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

MONIKE GARLIPP PICCHI

**Efeitos do ácido ascórbico nos biomarcadores de
estresse oxidativo induzido por exercício físico
exaustivo**

Ribeirão Preto
2015

MONIKE GARLIPP PICCHI

**Efeitos do ácido ascórbico nos biomarcadores de
estresse oxidativo induzido por exercício físico
exaustivo**

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

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior

Ribeirão Preto
2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Garlipp-Picchi, Monike

Efeitos do ácido ascórbico nos biomarcadores de estresse oxidativo induzido por exercício físico exaustivo.

Ribeirão Preto, 2015.

97 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Jordão Jr, Alceu Afonso.

1. Espécies reativas de oxigênio. 2. Vitamina C. 3. Exercício exaustivo. 4. Antioxidantes 5. Suplementação

FOLHA DE APROVAÇÃO

GARLIPP-PICCHI, Monike

Efeitos do ácido ascórbico nos biomarcadores de estresse oxidativo induzido por exercício físico exaustivo.

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

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior

Instituição: FMRP/USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Mais uma vez dedico um trabalho acadêmico, agora minha tese de doutorado, ao meu marido Luiz Claudio, que sempre me incentivou, me apoiou e me ajudou. Porém agora acompanho a dedicatória as minhas filhas, Isabela e Julia, que muito sentiram todo o meu empenho para finalização deste trabalho. Obrigada pela compreensão, carinho, ajuda e muita torcida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior pela amizade, apoio e compreensão, e por ter me conduzido desde a iniciação científica até o doutorado. As técnicas de laboratório e amigas Paula Payão e Livia pelo auxílio na realização das dosagens.

Ao professor Vilmar Baldissera, que permitiu que eu fizesse toda minha coleta de dados no Laboratório de Fisiologia do Exercício – UFSCar, utilizando toda estrutura e equipamentos. Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia do Exercício, em especial ao Nuno, que me ajudou na aplicação dos protocolos de exercício, e sempre esteve pronto a me ajudar em todas as minhas dúvidas. Também ao Danilo que fez as análises de lactacidemia, e ao Markus.

Ao laboratório Médico Dr. Maricondi, pela realização de algumas das análises bioquímicas e por me emprestarem uma enfermeira tão competente para a coleta do material biológico, Angélica, obrigada por toda colaboração.

A professora Heloisa S. S. de Araújo, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, que autorizou o uso da centrífuga.

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

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado durante a realização deste projeto.

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

RESUMO

GARLIPP-PICCHI, M. Efeitos do ácido ascórbico nos biomarcadores de estresse oxidativo induzido por exercício físico exaustivo. 2015. 97 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de vitamina C nos biomarcadores de estresse oxidativo induzido por exercício físico exaustivo. A amostra foi composta por 13 indivíduos do sexo masculino, fisicamente ativos, com idades entre 18 e 33 anos, IMC médio $23,65 \pm 3,5$ kg/m² e VO_{2max} de $50,94 \pm 5,2$ ml.kg⁻¹.min⁻¹. Estes indivíduos foram submetidos a um protocolo de exercício exaustivo (40 minutos de corrida a 70-75% do VO_{2max} , e aumento da velocidade para 90% do VO_{2max} até a exaustão), randomizados duplo cego em duas fases (placebo X vitamina C). Na fase vitamina C eles ingeriram 500 mg de vitamina C por dia, durante 7 dias, antes do protocolo exaustivo, e na fase placebo eles ingeriram por sete dias placebo antes do mesmo protocolo. Foram coletadas amostras de sangue antes do exercício, logo após, 1h, 2h, 4h e 24h após para determinação dos biomarcadores de estresse oxidativo. As duas fases foram homogêneas, os indivíduos apresentaram consumo alimentar similar e não houve diferença na duração e intensidade do exercício. Os resultados mostram que o uso de suplemento de vitamina C favoreceu maiores níveis séricos de ácido ascórbico em relação ao placebo logo depois do exercício até 4 horas após, e por isso poupou a eliminação dos outros antioxidantes, α -tocoferol e retinol, que estavam em menores concentrações séricas até 2 horas após o exercício, e do GSH, que se manteve em menores concentrações até 24 horas após. Enquanto com uso de placebo, já que os níveis de ácido ascórbico eram menores, houve uma maior liberação destes outros antioxidantes, e o α -tocoferol e retinol começaram a ser consumidos 1 hora após o exercício, para combater os radicais livres formados, até 24 horas após. Apesar da CAT não ser alterada nem pela suplementação nem pelo exercício exaustivo, o FRAP foi maior na fase vitamina C e se manteve estável nas 24h após o exercício. O ácido úrico não apresentou diferença significativa, e seu uso foi poupado por outros antioxidantes séricos nas duas intervenções. Nas duas fases os indivíduos conseguiram combater os radicais livres formados pelo exercício exaustivo, já que os marcadores de peroxidação lipídica (MDA, TBARS e FOX) não aumentaram após o exercício em nenhuma das intervenções, não houve aumento de oxidação protéica (AOPP e PC). Os marcadores de lesão hepática (TGO), lesão muscular (CK) e tecidual (LDH) se comportaram de maneira igual com ou sem uso de vitamina C. As vantagens do uso adicional de vitamina C são: a maior proteção antioxidante desde o início do exercício, já que apresenta maiores concentrações séricas de vitamina C e de FRAP, o menor grau de peroxidação lipídica, avaliado pelo MDA, o menor grau de oxidação protéica, avaliado pelas PC e a menor dependência do GSH como antioxidante endógeno. Sendo assim, uso de uma dose modesta de vitamina C, por um curto período de tempo, foi capaz de auxiliar na proteção antioxidante, sem nenhum efeito danoso aos indivíduos.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio. Vitamina C. Exercício exaustivo. Antioxidantes. Suplementação.

ABSTRACT

GARLIPP-PICCHI, M. Effects of ascorbic acid on oxidative stress biomarkers induced by exhaustive exercise. 2015. 97 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The objective of this study was to evaluate the effects of vitamin C supplementation on oxidative stress biomarkers induced by exhaustive exercise. The sample consisted of 13 males, physically active, aged 18 to 33 years, mean BMI 23.65 ± 3.5 kg/m² and 50.94 ± 5.2 VO_{2max} ml.kg⁻¹. min⁻¹. These individuals were subjected to an exhaustive exercise protocol (40 minutes of running at 70-75% of VO_{2max}, and increased speed to 90% VO_{2max} until exhaustion), randomized double-blind in 2 phases (placebo X vitamin C). In vitamin C phase they ingested 500 mg vitamin C per day for 7 days before exhausting protocol and the placebo phase, they ingested placebo for 7 days prior to the same protocol. Blood samples were taken before exercise, immediately after, 1h, 2h, 4h and 24h after for determination of biomarkers of oxidative stress. The two phases were homogeneous, the subjects had similar food consumption and no difference in the duration and intensity of exercise. The results show that the use of vitamin C supplement favored higher serum levels of ascorbic acid relative to placebo soon after exercise to 4 hours after, and therefore spared the elimination of other antioxidants, α -tocopherol and retinol, which were lower serum concentrations up to 2 hours after exercise, and GSH, which remained at lower levels within 24 hours. As with the use of placebo, as the ascorbic acid levels were lower, there was a greater release of these other antioxidants, and α -tocopherol and retinol began to be consumed in 1 hour of exercise to combat free radicals formed by 24 hours. Despite the CAT not be altered or by supplementation or by exhaustive exercise, the FRAP was higher in vitamin C phase and remained stable in the 24 hours after exercise. Uric acid showed no significant difference, and its use has been spared by other serum antioxidants in 2 interventions. In 2 phases individuals able combat free radicals formed by exhaustive exercise, since the lipid peroxidation markers (MDA, TBARS and FOX) did not increase after exercise in any of the interventions, there was no increase in protein oxidation (AOPP and PC). The markers of liver injury (AST), muscle damage (CK) and tissue (LDH) behaved equally with or without use of vitamin C. The advantages of the additional use of vitamin C are: the highest antioxidant protection since the beginning of exercise, since it has higher serum concentrations of vitamin C and FRAP, the lowest degree of lipid peroxidation, measured by MDA, the lowest level of protein oxidation, rated by PC and less dependent on GSH as an endogenous antioxidant. Thus, use of a modest dose of vitamin C, for a short period of time, was able to assist in antioxidant protection, with no harmful effect on individuals.

Keywords: Reactive oxygen species. Vitamin C. Exhaustive exercise. Antioxidants. Supplementation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização da amostra.....	49
Tabela 2 – Valores médios e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos.....	50
Tabela 3 – Valores médios e desvios padrão da intensidade, duração e variáveis fisiológicas do exercício exaustivo em ambas as fases.....	51
Tabela 4 – Número de indivíduos com consumo adequado de energia, macronutrientes e micronutrientes nas diferentes fases do estudo.....	53
Tabela 5 – Valores médios do consumo de energia, macronutrientes e micronutrientes nas 2 fases do estudo.....	53
Tabela 6 – Valores médios basais (antes do exercício) e desvios padrão dos antioxidantes e biomarcadores de estresse oxidativo.....	55

LISTA DE FIGURAS

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.....	26
Figura 2 – Fluxograma do delineamento do estudo.....	38
Figura 3 – Cinética das concentrações plasmáticas médias e desvios-padrões das vitaminas antioxidantes, α -tocoferol, Retinol e Ácido ascórbico durante uso de placebo e suplemento de vitamina C.....	57
Figura 4 – Cinética das concentrações plasmáticas médias e desvios-padrões dos antioxidantes, poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), capacidade antioxidante total (CAT), glutathiona reduzida (GSH) e ácido úrico, durante uso de placebo e suplemento de vitamina C.....	59
Figura 5 – Cinética das concentrações plasmáticas médias e desvios-padrões dos marcadores de peroxidação lipídica: Substâncias reativas ao ácido tiobabitérico (TBARS), Malonaldeído (MDA) e Determinação de hidroperóxidos lipídicos pela oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX), durante uso de placebo e suplemento de vitamina C.....	61
Figura 6 – Cinética das concentrações plasmáticas médias e desvios-padrões dos marcadores de oxidação protéica, Produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) e Proteínas carboniladas (PC), durante uso de placebo e suplemento de vitamina C.....	62
Figura 7 – Cinética das concentrações plasmáticas médias e desvios-padrões dos marcadores de lesão hepática (Transaminase Glutâmico-oxalacética - TGO), dano muscular (creatina quinase - CK) e dano tecidual (Lactato desidrogenase - LDH) durante uso de placebo e suplemento de vitamina C.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFR – Radical Livre Ascorbato

