stress in professional rugby players: evolution throughout a season. **International Journal Sports Medicine**, v. 27, p. 87-93, 2006.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative Stress - Relationship with Exercise and Training. **Sports Medicine**, v.36, n.4, p. 327-358, 2006.

FISHER-WELLMAN, K; BLOOMER, R. J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. **Dynamic Medicine**, v.8, n.1, 2009.

GOMEZ-CABRERA, M.; DOMENECH, E.; VIÑA, J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 126-131, 2008.

GOUGOURA, S. et al. Increased oxidative stress indices in the blood of child swimmers. **European Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 2, mai. 2007.

GUIMARÃES, R. et al. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and Orange. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 99-106, 2010.

INAL, M. et al. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 33, n. 4, p. 564-567, 2001.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids**. Washington, National Academy Press, 2002.

JENKINS, R. R. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 670-674, 2000.

JORDÃO, A. A. et al. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 3, p. 459-464, 2004.

KABASAKALIS, A. et al. Imbalanced nutrition of top-level swimmers. **International Journal Sports Medicine**, v. 28, n. 9, p. 780-786, 2007.

LEÃO, L.S.C.S.; GOMES, M.C.R. **Manual de Nutrição Clínica: Para atendimento Ambulatorial do Adulto**. 7. ed. Petrópolis,RJ: Vozes, 2007.

MARGARITIS, I. et al. Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, p. 147-156, 2003.

MARGARITIS, I.; ROUSSEAU, A. S. Does physical exercise modify antioxidant requirements? **Nutrition Research Reviews**, v. 21, p. 3-12, 2008.

MOUGIOS, V. Reference intervals for serum creatine kinase in athletes. **British Journal of Sports Medicine**, v. 41, p. 674-678, mai. 2007.

MUÑOZ, D. et al. Effect of different exercise intensities on oxidative stress markers and antioxidant response in trained cyclists. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 50, 2010.

NAZIROGLU, M. et al. Oral vitamin C and E combination modulates blood lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in maximal exercising basketball players. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, p. 300-305, 2010.

NEVES, P. A (Coord). **Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NIESS, A. M.; SIMON, P. Response and adaptation of skeletal muscle to exercise – the role of reactive oxygen species. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 4826-4836, set. 2007.

NÚCELO DE ESTUDOS EM PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO (NEPA) – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. Versão II. Campinas: UNICAMP, 2006. 150 p.

PADOVANI, R. M. et al. Dietary reference intakes: Aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 741-760, 2006.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de Bioestatística**. Tradução de Luiz Sérgio de Castro Paiva. São Paulo: Thomson, 2004.

PALAZZETTI, S. et al. Antioxidant supplementation preserves antioxidant response in physical training and low antioxidant intake. **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 91-100, 2004.

PANZA, V. P. et al. Consumo alimentar de atletas: reflexões sobre recomendações nutricionais, hábitos alimentares e métodos para avaliação do gasto e consumo energéticos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 6, p. 681-692, nov./dez. 2007.

PASCHOAL, V. C.; AMANCIO, O. M. Nutritional status of Brazilian elite swimmers. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 81-94, fev. 2004.

PEAKE, J. M. Vitamin C: Effects of Exercise and Requirements with Training. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 13, p. 125-151, 2003.

PEAKE, J. M.; SUZUKI, K.; COOMBES, J. S. The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and the relationship to stress oxidative after exercise. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 357-371, 2007.

ROUSSEAU, A. S. et al. Antioxidant vitamin status in high exposure to oxidative stress in competitive athletes. **British Journal of Nutrition**, v. 92, p. 461-468, 2004.

SCHALL, R. Estimation in Generalized Linear Models with Random Effects. **Biometrika**, v. 78, n. 4, p. 719-727, 1991.

SCHNEIDER, C. D. et al. Efeito do Exercício de Ultrarresistência Sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 2, mar./abr. 2009.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, n.4, jul./ago. 2004.

SEDLAK, J; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SEVANIAN, A.; DAVIES, K. J. A.; HOCHSTEIN, P. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 1129S-1134S, 1991.

SHING, C. M. et al. The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 32, p. 677-685, 2007.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **Journal of Nutrition**, v.135, n.5, p. 969-972, 2005.

SÖDERGREN, E. et al. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 37, n. 3, p.137-146, 1998.

SOUZA, C. F.; FERNANDES, L.C.; CYRINO, E.S. Produção de espécies reativas de oxigênio durante o exercício aeróbio e anaeróbio. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v. 8, n. 2, p. 102-109, 2006.

TAULER, P. et al. Influence of vitamin C diet supplementation on endogenous antioxidant defenses during exhaustive exercise. **European Journal of Physiology**, v. 446, p.658-664, 2003.

THOMPSON, D. et al. Prolonged vitamin C supplementation and recovery from demanding exercise. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 11, p. 466-481, 2001.

VANAMALA, J. et al. Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p.157-166, 2006.

VANNUCCHI, H. et al. Papel dos Nutrientes na Peroxidação Lipídica e no Sistema de Defesa Antioxidante. **Revista Medicina**, Ribeirão Preto, v.31, p. 31-44, jan./mar. 1998.

VOLLAARD, N. B.; SHEARMAN, J. P.; COOPER, C. E. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. **Sports Medicine**, n. 35, v. 12, p. 1045-1062, 2005

YANAI, H; MARIMOTO, M. Effect of ascorbate on serum lipids and urate metabolism during exhaustive training. **Clinical Science**, v. 106, p. 107-109, 2004.

YOUNG, D.S. Implementation of SI Units for Clinical Laboratory Data: Style Specifications and Conversion Tables. **Annals of Internal Medicine**, v. 106, n. 1, p.114-129, 1987.

ZANELLA, A. M.; SOUZA, D. R. S.; GODOY, M. F. Influência do exercício físico no perfil lipídico e estresse oxidativo. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 12, n. 2, p. 107-112, abr./jun. 2007.

ZOPPI, C. C. et al. Vitamin C and E supplementation effects in professional soccer players under regular training. **Journal of International Society of Sports Nutrition**, v. 3, p. 37-44, 2006.

ANEXO A – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 25 de junho de 2008

Ofício nº 2252/2008
CEP/SPC

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO NO ESTRESSE OXIDATIVO EM NADADORES DE ELITE”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 268ª Reunião Ordinária realizada em 23/06/2008 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 4105/2008.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
PROF. DR. ALCEU AFONSO JORDÃO JÚNIOR
MONIKE RIBEIRO GÁRLIPP
Depto. de Clínica Médica