AI – Ingestão Adequada

AOPP – Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas

ATP – Adenosina Trifosfato

BORG – Escala Subjetiva de Percepção de Esforço

CAT – Capacidade Antioxidante Total

CK – Creatina Quinase

CO₂ – Gás Carbônico

CT – Colesterol Total

DHA – Dehidroascorbato

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DRIs – Dietary Reference Intake

EAR – Necessidade Média Estimada

EO – Estresse Oxidativo

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

Fe²⁺ – Ferro Ferroso

Fe³⁺ - Ferro Férrico

FOX – Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos pela Oxidação do Ferro em Xilenol Laranja

FRAP – Poder Antioxidante de Redução do Ferro

GPx – Glutathione Peroxidase

GR – Glutathione Redutase

GSH – Glutathione Reduzida

GSSG – Glutathione Oxidada

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

IMC – Índice de Massa Corporal

IPAQ – Questionário Internacional de Atividade Física

LDH – Lactato Desidrogenase

LOOH – Hidroperóxidos de Lipídeo

MDA – Malonaldeído

NADPHoxidase – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

O₂ – Oxigênio

PAR-Q – Questionário sobre Prontidão para Atividade Física

PC – Proteínas Carboniladas

RDA – Ingestão Dietética Recomendada

RL – Radical livre

SOD – Superóxido Dismutase

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TGO – Transaminase Glutâmico Oxalacética

UL – Limites Máximos Recomendados

VCT – Valor Calórico Total

VO₂ – Consumo de Oxigênio

VO_{2max} – Consumo Máximo de Oxigênio

XOD – Xantina Oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Radicais Livres e Estresse Oxidativo:	15
1.2 Efeitos benéficos e prejudiciais das Espécies Reativas de Oxigênio:	17
1.3 Sistema antioxidante:	18
1.4 Medidas de estresse oxidativo:	19
1.5 Exercício físico, estresse oxidativo e sistema antioxidante:	21
1.6 Suplementação de antioxidantes:	24
1.7 Vitamina C:	25
1.7.1 Disponibilidade e transporte de vitamina C:	27
1.7.2 Suplementação de Vitamina C e estresse oxidativo:	28
1.7.3 Efeitos pro-oxidante da Vitamina C:	29
1.8 Justificativa do trabalho:	30
2. HIPÓTESE	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral:	34
3.2 Objetivos Específicos:	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Tipo e campo de estudo:	36
4.2 Indivíduos:	36
4.3 Delineamento do estudo:	37
4.4 Determinação do Consumo Máximo de Oxigênio (VO_{2max}):	38
4.5 Protocolo de suplementação:	39
4.6 Protocolo de exercício exaustivo:	39
4.7 Avaliação bioquímica:	40
4.7.1 Biomarcadores de peroxidação lipídica:	40
4.7.2 Biomarcadores de oxidação protéica:	41
4.7.3 Antioxidantes:	42
4.7.4 Vitaminas antioxidantes:	43
4.8 Avaliação do consumo alimentar:	45
4.9 Análise estatística:	46

5. RESULTADOS	49
5.1 Caracterização da amostra:	49
5.2 Exercício exaustivo – Duração, intensidade e variações fisiológicas:	51
5.3 Consumo alimentar:	52
5.4 Estresse oxidativo e antioxidantes:	54
5.4.1 Adequação dos valores basais:	54
5.4.2 Comparação entre as fases:	56
5.4.2.1 Antioxidantes:	56
5.4.2.2 Marcadores de peroxidação lipídica:	59
5.4.2.3 Marcador de oxidação protéica:	61
5.4.2.4 Marcadores de lesão hepática e tecidual:	62
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	89
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	98
ANEXO B – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	100
ANEXO C – Questionário Inicial para inclusão em Projeto de Pesquisa	101
ANEXO D – Valores médios e desvios-padrão dos antioxidantes e biomarcadores de estresse oxidativo	103

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A prática regular de atividade física associada a uma dieta balanceada pode ser importante fator na promoção da saúde (CRUZAT et al., 2007), uma vez que induz a várias adaptações nos sistemas cardiovascular, respiratório e musculoesquelético, proporcionando resultados positivos para a prevenção e tratamento de doenças metabólicas (DRAEGER et al., 2014). Por outro lado, a frequente realização de exercícios físicos de alta intensidade ou exaustivos pode aumentar a suscetibilidade a lesões, promover a fadiga crônica e *overtraining*, parcialmente em razão da elevada síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs). Evidências experimentais apontam que estes compostos podem estar envolvidos com o desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, doenças inflamatórias e aterosclerose (CRUZAT et al., 2007; FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). Por isso, diversas alternativas nutricionais têm surgido na tentativa de reduzir o estresse oxidativo (EO) e algumas de melhorar o desempenho atlético tanto em exercício físicos de alta intensidade como em exaustivos.

1.1 Radicais Livres e Estresse Oxidativo:

O interesse pelo estudo de radicais livres e antioxidantes tem se intensificado cada vez mais, 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, 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 nanossegundos (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 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; SEVANI, 2005), exercício físico (VOLLAARD; SHEARMAN; COOPER, 2005), 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 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).

1.2 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 as 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 extenuantes. Ainda, entre os efeitos benéficos das EROs estão: 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 quantidade excessiva 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 à 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, 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 reoxigenados, 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 consequentemente 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 reposta 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).

1.3 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, glutathione peroxidase (GPX), entre outras. E antioxidantes não enzimáticos são: vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), flavonóides, glutathione (GSH), ácido úrico e micronutrientes (ferro, cobre, zinco,

selênio, manganês), os quais agem como cofatores enzimáticos, entre outros. Nos casos em que 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 (FINAUD; LAC; FILARE, 2006).

1.4 Medidas de estresse oxidativo:

O EO 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 EO 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 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). Mas o tecido mais frequentemente estudado é o sangue, devido a facilidade de coleta do material e análise dos constituintes (MICHAILIDIS et al., 2007).

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 glutathiona, assim como nos níveis circulantes de vitamina E e vitamina C. Além disso, a atividade de certas enzimas antioxidantes [i.e superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), catalase, glutathiona 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 as EROs pode não resultar em acúmulo significativo de proteínas estruturais modificadas. Porém algumas investigações demonstram significativo dano oxidativo de proteína, frequentemente avaliado 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).

1.5 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, à 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 durante a atividade física depende do tipo de exercício (aeróbio, anaeróbio), e 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). Existem evidências suficientes para indicar que uma única carga de exercício de endurance ou exercício de força podem aumentar os níveis séricos de um ou vários biomarcadores de EO (FERNÁNDEZ et al., 2009). Várias investigações mostram um aumento na produção de EROs, 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 que o EO seja estabelecido 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), 10 a 15 vezes mais que em condições de repouso (AGUILÓ et al., 2007), e ainda, aumento em 100 a 200 vezes no fluxo de oxigênio no músculos ativos (ZANELLA; SOUZA; GODOY, 2007), o que pode aumentar a produção de radicais livres e levar ao estresse oxidativo, já que na mitocôndria, durante a produção de ATP, 1 a 5% do oxigênio podem escapar e formar radicais livres (GOLDFARB et al., 2005). Contudo, este fenômeno pode não ocorrer com exercício de baixa

intensidade ($<50\% \text{VO}_{2\text{max}}$), uma vez que 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 resultar na oxidação de moléculas biológicas (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). 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 reperfusão, atividade de quebras de fagócitos respiratórios, acidose e oxidação de catecolaminas (FINAUD; LAC; FILARE, 2006). Assim, quanto maior a intensidade do exercício maior a produção de radicais livres e estresse oxidativo (FINAUD; LAC; FILARE, 2006), segundo Cruzat et al. (2007) é necessário exercício com intensidade maior ou igual a 70% do $\text{VO}_{2\text{max}}$. Ainda exercício exaustivo parece induzir maior EO que exercício não exaustivo (MICHAELIDIS et al., 2007).

Além 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). Segundo Nikolaidis et al. (2012) o exercício extenuante não resulta em aumento significativo de EO no sangue de homens treinados, provavelmente porque a participação em um programa de exercício regular está associado com uma regulação positiva crônica na defesa antioxidante, que pode proporcionar uma proteção contra o aumento de radicais livres induzido pelo exercício. Assim, a exposição crônica ao 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 (DRAEGER et al., 2014; 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). De acordo com Nikolaidis et al. (2012) 3 semanas de treino parecem ser suficientes para induzir as adaptações no sistema oxidativo.

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 lesão muscular. Se a capacidade de recuperação individual é ultrapassada, estas mudanças podem contribuir para o aparecimento de *overtraining*, o qual pode agravar o EO, que é gerado quando os sistemas antioxidantes não foram capazes de neutralizar o excesso de EROs produzido. 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). Por isso a manutenção de um status nutricional antioxidante adequado é determinante para ajudar a combater o excesso de radicais livres formados (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008).

Apesar das centenas de estudos que tem investigado os efeitos do exercício aeróbico no estresse oxidativo em humanos, a grande maioria tem coletado amostras de sangue apenas imediatamente após o exercício (ALESSIO et al., 2000; WATSON et al., 2005). Poucos estudos tem coletado mais que duas amostras de sangue após exercício (BLOOMER et al., 2007; SCHENEIDER et al., 2003; WEISS et al., 2002) e os mais detalhados deles têm tomado 4 amostras de sangue (BLOOMER et al., 2005; RADAK et al., 2000; RADAK et al., 2003). Os estudos relevantes têm reportado resultados inconsistentes em relação aos efeitos do

exercício nos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo, um fato que, ao menos parcialmente, pode ser atribuído às diferenças nos sujeitos (treinados versus não treinados), tipo de protocolo (diferenças na duração e intensidade), momento da coleta da amostra de sangue, e os métodos empregados para avaliação (MICHAILIDIS et al., 2007).

1.6 Suplementação de antioxidantes:

A suplementação antioxidante tem sido utilizada na tentativa de aumentar a capacidade antioxidante (CRUZAT et al., 2007) e oferecer suporte ao sistema de defesa antioxidante endógeno quando há aumento da produção de EROs (BLOOMER; GOLDFARB; MCKENZIE, 2006), e/ou os mecanismos normais de defesa do corpo não são suficientes para lidar adequadamente com o aumento da produção de EROs (GOLDFARB et al., 2005). Vários estudos que avaliaram o uso de suplementos antioxidantes observaram atenuação de alguns marcadores de estresse oxidativo (GOLDFARB et al., 2005; GOLDFARB et al., 2010; NAKHOSTIN-ROOHI et al., 2008). Mas até o momento, ainda não está suficientemente discutido se o exercício agudo ou crônico induz uma mudança no requerimento de antioxidantes e minerais (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008).

Os efeitos da suplementação com 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 (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008). Já Giuseppe D'Antona (2013) sugere que a suplementação antioxidante pode exercer alguma proteção em indivíduos não treinados ou fisicamente ativos, e a perda de efeito parece ser evidente em indivíduos altamente treinados, cuja adaptação a elevada exposição à oxidação é normalmente capaz de promover um aumento secundário das defesas antioxidantes endógenas que reduzem o risco de dano oxidativo. Nestes indivíduos, condições de exposição a antioxidantes pode levar a falha das adaptações benéficas do exercício, promovendo até dano muscular ao invés de recuperação a partir da suplementação. Há evidências mostrando efeitos adversos de megadoses de suplementação antioxidante, devido aumento dos

marcadores de EO induzido pelo exercício, agindo assim como pro-oxidantes (GIUSEPPE D'ANTONA, 2013). Ou seja, 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).

Alguns dados sugerem um claro benefício tanto da dieta rica em antioxidantes como da suplementação, entretanto outros sugerem nenhum efeito positivo ou até consequências negativas, dependendo do antioxidante suplementado, 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).

1.7 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+}),

promovendo assim sua absorção no trato gastrointestinal e estabilizando proteínas ligadoras de ferro. Em humanos a falta da enzima gulonolactona oxidase, envolvida na síntese de vitamina C, 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, por ser um potente agente redutor e varredor de radicais livres nos sistemas biológicos, além de efetiva no citosol (FINAUD; LAC; FILARE, 2006). *In vitro* a exposição do plasma a radicais livres resultou em oxidação de lipídeos, proteínas, tióis e vitamina E; mas quando a vitamina C foi adicionada ao plasma, a oxidação destas moléculas foi prevenida ou retardada (FREI; ENGLAND; AMES, 1989).

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 (Adaptado de DUARTE; LUNEC, 2005)

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).

1.7.1 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, principal via de eliminação (MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008; PADAYATTY et al., 2007), devido a sua solubilidade em água e a existência de mecanismos de homeostase que regulam os níveis plasmáticos de ascorbato (TAULER et al., 2003). 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). O ácido ascórbico plasmático é fortemente relacionado ao consumo de vitamina C, quando o consumo é entre 50 e 90 mg/dia (MARGARITIS, ROUSSEAU, 2008). Não são observados níveis plasmáticos superiores com doses suplementares maiores que 500 mg/dia, devido à eficiente excreção de vitamina C na urina (DUARTE; LUNEC, 2005), por isso para Margaritis e Rousseau (2008) o consumo de suplemento de vitamina C, acima desse limiar não tem efeito nenhum sobre as concentrações plasmáticas de vitamina C. 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). De acordo com Levine et al. (1996) a saturação plasmática de vitamina C ocorre para consumo de vitamina C entre 0,2 g

e 1,0 g, dependendo da duração do tratamento, e a biodisponibilidade diminuiria e o aumento da excreção urinária ocorreria com doses mais elevadas.

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).

1.7.2. Suplementação de Vitamina C e estresse oxidativo:

A suplementação de vitamina C pode ter efeitos benéficos no dano muscular e influenciar no estresse oxidativo. No entanto são limitados os estudos que avaliaram o papel da vitamina C na prevenção do estresse oxidativo induzido pelo exercício físico em humanos. Alguns estudos sugerem um efeito vantajoso (ALESSIO; GOLDFARB; CAO, 1997; KHASSAF et al., 2003), enquanto outros reportam nenhum efeito (BLOOMER et al., 2006; GOLDFARB et al., 2005; PEAKE; SUZUKI; COOMBES, 2007). Contudo, os estudos que demonstram efeitos benéficos, frequentemente não controlaram a intensidade relativa do exercício (GOLDFARB et al., 2005).

Assim, os resultados sobre o potencial efeito benéfico antioxidante da suplementação de vitamina C em reduzir o estresse oxidativo induzido pelo exercício são controversos, em parte porque a dose do suplemento tem variado e porque a intensidade do exercício não tem sido controlada. Outro fator de confusão que pode

estar influenciando os resultados é o consumo alimentar de vitamina C pelos sujeitos (GOLDFARB et al., 2005).

Como diferentes doses de vitamina C tem sido utilizada não é claro qual dose seria apropriada para prevenir o estresse oxidativo induzido pelo exercício. Em geral, 1 dia de suplementação de vitamina C, parece não ter efeitos benéficos na redução do estresse oxidativo, e os resultados são ambíguos quando a suplementação de vitamina C é feita por um período mais longo (GOLDFARB et al., 2005).

Assim 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 (PEAKE, 2003).

1.7.3 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 sequestro de ferro pelas proteínas ligadoras de metal como a ferritina e transferrina. Consequentemente, 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).

De acordo com Margaritis e Rousseau (2008) o consumo de suplemento de vitamina C pode gerar efeitos pro-oxidantes quando feito acima de 500 mg/dia.

1.8 Justificativa do trabalho:

O exercício físico vigoroso, de alta intensidade e/ou exaustivo, induz ao estresse oxidativo, tanto em atletas, como em indivíduos fisicamente ativos e sedentários. Portanto a quantificação do sistema antioxidante e da produção de radicais livres nesta situação é importante, para busca de estratégias que minimizem os danos provocados pelos radicais livres, os quais podem ser prejudiciais a saúde. Ao mesmo tempo situações que induzam estresse oxidativo podem ter maior necessidade de antioxidantes exógenos, uma vez que auxiliam o sistema de defesa endógeno no combate aos radicais livres formados.

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que o uso adicional de vitamina C, através de suplementação, por 1 semana antes da prática de um exercício físico exaustivo possa auxiliar o sistema antioxidante endógeno a amenizar o estresse oxidativo induzido por este tipo de exercício, minimizando os danos provocados pelos radicais livres.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos da suplementação de vitamina C nos biomarcadores de estresse oxidativo após exercício físico exaustivo.

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar o nível de estresse oxidativo gerado por exercício exaustivo;
- Observar a cinética dos biomarcadores de estresse oxidativo por medidas seriadas após carga de exercício até a exaustão;
- Verificar se a suplementação de vitamina C alivia e/ou inibe o estresse oxidativo induzido pelo exercício intenso e exaustivo;
- Caracterizar o consumo alimentar de macronutrientes e micronutrientes antioxidantes e suas adequações.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo e campo de estudo:

Este estudo é um ensaio clínico de intervenção prospectiva, randomizado controlado, duplo-cego e *crossover*. Os protocolos de exercício e a coleta do material biológico foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Exercício da Universidade Federal de São Carlos (Ufscar), e as análises bioquímicas feitas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e no Laboratório Médico Dr. Maricondi (São Carlos/SP).

4.2 Indivíduos:

A amostra foi composta por 13 indivíduos do sexo masculino, saudáveis, fisicamente ativos, com idades entre 18 e 33 anos, e média de $23,4 \pm 4,8$ anos. O menor grau de escolaridade foi 2º grau completo. Para participação na pesquisa os indivíduos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, informando os riscos, desconfortos e benefícios envolvidos no estudo (Anexo A), o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto em 20 de junho de 2011 de acordo com processo HCRP nº 2465/2011 (Anexo B).

Os critérios de exclusão utilizados foram: uso de tabaco, uso de anti-inflamatórios, doenças cardiovasculares e doenças metabólicas tais como diabetes, dislipidemia e anemia, e ainda uso de suplementos antioxidantes e ferro nos últimos 2 meses.

4.3 Delineamento do estudo:

Primeiramente foi aplicado um questionário para avaliar o uso de suplementos alimentares, histórico clínico, uso de medicamentos, dados pessoais, tabagismo e etilismo (Anexo C). Além disso, também foi utilizado o questionário sobre prontidão para atividade física (PAR-Q) e o Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ), que avalia o nível de atividade física dos voluntários (MATSUDO et al., 2001; SILVA et al., 2007).

Os indivíduos incluídos na pesquisa foram então submetidos ao teste para determinação do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), durante o qual puderam se familiarizar com os equipamentos. Após o teste, todos os sujeitos passaram por duas intervenções, randomizados através de sorteio, duplo cego em 2 fases:

- Vitamina C: receberam 2 comprimidos de 250 mg de vitamina C por dia, durante 7 dias antes do protocolo de exercício exaustivo;
- Placebo: receberam 2 comprimidos de 250 mg de maltodextrina por dia, durante 7 dias antes do protocolo de exercício exaustivo.

No dia seguinte (8º dia), após cada tratamento, os participantes realizaram protocolo de exercício agudo e intenso até a exaustão, para indução do estresse oxidativo. O protocolo de exercício exaustivo foi realizado pela 1ª vez 8-20 dias depois do teste de VO_{2max} , e após o *crossover*, foi realizado pela 2ª vez, com intervalo de 10-20 dias do primeiro protocolo exaustivo. Ou seja, o período de *wash out* entre as suplementações foi de 3 a 13 dias, respeitando o critério de que o tempo de *wash out* deveria ser pelo menos 1 dia, já que de acordo com Peake, Suzuki e Coombes (2007) o tempo de meia vida da vitamina C é de 10 horas. Todos os indivíduos finalizaram as 2 fases em no máximo 30 dias após o teste de determinação de VO_{2max} .

No dia da realização do 1º protocolo de exercício exaustivo foram mensurados peso, altura, Índice de Massa Corporal (IMC), porcentagem de gordura corporal pela bioimpedância elétrica (Tanita Tbf-310 profissional), assim como feita coleta de sangue de jejum.

Nas duas fases do estudo foram feitas coletas seriadas de sangue após o exercício, e coleta de sangue do lóbulo da orelha antes e após o exercício para

determinação da lactacidemia. A Figura 2 representa o fluxograma com o delineamento do estudo.

Figura 2 – Fluxograma do delineamento do estudo

4.4 Determinação do Consumo Máximo de Oxigênio (VO_{2max}):

O teste de VO_{2max} foi feito em esteira rolante elétrica (Action BH Fitness – Explorer G.635, Alemanha) usando um analisador de gases de circuito aberto (VO2000, Medgraphics, St Paul, Minnesota, USA). Os sujeitos descansaram por 20 minutos após chegarem ao laboratório. Após esse descanso iniciou-se o exercício a 5 km/h e a velocidade foi aumentada em 1 km/h a cada 1 minuto até a exaustão. Esse teste teve duração de aproximadamente 15 minutos, dependendo do condicionamento físico de cada participante. O pico de VO_2 obtido foi considerado o VO_{2max} . Para realização do teste os indivíduos foram orientados a se abster o uso de álcool, cafeína e exercício extenuante por pelo menos 24 horas antes do teste (BENTLEY; NEWELL; BISHOP, 2007).

4.5 Protocolo de suplementação:

Para suplementação utilizou-se o esquema original de randomização duplo cego usando código de cor. As cápsulas foram manipuladas, catalogadas e com a legenda lacrada, de maneira que nem os sujeitos nem os pesquisadores sabiam do tratamento utilizado.

Os indivíduos foram suplementados por 7 dias antes de cada protocolo de exercício exaustivo. Na fase vitamina C os indivíduos ingeriram 2 cápsulas contendo 250 mg de vitamina C cada, que eram na cor vermelha. Na fase placebo também ingeriram 2 cápsulas, porém contendo 250 mg de maltodextrina, na cor azul. Os sujeitos foram orientados a ingeri-las às 9:00 h e às 21:00 h. Sendo que a última cápsula devia ser ingerida às 21:00 h do dia anterior ao exercício. As cápsulas foram oferecidas sem nenhum custo aos voluntários.

4.6 Protocolo de exercício exaustivo:

O protocolo de exercício exaustivo foi realizado no final de cada período de suplementação, placebo ou suplemento de vitamina C. Este protocolo consistiu de 40 minutos de corrida em esteira na intensidade correspondente a 70-75% do VO_{2max} , e aumento da velocidade para 90% do VO_{2max} até que o exercício terminasse com a exaustão (MICHAILIDIS et al., 2007; NIKOLAIDIS et al., 2006). Para realização deste protocolo os indivíduos também foram orientados a se abster álcool, cafeína e exercício extenuante por pelo menos 24 horas antes do protocolo (GOLDFARB et al., 2005). Todas as sessões foram realizadas entre 7 e 10 horas da manhã para controlar as variações diurnas. Durante a realização do exercício os indivíduos puderam ingerir água à vontade. Este protocolo de exercício garantiu que os sujeitos se exercitassem em similar intensidade de acordo com seu VO_{2max} .

Durante os protocolos de exercício a cada 5 minutos foi monitorada frequência cardíaca, por cardiofrequencímetro (Polar, FT1, Kempele, Finland) e aplicada Escala de Percepção Subjetiva de Esforço (BORG), na qual os indivíduos apontavam um número de 6 a 20 de acordo com sua percepção do exercício, onde 7

representava muito fácil e 20 exaustivo (BORG, 1982). Caso algum comportamento anormal ocorresse ou o voluntário relatasse algum desconforto o exercício seria interrompido imediatamente.

4.7 Avaliação bioquímica:

Foram feitas coletas de sangue para análises bioquímicas e de marcadores do estresse oxidativo e antioxidantes, por enfermeira treinada.

Nas 2 fases do estudo foram feitas coletas seriadas de sangue: antes da realização do protocolo de exercício exaustivo (após um descanso de 10 minutos), logo após o exercício, 1, 2, 4 e 24 horas após, para análise do metabolismo antioxidante e estresse oxidativo. Os indivíduos permaneceram sentados ou deitados após o exercício.

Antes da primeira realização do protocolo de exercício exaustivo, os indivíduos fizeram jejum noturno de 12 horas, para que no material coletado antes do exercício fosse possível avaliar os parâmetros bioquímicos que determinam a saúde destes indivíduos, garantindo que eram realmente saudáveis. Foram então avaliados: hemoglobina, hematócrito, ferro sérico, glicose, creatinina, ureia e lipidograma (triglicérides, colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol) pelo Laboratório Médico Dr. Maricondi (São Carlos/SP).

Antes da segunda realização do protocolo exaustivo, assim como para as coletas de 24 horas após o exercício, os indivíduos foram orientados a manter jejum noturno de 8 horas. Sendo que as coletas de sangue antes do exercício e 24 horas após foram sempre feitas antes da ingestão alimentar (café da manhã).

Para análise do metabolismo antioxidante e estresse oxidativo foram dosados:

4.7.1 Biomarcadores de peroxidação lipídica:

- **Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS):** a determinação de TBARS é feita por método colorimétrico, que consiste na reação dos aldeídos formados, cujo principal representante é o

malonaldeído (MDA), com ácido tiobarbitúrico (TCA) em meio ácido e sobre aquecimento por 15 minutos a 100°C. 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 535 nm (BUEGE; AUST, 1978).

- **Malonaldeído (MDA):** realizada por espectrofotometria (Modelo SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) de acordo com a técnica descrita por Gerard-Monnier et al.(1998) com algumas modificações. Em 200 µl de amostra foi adicionado 650 µl de solução de 10 mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 150 µl de ácido clorídrico (HCl) a 37%. A solução foi homogeneizada e aquecida a 45°C em banho-maria por 40 minutos. Após resfriamento em gelo, as amostras foram lidas no comprimento de onda 586 nm. A concentração de MDA é calculada comparando-a a uma curva de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP).
- **Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos pela Oxidação do Ferro em Xilenol Laranja (FOX):** os hidroperóxidos foram determinados pelo método da oxidação dos íons férrico na presença de xilenol laranja de acordo com o método descrito por Södergren et al. (1998), com posterior leitura no comprimento de onda de 560 nm em espectrofotômetro (Modelo SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e comparação com a curva padrão de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os resultados são expressos em µmols de H₂O₂/L.

4.7.2 Biomarcadores de oxidação protéica:

- **Proteínas Carboniladas (PC):** a dosagem de PC no soro foi realizada por reação colorimétrica com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) e posterior leitura em espectrofotômetro (Modelo SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) no comprimento de onda de 370 nm, conforme descrito por Leveni et al. (1990) e Odetti et al. (1996).

- **Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas (AOPP):** realizado por espectrofotometria (Modelo SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) de acordo com a técnica descrita por Anderstam et al. (2008), em que os lipídeos séricos são precipitados por sulfato de dextrano e a reação é calibrada com cloramina-T na presença de iodeto de potássio, e a leitura é feita no comprimento de onda de 340 nm. As concentrações de AOPP são expressas em μM de equivalente de cloramina-T.

4.7.3 Antioxidantes:

- **Glutathiona Reduzida (GSH):** realizado por espectrofotometria (Modelo SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) de acordo com o método descrito por Costa, Santos e Lima (2006), em que os tióis interagem com ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), formando um ânion altamente colorido com pico máximo à 412 nm. À 25 μl de soro é adicionado 1 ml de Tris-EDTA (0,25 mol/L Tris base, 0,20 mol/L EDTA - pH 8.2) e a primeira leitura é feita (A1). Adiciona-se então a essa solução, 25 μl de DTNB (10 mmol/L em metanol absoluto), agita e após 15 minutos à temperatura ambiente faz a segunda leitura (A2). A concentração dos grupos sulfidrila é calculada utilizando uma curva padrão de Glutathiona Reduzida e os resultados são expressos em mmol/L.
- **Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP):** foi realizado por espectrofotometria, de acordo com o método proposto por Benzie e Strain (1996), onde a redução do íon férrico em ferroso em um pH baixo leva a formação de um complexo ferroso-tripiridiltiazina colorido. Os valores de FRAP são obtidos através da comparação da alteração da absorbância a 593 nm dos ensaios de misturas de reações com aqueles que contêm concentrações conhecidas do íon ferroso.
- **Capacidade Antioxidante Total (CAT):** foi realizada por espectrofotometria (SpectraMax M5, Molecular Devices, CA, Estados

Unidos) de acordo com a técnica descrita por Erel (2004), que utiliza uma nova versão do método colorimétrico baseado no ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). Esse método é pós-adicional, ou seja, o ABTS^{•+} oxidado é produzido utilizando o peróxido de hidrogênio em meio ácido (solução tampão de acetato a 30 mmol/L – pH 3,6) antes de ser adicionado à amostra. A elevada concentração de ABTS^{•+} na solução de acetato apresenta uma coloração profundamente verde. Os antioxidantes presentes na amostra são responsáveis pelo branqueamento da amostra e, portanto, o grau de branqueamento dependerá da concentração de antioxidantes presentes. A reação é calibrada com Trolox e os resultados são expressos em mmol equivalente de Trolox/L. Esta mudança na cor é mensurada por absorvância em 660 nm.

4.7.4 Vitaminas antioxidantes:

- **Ácido ascórbico:** a determinação de ácido ascórbico 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 520 nm. A concentração de vitamina C é realizada por meio da curva de calibração (BESSEY, 1960).
- **Vitamina E:** a análise de vitamina E foi feita por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Shimadzu Co, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna tipo C-18 (Shimpack CLC-ODS 4,6 x 25cm, Shimadzu Co., Kyoto, Japan), pré-coluna 4mm x 1cm e fluxo de 1mL/min e detector UV/Visível com leitura no comprimento de onda 292 nm. Para quantificação foi utilizado um padrão externo de alfa-tocoferol e comparação com a curva de calibração (JORDÃO et al, 2004).
- **Vitamina A:** a análise de vitamina A foi feita por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Shimadzu Co, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna tipo C-18 (Shimpack CLC-ODS 4,6 x 25cm, Shimadzu Co.,

Kyoto, Japan), pré-coluna 4mm x 1cm e fluxo de 1mL/min e detector UV/Visível com leitura no comprimento de onda 325 nm. Para quantificação foi utilizado um padrão externo de retinol e comparação com a curva de calibração (JORDÃO et al, 2004).

Todas estas análises foram realizadas no laboratório de Nutrição e Metabolismo da FMRP – USP. Quando necessário as análises foram feitas em duplicata ou triplicata. Ainda foram dosados o antioxidante ácido úrico, e os marcadores indiretos de estresse oxidativo: creatina quinase – CK (marcador de lesão muscular), transaminase glutâmico-oxalacética – TGO (marcador de lesão tecidual) e lactato desidrogenase – LDH (marcador de lesão tecidual) pelo Laboratório Médico Dr. Maricondi (São Carlos/SP).

Em cada uma das etapas foram coletados aproximadamente 7 ml de sangue por punção venosa em tubo a vácuo estéril (Vacutainer - BD® de tampa amarela) contendo ativador de coagulação, estocados em gelo e protegidos da luz. Após 30 minutos 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 tubos Ependorf e armazenado a -80°C, o sedimento foi descartado. Para análise do ácido ascórbico foi feito um preparo da amostra logo após a separação do soro, do qual foram retirados 250 µl e colocados em um tubo contendo 1 ml de TCA 5% (ácido tricloroacético), essa mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos à 4°C, o sobrenadante foi então retirado, transferido para um tubo de Ependorf e armazenado a -80°C.

Para as coletas após o exercício uma cânula foi inserida na veia antecubital. Um pequeno volume de salina estéril foi infundido imediatamente após as extrações de cada amostra para manter a cânula limpa (FERNÁNDEZ et al., 2009). Alguns indivíduos preferiram não permanecer com a cânula, e por isso em cada coleta uma nova punção era feita.

Os valores de hematócrito foram dosados em todas as amostras, caso houvesse modificação nos valores, devido a hemoconcentração, os valores seriam ajustados pela equação de Dill e Costill (1974).

Com a finalidade de observar a intensidade do exercício foi mensurada a concentração de lactato. Para a determinação da lactacidemia, foi feita coleta de 25 µl de sangue puncionado do lóbulo da orelha. As amostras foram analisadas em

lactímetro eletro-enzimático (YSI 1500 Sport, Yellow Springs®). A coleta foi realizada em repouso e 1 minuto após o término de cada fase. As amostras de sangue foram armazenadas e congeladas em tubo Ependorf, com uma solução de 50 µl de fluoreto de sódio a 1%, e analisadas no máximo até 5 dias do seu armazenamento.

4.8 Avaliação do consumo alimentar:

A avaliação do consumo alimentar foi feita para controlar os efeitos da alimentação prévia nos resultados do estudo, e para observar se houve um consumo similar de macronutrientes e antioxidantes antes de ambas as fases. Para isso foi solicitado registro alimentar dos 7 dias antes de cada protocolo de exercício exaustivo, culminando com os dias que fizeram o uso do suplemento de vitamina C. Os indivíduos foram instruídos a manter sua alimentação habitual, e a repeti-la antes das 2 fases.

Além disso, a análise da dieta foi realizada com objetivo de avaliar a adequação de consumo de macronutrientes e antioxidantes, e relacionar a adequação de consumo com os biomarcadores de estresse oxidativo.

Foram analisados os antioxidantes vitamina C e retinol, os macronutrientes carboidrato, proteína e lipídeo, e ainda colesterol, fibras e consumo calórico através do Software DietPro5i (Agromídia Software LTDA, Viçosa, MG, 2008), utilizando como preferência a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO/Versão II (NÚCELO DE ESTUDOS EM PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO, 2006), já que é a tabela de alimentos que melhor reflete os alimentos brasileiros. Às análises foi adicionado o suplemento alimentar consumido habitualmente pelos participantes. Foi feita a média de consumo alimentar dos 7 dias para avaliar adequação do consumo habitual de acordo com os valores propostos pelas *Dietary Reference Intakes* (DRIs) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005; PADOVANI et al., 2006). A adequação aparente foi feita 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 foi utilizada 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.

Para avaliação da adequação da ingestão de energia, diferentemente de outros nutrientes, deve-se considerar 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, deve ser realizada em função do índice de massa corporal (IMC) (CUPPARI; SCHOR, 2005).

Para padronizar a alimentação nos dias do protocolo de exercício exaustivo os sujeitos se alimentaram no próprio laboratório. O café da manhã foi pelo menos 30 minutos antes do início dos exercícios, entre 7:30-8:00h, que consistiu de 2 fatias de pão com requeijão e 1 pote de iogurte. Após 20-25 minutos da realização dos protocolos de exercício os indivíduos receberam 1 banana. E entre 12:00-12:30h, sempre depois da coleta de 2 horas após o exercício os indivíduos receberam um lanche composto por 2 fatias de pão, 2 fatias de mussarela, 1 fatia de presunto, requeijão, 2 folhas de alface e 1 copo de refrigerante tipo guaraná. Os alimentos foram oferecidos sem nenhum custo.

4.9 Análise estatística:

Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP). A normalidade dos dados foi testada e confirmada com o uso do teste de Shapiro-Wilk. Quando as variáveis não apresentavam normalidade, as mesmas foram transformadas no seu logaritmo na base de 10 ($\log_{10}$). As diferenças nas variáveis do estresse oxidativo

foram analisadas por meio do teste ANOVA para medidas repetidas com uma configuração 2 x 6 (2 intervenções x 6 momentos). A esfericidade foi verificada pelo teste de Mauchley. Quando a esfericidade da amostra foi violada, a significância (*F-ratio*) foi corrigida pelo método de Greenhouse-Geisser. Para as variáveis cujo valor do teste foi significativo, foi utilizado o *post-hoc* de Tukey's com ajuste de Bonferroni para identificar as diferenças. As diferenças na percepção subjetiva de esforço com o exercício foram analisadas por meio do teste de Wilcoxon para medidas independentes, devido a sua distribuição não normal. O tamanho da amostra foi calculado *à priori* utilizando-se o software G*Power versão 3.1.3 (Erdfelder, Faul & Buchner, 1996; Kiel, Germany) com nível de significância padronizado em $p = 0,05$ e *power* $(1 - \beta) = 0,80$. Foi conduzido um estudo piloto para avaliar o *effect size* para a resposta das diferentes variáveis do EO entre as intervenções e o menor *efecct size* foi 0,49 (*effect size* largo). Baseado nesses cálculos *à priori* foi determinado o tamanho da amostra da pesquisa, que deveria ser, no mínimo 11 indivíduos. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$ e o *software* usado foi o SPSS versão 20.0 (Somers, NY, USA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra:

Participaram do estudo treze indivíduos do sexo masculino com idade média de $23,4 \pm 4,8$ anos, Índice de Massa Corporal (IMC) médio $23,7 \pm 3,5$ kg/m² e porcentagem de gordura corporal $15,3 \pm 4,9\%$, apenas 1 indivíduo apresentou gordura corporal acima do ideal. Todos eram aptos para prática esportiva, seguindo os critérios do Questionário sobre Prontidão para Atividade Física (PAR-Q), e fisicamente ativos. De acordo com o Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ), 7 destes indivíduos eram muito ativos e 6 deles ativos. A média do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) foi $50,9 \pm 5,2$ ml.kg⁻¹.min⁻¹ e a média da velocidade máxima atingida no teste de VO_{2max} foi $15,8 \pm 0,9$ km/h (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização da amostra

VARIÁVEIS	MÉDIA $\pm$ DP
Idade (anos)	$23,4 \pm 4,8$
Altura (m)	$1,80 \pm 0,06$
Peso (kg)	$76,9 \pm 13,4$
IMC (kg/m ²)	$23,7 \pm 3,5$
% gordura corporal	$15,3 \pm 4,9$
VO_{2max} (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	$50,9 \pm 5,2$
Velocidade máxima (km/h)	$15,8 \pm 0,9$

DP – desvio padrão

Os participantes praticavam atividade física moderada ou vigorosa aproximadamente 4 vezes por semana, durante 7 horas por semana. As atividades mais praticadas eram: musculação (n=8), corrida (n=4), rugby (n=3) e golfe (n=3), além de bicicleta (n=2), futebol (n=1), natação (n=1) e boxe (n=1).

De acordo com os exames bioquímicos, todos os indivíduos eram saudáveis e não apresentavam nenhum problema de saúde que pudesse interferir nos

marcadores de estresse oxidativo e antioxidantes. Apenas 2 indivíduos apresentaram valores inadequados de HDL-colesterol, os outros parâmetros bioquímicos estavam adequados para todos eles. Os valores médios e desvios padrão dos exames bioquímicos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores médios e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos

EXAMES BIOQUÍMICOS	MÉDIA ± DP	VALORES DE REFERÊNCIA ¹
Hemoglobina (g/dl)	15,19 ± 0,87	13 a 18
Hematócrito (%)	45,62 ± 2,29	37 a 50
Ferro sérico (µg/dl)	125,23 ± 34,85	65 a 170
Glicose (mg/dl)	82,54 ± 7,11	70 a 99
Creatinina (mg/dl)	0,96 ± 0,17	< 1,3
Uréia (mg/dl)	30,38 ± 4,15	15 a 45
Triglicérides (mg/dl)	86,54 ± 19,31	10 – 19 anos: < 130 Adultos: < 150
Colesterol total (mg/dl)	138,08 ± 31,11	Até 19 anos: < 170 Adultos: < 200
LDL-colesterol (mg/dl)	79 ± 21,3	≤ 130
HDL-colesterol (mg/dl)	45 ± 7,93	35 a 55

DP – desvio padrão; LDL – *Low Density Lipoproteins*; HDL – *High Density Lipoproteins*

¹ Valores de referência utilizados pelo Laboratório Médico Dr. Maricondi (São Carlos)

Nenhum dos indivíduos fazia uso de suplementos de vitaminas e/ou minerais antioxidantes. Apenas 3 deles (23,08%) fazia uso de suplemento alimentar, destes, 2 ingeriam suplemento protéico e o outro associação de proteína e carboidrato. Dos indivíduos que não faziam uso de suplemento 61,54% (n=8) já ingeriram alguma vez.

5.2 Exercício exaustivo – Duração, intensidade e variações fisiológicas:

Não houve diferença estatisticamente significativa na duração do exercício exaustivo ($p=0,369$). Com uso de vitamina C o exercício durou em média $41,62 \pm 1,01$ minutos e com uso de placebo teve duração média de $41,96 \pm 1,41$ minutos. As intensidades inicial e final do exercício foram iguais independentes da intervenção (Tabela 3).

As variações fisiológicas: frequência cardíaca, percepção subjetiva do esforço e lactato, monitoradas durante os protocolos de exercício exaustivo, não foram estatisticamente diferentes com uso de vitamina C. Nas duas fases houve aumento estatisticamente significativo de frequência cardíaca ($p<0,0005$) e de lactato ($p<0,0005$) no final do exercício (Tabela 3). O esforço no final do exercício foi apontado pelos participantes como exaustivo em ambas as fases.

Tabela 3 – Valores médios e desvios padrão da intensidade, duração e variáveis fisiológicas do exercício exaustivo em ambas as fases.

VARIÁVIES	PLACEBO		VITAMINA C	
	Início exercício	Final exercício	Início exercício	Final exercício
Velocidade (km/h)	$11,19 \pm 1,05$	$13,77 \pm 1,30$	$11,12 \pm 1,02$	$14,08 \pm 0,64$
Duração exercício (min)	-	$41,96 \pm 1,41$	-	$41,62 \pm 1,01$
	Repouso	Final exercício	Repouso	Final exercício
Frequência cardíaca (bpm)	$71,69 \pm 14,65$	$188,58 \pm 10,77^*$	$68,92 \pm 13,17$	$187,17 \pm 10,13^*$
Lactato (mmol/l)	$1,41 \pm 0,78$	$7,04 \pm 3,01^*$	$1,50 \pm 0,97$	$7,50 \pm 4,03^*$
	5 minutos	Final exercício	5 minutos	Final exercício
Escala de percepção de Borg	$8,31 \pm 2,06$	$19,25 \pm 1,6$	$9 \pm 2,20$	$19,62 \pm 0,65$

* Diferença estatisticamente significativa para o repouso ($p<0,0005$).
Escala de Borg: 8 muito fácil; 9 fácil; 19 exaustivo.

5.3 Consumo alimentar:

Dos 13 participantes do estudo apenas 2 relataram fazer dieta (15,38%), o objetivo era reeducação alimentar, um com orientação de amigo e outro seguindo seus próprios conceitos.

Para avaliação do consumo alimentar foram considerados apenas 12 dos 13 indivíduos, uma vez que 1 dos participantes não fez todos os registros alimentares solicitados, e por isso foi excluído da análise de dieta.

O consumo de vitamina C foi adequado para a maior parte dos indivíduos (58,33%, $n=7$) nas 2 fases; enquanto, os 5 indivíduos restantes apresentaram consumo insuficiente, abaixo da EAR. Todos os indivíduos apresentaram consumo insuficiente de vitamina A em ambas as fases.

Em relação aos macronutrientes a maioria dos indivíduos (75%, $n=9$) apresentou consumo adequado de carboidrato nas 2 fases. O consumo de lipídeos esteve dentro da faixa de normalidade para 11 indivíduos (91,66%) na fase placebo e para 10 dos indivíduos (83,33%) na fase vitamina C. Todos os indivíduos apresentaram consumo adequado de proteína nas 2 fases. O consumo de fibra foi abaixo da Ingestão Adequada (AI) para todos os indivíduos nas 2 fases e o consumo de colesterol foi acima do recomendado para 75% ($n=9$) dos indivíduos na fase placebo e 66,67% ($n=8$) na fase vitamina C. O consumo calórico estava adequado para a maioria dos indivíduos (75%), em função do IMC apenas 1 indivíduo apresentou ingestão insuficiente de energia e outros 2 ingestão excessiva.

Na Tabela 4 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.

Os indivíduos apresentaram consumo alimentar similar nas 2 fases do estudo. O consumo dos antioxidantes, vitamina C e vitamina A, assim como o consumo calórico, de carboidratos, proteínas, lipídeos, fibras e colesterol não foram significativamente diferentes ($p>0,05$) entre as fases (Tabela 5). Sendo assim, realmente houve uma padronização alimentar nos 7 dias que antecederam ambas as fases.

Tabela 4 – Número (percentual) de indivíduos com consumo adequado de energia, macronutrientes e micronutrientes nas diferentes fases do estudo

NUTRIENTES	PLACEBO	VITAMINA C
Calorias (kcal)	9 (75%)	9 (75%)
Carboidrato (%)	9 (75%)	9 (75%)
Colesterol (mg)	3 (25%)	4 (33,33%)
Lipídeo (%)	11 (91,66%)	10 (83,33%)
Proteína (%)	12 (100%)	12 (100%)
Vitamina A (µg)	0 (0%)	0 (0%)
Vitamina C (mg)	7 (58,33%)	7 (58,33%)

Tabela 5 – Valores médios do consumo de energia, macronutrientes e micronutrientes nas 2 fases do estudo.

NUTRIENTES	PLACEBO	VITAMINA C	REFERÊNCIAS
Calorias (kcal)	2460,86 ± 418,93	2456,19 ± 627,40	¹
Carboidrato (%VCT)	49,43 ± 5,87	49,59 ± 8,58	45-65% VCT ²
Proteína (%VCT)	19,48 ± 3,45	18,95 ± 4,07	10-35% VCT ²
Lipídeo (%VCT)	28,38 ± 4,55	27,65 ± 5,05	20-35% VCT ²
Colesterol (mg)	367,80 ± 121,46	373,49 ± 155,52	<300mg/d ²
Fibras (g)	20,56 ± 4,81	20,74 ± 7,72	38g/d ²
Vitamina C (mg) *	129,94 ± 148,86	130,42 ± 102,98	75-90mg/d ²
Vitamina A (µg)	242,12 ± 102,79	271,49 ± 108,89	900µg/d ²

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 PADOVANI et al. Dietary Reference Intakes: Aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais, 2006.

% VCT – porcentagem do valor calórico total

* Vitamina C representa o consumo habitual, sem a adição de vitamina C pelo estudo.

5.4 Estresse oxidativo e antioxidantes:

5.4.1 Adequação dos valores basais:

Em relação ao ácido ascórbico, 6 indivíduos na fase placebo e 3 na fase vitamina C apresentaram valores abaixo da normalidade. Já o α -tocoferol estava inadequado, abaixo dos valores normais, para a maioria dos indivíduos em ambas as fases (10 na fase placebo e 13 na fase vitamina C). Ao contrário do retinol, que estava dentro dos limites desejáveis para a maioria dos indivíduos, porém 8 indivíduos na fase placebo e 1 na fase vitamina C apresentaram valores acima da normalidade. O ácido úrico também foi adequado para a maioria dos indivíduos nas 2 fases, apenas na fase placebo 1 indivíduo apresentou valor abaixo da normalidade e outro acima.

Em relação aos marcadores indiretos de estresse oxidativo, o marcador de lesão hepática, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), estava adequado para todos os indivíduos nas 2 fases. Já os marcadores de lesão celular creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH), estavam acima da normalidade para respectivamente, 5 indivíduos nas duas fases, e para 2 indivíduos na fase placebo e 4 na fase vitamina C.

Como não existem valores de referência para Glutathiona Reduzida (GSH), Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP), Capacidade Antioxidante Total (CAT), Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), Malonaldeído (MDA), Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos pela Oxidação do Ferro em Xilenol Laranja (FOX), Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas (AOPP) e Proteínas Carboniladas (PC), não foi possível analisar suas adequações.

Os valores basais médios dos marcadores de estresse oxidativo e antioxidantes estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores médios basais (antes do exercício) e desvios padrão dos antioxidantes e biomarcadores de estresse oxidativo.

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	PLACEBO	VITAMINA C	VALORES DE REFERÊNCIA
Ácido ascórbico (mg/dl)	0,63 ± 0,29	0,82 ± 0,36	0,6 a 2,0 ¹
α-tocoferol (μmol/L)	14,65 ± 3,20*	10,38 ± 2,55**	18 a 29 ¹
Retinol (μmol/L)	1,91 ± 0,41*	1,13 ± 0,38**	0,35 a 1,75 ¹
Ácido úrico (mg/dl)	5,07 ± 1,34	4,29 ± 0,98	2,5 a 7 ²
TGO (U/L)	24,23 ± 7,41	26,54 ± 7,32	11 a 39 ²
LDH (U/L)	395,00 ± 95,14	426,67 ± 137,63	200 a 480 ²
CK (U/L)	186,85 ± 118,51	180,15 ± 97,43	15 a 18 anos: 34 a 147 ² >18 anos: 26 a 189
TBARS (nmol/gPtn)	12,24 ± 4,56*	33,91 ± 12,98**	#
MDA (nmol/gPtn)	104,26 ± 28,58*	56,31 ± 12,98**	#
FOX (μmol/gPtn)	0,15 ± 0,10	0,09 ± 0,05	#
GSH (μmol/gPtn)	8,87 ± 1,14*	3,68 ± 0,82**	#
PC (μmol/mgPtn)	0,27 ± 0,06*	0,22 ± 0,02**	#
AOPP (μmol/L)	11,91 ± 4,41	12,10 ± 3,59	#
CAT (μmol/L)	2,00 ± 0,84	2,04 ± 0,68	#
FRAP (mmol/L)	0,82 ± 0,13*	1,16 ± 0,13**	#

¹YOUNG, D.S. Implementation of SI Units for Clinical Laboratory Data: Style Specifications and Conversion Tables, 1987

²Valores de referência utilizados pela Laboratório Médico Dr.Maricondi (São Carlos)

não possui valor de referência

(*) em números diferentes indicam diferença estatística entre as fases (p<0,05).

5.4.2 Comparação entre as fases:

5.4.2.1 Antioxidantes:

Em resposta ao exercício exaustivo e as diferentes intervenções, uso de vitamina C ou placebo, os antioxidantes séricos se comportaram da seguinte maneira (Figuras 3 e 4):

- **α -tocoferol:** ocorreu uma interação estatisticamente significativa entre tempo e intervenção na concentração de α -tocoferol, $F(5,60)=23,350$, $p<0,0005$, $\eta^2=0,661$. Desta forma o comportamento desta variável foi diferente dependendo da intervenção. Com uso de suplemento de vitamina C os indivíduos apresentaram menores concentrações séricas de α -tocoferol até 2 horas após o exercício em relação ao uso de placebo ($p<0,05$) e a concentração se manteve praticamente estável até 24 horas após o exercício exaustivo. Enquanto que com uso de placebo houve um aumento da concentração de α -tocoferol logo após o exercício (15,41%, $p=0,015$), uma diminuição logo em seguida, até que 4 horas após o exercício as concentrações são menores que antes do exercício (- 31,45%, $p<0,0005$).

- **Retinol:** ocorreu uma interação significativa entre tempo e intervenção na concentração de retinol, $F(5,60)=15,907$, $p<0,0005$, $\eta^2=0,570$. Por isso o retinol sérico também apresenta resposta diferente de acordo com a intervenção. Com uso de suplemento de vitamina C os indivíduos iniciam o exercício com menores concentrações séricas de retinol e permanecem assim até 2 horas após ($p<0,05$), a partir de 4 horas após o exercício até 24 horas após os valores de retinol tornam-se semelhantes aos da fase placebo. Na fase vitamina C o exercício não modificou as concentrações séricas de retinol por 24 horas, enquanto na fase placebo, a concentração de retinol não se altera imediatamente após o exercício, mas começa a diminuir 1 hora após (-11,26%, $p=0,017$), e atinge o menor valor 24h após o exercício (- 29,74%, $p=0,003$).

- **Ácido ascórbico:** ocorreu interação significativa entre tempo e intervenção na concentração de ácido ascórbico sérico, $F(5,60)=5,075$, $p=0,001$, $\eta^2=0,297$, ou seja, a resposta é diferente de acordo com a intervenção. Com uso de vitamina C as concentrações séricas de ácido ascórbico são maiores em relação ao placebo nos

momentos logo após o exercício, 1, 2 e 4 horas após ($p<0,005$). Na fase vitamina C houve uma tendência de aumento de ácido ascórbico logo após o exercício (8,5%) e 1 hora após (31,14%), e ocorreu uma redução significativa das concentrações 24 horas após o exercício (-41,61%, $p<0,05$). Com uso de placebo houve uma redução das concentrações de ácido ascórbico 2 horas após o exercício (-44,84%, $p<0,009$). Após 24 horas do exercício exaustivo as concentrações são iguais independente da intervenção.

Figura 3 – Cinética das concentrações plasmáticas médias e desvios-padrões das vitaminas antioxidantes, α-tocoferol, Retinol e Ácido ascórbico durante uso de placebo e suplemento de vitamina C.

* Diferença entre intervenções ($p<0,05$); † Diferença para momento pré ($p<0,05$); ‡ Diferença para momento pós ($p<0,05$); § Diferença para 1h ($p<0,05$); ¶ Diferença para 2h ($p<0,05$); I Diferença para 4h ($p<0,05$).

- **Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP):** houve interação significativa entre tempo e intervenção na concentração de FRAP, $F(5,60)=30,583$, $p<0,0005$, $\eta^2=0,718$, assim ocorrem diferentes respostas de acordo com a intervenção. Com uso de vitamina C a concentração de FRAP se mantém constante, sem mudança com o exercício exaustivo, e é maior que com uso de placebo até 4

horas após o exercício. Neste momento, na fase placebo, ocorre um aumento dos níveis séricos de FRAP (53,18%, $p<0,0005$), e as concentrações se igualam nas diferentes intervenções.

- **Capacidade antioxidante total (CAT):** como não houve interação entre tempo e intervenção, $F(5,60)=1,889$, $p=0,110$, $n^2=0,136$, a CAT se comportou de maneira semelhante independente da intervenção. Nem o exercício exaustivo, nem o uso de suplemento de vitamina C influenciaram na capacidade antioxidante total. As concentrações séricas de CAT se mantiveram estáveis até 24 horas após o exercício nas 2 fases, as quais apresentaram concentrações séricas semelhantes, exceto 1h após o exercício.

- **Glutathiona reduzida (GSH):** houve interação significativa entre tempo e intervenção na concentração de GSH, $F(5,60)=6,369$, $p<0,0005$, $n^2=0,347$, de modo que a resposta é diferente de acordo com a intervenção. Com uso de vitamina C as concentrações séricas de GSH são menores que com uso de placebo ($p<0,0005$). Enquanto na fase placebo o GSH se mantém estável, na fase vitamina C o GSH é consumido de 2 horas até 4 horas após o exercício ($p<0,05$), mas 24 horas após o exercício as concentrações séricas já retomam aos níveis pré exercício.

- **Ácido úrico:** apresenta respostas iguais independente da intervenção, já que não houve interação entre tempo e intervenção, $F(5,60)=2,060$, $p=0,083$, $n^2=0,147$. Apesar disso as concentrações são menores com uso de vitamina C logo após o exercício ($p=0,025$) e 4 horas após ($p=0,013$), nos outros momentos as concentrações não apresentam diferenças estatística. No grupo placebo houve uma tendência de aumento 1 hora após o exercício mas logo voltou aos valores iniciais.

Figura 4 – Cinética das concentrações plasmáticas médias e desvios-padrões dos antioxidantes, poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), capacidade antioxidante total (CAT), glutatona reduzida (GSH) e ácido úrico, durante uso de placebo e suplemento de vitamina C.

* Diferença entre intervenções ($p < 0,05$); † Diferença para momento pré ($p < 0,05$); ‡ Diferença para momento pós ($p < 0,05$); § Diferença para 1h ($p < 0,05$); ¶ Diferença para 2h ($p < 0,05$); I Diferença para 4h ($p < 0,05$).

5.4.2.2 Marcadores de peroxidação lipídica:

Os marcadores de **peroxidação lipídica** se comportaram da seguinte maneira (Figura 5):

- **Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):** como não houve interação entre tempo e intervenção na concentração de TBARS, $F(2,563, 30,750) = 2,028$, $p = 0,087$, $\eta^2 = 0,145$, a resposta foi igual independente da intervenção. Houve uma tendência de diminuição de TBARS após o exercício em ambas as fases, mas a redução foi realmente significativa apenas 4 horas após o exercício ($p < 0,05$), sendo uma redução de 46,57% na fase placebo e uma redução de 39,99% na fase vitamina C. A concentração foi sempre superior quando os indivíduos foram suplementados com vitamina C ($p < 0,0005$), mas não houve aumento após o exercício em nenhuma das intervenções.

- **Malonaldeído (MDA):** houve interação entre tempo e intervenção na concentração de MDA, $F(5,60)=6,032$, $p<0,0005$, $\eta^2=0,335$, por isso a resposta é diferente de acordo com a intervenção. Com uso de vitamina C, os valores são menores que com uso de placebo ($p<0,01$), e ocorre uma redução da concentração sérica 2 horas após o exercício (-48,08%, $p<0,0005$) que se mantém até 24 horas após (-42,30%, $p=0,007$). Enquanto com uso de placebo ocorre uma diminuição de MDA logo após o exercício (-18,21%, $p=0,013$), que continua diminuindo até 24 horas após (-65,08%, $p<0,0005$), neste momento as concentrações de MDA se igualam entre as fases.

- **Determinação de hidroperóxidos lipídicos pela oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX):** apesar da concentração de FOX aumentar logo após o exercício (76,61%, $p=0,027$) e 2 horas após (62,47%, $p=0,031$) em relação a antes do exercício apenas para intervenção vitamina C, estas alterações não foram suficientes para mostrar interação entre tempo e intervenção, $F(5,60)=1,854$, $p=0,116$, $\eta^2=0,134$. As concentrações de FOX são semelhantes em ambas as fases, em todos os momentos. A grande variabilidade pode ter sido responsável pela não diferença estatística entre as intervenções.

Figura 5 – Cinética das concentrações plasmáticas médias e desvios-padrões dos marcadores de peroxidação lipídica: Substâncias reativas ao ácido tiobabítúrico (TBARS), Malonaldeído (MDA) e Determinação de hidroperóxidos lipídicos pela oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX), durante uso de placebo e suplemento de vitamina C.

* Diferença entre intervenções ($p < 0,05$); † Diferença para momento pré ($p < 0,05$); ‡ Diferença para momento pós ($p < 0,05$); § Diferença para 1h ($p < 0,05$); ¶ Diferença para 2h ($p < 0,05$); I Diferença para 4h ($p < 0,05$).

5.4.2.3 Marcador de oxidação protéica:

Os marcadores de oxidação protéica se comportam da seguinte maneira (Figura 6):

- **Produtos avançados de oxidação de proteínas (AOPP):** já que não houve interação entre tempo e intervenção, $F(5,60)=0,656$, $p=0,658$, $n^2=0,052$, a resposta é igual independente da intervenção. As concentrações são semelhantes nas 2 fases e se comportam de maneira estável ao longo de todo o tempo.

- **Proteínas carboniladas (PC):** houve interação entre tempo e intervenção, $F(5,60)=2,726$, $p=0,030$, $n^2=0,214$, por isso as concentrações séricas de proteínas carboniladas têm uma resposta diferente de acordo com a intervenção. Com uso de suplemento de vitamina C não houve variação das concentrações séricas até 24 horas após o exercício. Já com o uso de placebo houve uma redução das

concentrações 2 horas após o exercício (-21,65%, $p=0,045$), e 4 horas após já retomam aos níveis pré exercício. Com uso de placebo as concentrações de proteínas carboniladas foram maiores antes do exercício ($p=0,08$) e 4 horas após ($p=0,001$).

Figura 6 – Cinética das concentrações plasmáticas médias e desvios-padrões dos marcadores de oxidação protéica, Produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) e Proteínas carboniladas (PC), durante uso de placebo e suplemento de vitamina C.

* Diferença entre intervenções ($p<0,05$); † Diferença para momento pré ($p<0,05$); ‡ Diferença para momento pós ($p<0,05$); § Diferença para 1h ($p<0,05$); ¶ Diferença para 2h ($p<0,05$); ‖ Diferença para 4h ($p<0,05$).

5.4.2.4 Marcadores de lesão hepática e tecidual:

O marcador de lesão hepática, **Transaminase Glutâmico-oxalacética** (TGO), também se comportou de maneira igual independente da intervenção, já que não houve interação entre tempo e intervenção em suas concentrações, $F(2,380, 28,566)=0,352$, $p=0,742$, $\eta^2=0,029$. Em todos os momentos, antes e depois do exercício, as concentrações foram iguais nas 2 fases, ocorrendo um aumento, de 30,79% na fase placebo e 25,22% na fase vitamina C, logo após o exercício ($p<0,05$). Duas horas após o exercício as concentrações de TGO já retomam aos valores pré exercício ($p<0,05$) (Figura 7). Da mesma maneira o marcador de lesão muscular, **creatina-quinase** (CK) teve resposta semelhante independente da intervenção, já que não ocorreu interação entre tempo e intervenção, $F(1,384, 16,607)=0,778$, $p=0,431$, $\eta^2=0,061$. Houve aumento logo após o exercício ($p<0,05$) que se manteve até 24 horas após ($p<0,05$), e as concentrações de CK são iguais entre as intervenções em todos os momentos (Figura 7). A **Lactato desidrogenase**

(LDH), marcador de dano tecidual, também se comporta de maneira igual independente da intervenção, uma vez que não houve interação entre tempo e intervenção na sua concentração, $F(5,60)=0,925$, $p=0,471$, $\eta^2=0,072$, a qual foi semelhante entre as 2 fases. O aumento após o exercício não teve diferença significativa, apenas 24 horas após o exercício que observa-se uma redução em relação a logo após o exercício ($p<0,05$) (Figura 7).

Figura 7 – Cinética das concentrações plasmáticas médias e desvios-padrões dos marcadores de lesão hepática (Transaminase Glutâmico-oxalacética - TGO), dano muscular (creatina quinase - CK) e dano tecidual (Lactato desidrogenase - LDH) durante uso de placebo e suplemento de vitamina C.

* Diferença entre intervenções ($p<0,05$); † Diferença para momento pré ($p<0,05$); ‡ Diferença para momento pós ($p<0,05$); § Diferença para 1h ($p<0,05$); ¶ Diferença para 2h ($p<0,05$); I Diferença para 4h ($p<0,05$).

Os valores médios e desvios padrão dos antioxidantes e biomarcadores de estresse oxidativo em todos os momentos e nas 2 fases do estudo estão apresentados no Anexo D.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Estresse oxidativo tem sido descrito em resposta ao exercício físico exaustivo, sugerindo que os mecanismos normais de defesa do corpo podem ser insuficientes para lidar adequadamente com o aumento da produção de EROs (GOLDFARB, 2005). Apesar de ocorrer um aumento das defesas antioxidantes com o EO e treinamento físico, esse aumento pode não ser proporcional às necessidades criadas pela quantidade de eventos pro oxidantes, e assim afetar o requerimento de antioxidantes na dieta (TAULER et al., 2003). A realização de exercícios regulares e a suplementação com micronutrientes antioxidantes exógenos tem sido propostos na tentativa de reduzir a formação de EROs e subsequentemente a oxidação de macromoléculas (BLOOMER; GOLDFARB; MCKENZIE, 2006).

Muitos indivíduos fisicamente ativos fazem o uso de suplementos antioxidantes acreditando que serão beneficiados, porém muitas vezes sem orientação adequada e ainda sem necessidade. O consumo de suplementos alimentares causa preocupação, já que geralmente os consumidores utilizam estas substâncias em doses muito acima do recomendável (BARROS NETO, 2001). A falta de um consenso em relação à efetividade dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica induzida pelo exercício e a popularidade dos suplementos antioxidantes na comunidade fisicamente ativa faz desta uma importante área de pesquisa (NAKHOSTIN-ROOHI et al., 2008). No presente estudo, nenhum dos indivíduos fazia uso de suplementos de vitaminas e/ou minerais antioxidantes. Estes indivíduos possuíam de bom a excelente nível de aptidão física, já que a média do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) foi $50,94 \pm 5,22 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2000; COOPER, 1968). Além disso, de acordo com os exames bioquímicos, todos os indivíduos eram saudáveis e não apresentavam nenhum problema de saúde que pudesse interferir nos marcadores de estresse oxidativo e antioxidantes.

As duas fases do estudo foram homogêneas. Independente da intervenção, o exercício físico exaustivo realizado apresentou intensidade e duração similares. As variáveis fisiológicas: frequência cardíaca, lactato sanguíneo e percepção do esforço também foram iguais nas 2 fases, houve um aumento tanto da frequência cardíaca, como dos valores de lactato no final do exercício. De acordo com Goldfarb et al. (2005) a suplementação de vitamina C em homens saudáveis e bem nutridos não

altera a frequência cardíaca, consumo de oxigênio e o lactato sanguíneo em resposta ao exercício.

O consumo alimentar de vitamina C pelos sujeitos é outra variável que confunde os resultados (GOLDFARB et al., 2005). No presente estudo o consumo alimentar nos 7 dias que antecederam a realização do protocolo de exercício exaustivo foi igual nas 2 fases, tanto para a vitamina C, obtida através da alimentação, como para o consumo calórico, de carboidratos, proteínas, lipídeos, fibras, colesterol e vitamina A. Sendo assim, a variável consumo alimentar habitual de vitamina C não interfere nos resultados do estudo.

Alterações do status antioxidante podem ser relacionadas a deficiências específicas resultante de um consumo alimentar inadequado e desbalanceado. 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). Ainda os efeitos de suplementos antioxidantes parecem ser somente exibidos quando o status nutricional é deficiente (MARGARITIS, ROUSSEAU, 2008).

No presente estudo os valores séricos de ácido ascórbico estavam inadequados para 6 indivíduos (46,15%) na fase placebo e 3 (23,07%) na fase suplemento, não houve diferença significativa entre as fases. Sendo que o consumo alimentar habitual de vitamina C, sem considerar a adição de suplemento, foi adequado para 58,3% (n=7) dos indivíduos em cada uma das fases. Vale ressaltar que o consumo médio de vitamina C foi acima da RDA nas 2 fases, porém mesmo com o uso adicional de vitamina C, através de suplemento alimentar, o consumo não foi maior que os limites máximos recomendados (UL), que variam de 1800 a 2000mg por dia para os indivíduos do presente estudo (PADOVANI et al., 2006).

Apesar do consumo de vitamina A ser inadequado para todos os indivíduos, nenhum deles apresentou níveis séricos basais de retinol menor que o adequado em nenhuma das fases. Porém na fase placebo os valores séricos basais de retinol eram maiores que na fase suplemento. O consumo de vitamina E não foi avaliado, porém os níveis séricos de α -tocoferol foram inadequados para a maioria dos indivíduos na fase placebo (n=10) e para todos os indivíduos na fase suplemento, os valores séricos também eram maiores na fase placebo em relação a fase suplemento. Deve ser ressaltado que a qualidade dos dados de alguns antioxidantes, como o conteúdo de carotenoides dos alimentos é considerada

limitada (ROSSEAU et al., 2004), por isso existe uma dificuldade em afirmar a deficiência no consumo alimentar de alguns micronutrientes e fazer a correlação com seus níveis séricos. O ácido úrico basal foi adequado para a maioria dos indivíduos nas 2 fases, sem diferença entre elas.

Considerando os níveis séricos basais de ácido ascórbico, retinol, α -tocoferol e ácido úrico, pode-se dizer que o status antioxidante dos indivíduos do presente estudo era parcialmente deficiente, já que a maioria dos indivíduos apresentavam valores inadequados de α -tocoferol, alguns deles quantidades inadequadas de ácido ascórbico, porém a maioria apresentou valores adequados de retinol e ácido úrico.

Considerando o protocolo de exercício realizado no presente estudo pode-se dizer que foi realmente exaustivo, já que os valores de lactato no final do exercício eram maiores que 4 mmol/L e indicam que os indivíduos pararam por um desequilíbrio ácido base (GOODWIN et al., 2007). De acordo com a percepção de esforço, no final do exercício, todos os indivíduos o apontaram como exaustivo.

Ainda o protocolo de exercício utilizado resultou em dano muscular e injúria de células hepáticas, já que houve aumento dos valores de creatina quinase (CK) e transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), respectivamente, logo após o exercício (CHEVION et al., 2003), mostrando a característica exaustiva do exercício. Apesar de haver um aumento da lactato desidrogenase (LDH) em ambas as fases, esse aumento não foi significativo. Chevion et al (2003) também observaram aumento de TGO e CK após corrida de 50 e 80 km, e os valores de CK não retomaram aos valores basais antes da outra corrida, aproximadamente 2 semanas após. O dano muscular leva a perda de integridade da membrana da célula e consequente liberação de proteína intracelular para o sangue (CHEVION et al., 2003), que servem como marcadores indiretos de estresse oxidativo, uma vez que a peroxidação lipídica induz a dano de membrana celular, permitindo a liberação de substâncias intracelulares para a circulação (BLOOMER, 2008; FINAUD; LAC; FILARE, 2006).

A creatina quinase também serve como indicador direto de severidade do exercício, altos níveis de CK no plasma refletem a intensidade do programa (CHEVION et al., 2003). Já que não houve diferença nos níveis de CK entre as fases podemos dizer mais uma vez que a intensidade do protocolo de exercício exaustivo foi semelhante nas 2 fases do estudo. E ainda, que o consumo adicional de vitamina C 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).

Comparando os efeitos do uso adicional de vitamina C em relação à fase placebo, nos marcadores diretos e indiretos do estresse oxidativo, pode-se perceber que as duas fases foram capazes de conter a produção de radicais livres. Na fase suplemento de vitamina C quem fez esse papel foram as maiores concentrações séricas de ácido ascórbico, enquanto na fase placebo houve o recrutamento de outros antioxidantes endógenos: α -tocoferol, retinol e GSH, que estavam em maiores concentrações no sangue. E assim 24 horas após o exercício exaustivo há semelhante grau de estresse oxidativo em ambas as fases. Segundo Bouzid et al. (2014) o aumento dos níveis de antioxidantes permite eliminar o aumento da produção de radicais livres. E de acordo com Michailidis et al. (2007) momentos de necessidades podem ajudar a manter ou então aumentar os antioxidantes séricos.

Dessa maneira, os níveis circulantes de antioxidantes podem ajudar na avaliação do estresse oxidativo. Em condições de estresse, como durante o exercício físico, aumento na circulação de antioxidantes pode resultar de uma maior liberação de estoques teciduais, os quais por sua vez podem poupar a supressão (eliminação) e utilização de outros componentes de defesa antioxidante (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). A indução gradativa do próprio estresse oxidativo representa o método mais eficaz de aumentar a concentração de antioxidantes corporais (FINAUD, LAC, FILAIRE, 2006; PETRY et al., 2010).

De acordo com Michailidis et al. (2007) o tempo de coleta da amostra após o exercício pode levar a diferentes conclusões em relação as respostas do EO induzido pelo exercício. É bem possível que ao coletar uma única amostra após sessão aguda de exercício, a geração de EROs e oxidação associada a macromoléculas poderiam ser desperdiçadas, seja por tomar as amostras muito tarde ou por não esperar o tempo suficiente para geração secundária de EROs e associada oxidação (BLOOMER, 2008). Michailidis et al. (2007) observaram uma mudança não uniforme nos marcadores de estresse oxidativo, tanto mudanças transitórias como mudanças prolongadas. Segundo eles, coleta de amostras de sangue até 4 horas após o exercício deve ser suficiente para satisfazer a descrição das mudanças em EO após exercício exaustivo de moderada duração (~50 minutos) realizado por homens não treinados. Não há um melhor tempo aplicado para todos

os marcadores, e sim, um tempo ótimo após o exercício para coleta de sangue no qual a maior magnitude de mudança poderia ser notada: imediatamente após o exercício para catalase, 1 hora após para TBARS, 2 horas após para CAT, GSH e GSSG (Glutathione Oxidada), e 4 horas após para PC. Por isso no presente estudo foram feitas coletas seriadas de sangue, de modo que todas as alterações nos biomarcadores de EO pudessem ser observadas, já que cada marcador tem uma alteração em um tempo específico. No entanto, de acordo com Michailidis et al. (2008), a maioria dos estudos coletam amostras de sangue apenas imediatamente após o exercício ou até alguns momentos logo após o exercício. Ainda nenhum ensaio pode representar com precisão todo o processo de oxidação nas células, haja vista, que algumas investigações demonstram aumento em certos biomarcadores, sem alterações em outros, e as vezes uma diminuição em outros. Dessa forma, o ideal é incluir ensaio específico para a oxidação de várias macromoléculas, levando a uma melhor compreensão do estresse oxidativo geral (BLOOMER, 2008), assim como foi feito no presente estudo.

O que se observou no presente estudo é que o uso de suplemento de vitamina C favoreceu maiores níveis séricos de ácido ascórbico em relação ao placebo logo depois do exercício até 4 horas após, e por isso poupou a eliminação dos outros antioxidantes, α -tocoferol e retinol, que estavam em menores concentrações séricas até 2 horas após o exercício, e do GSH, que se manteve em menores concentrações até 24 horas após. Enquanto com uso de placebo, já que os níveis de ácido ascórbico eram menores, houve uma maior liberação destes outros antioxidantes, e o α -tocoferol e retinol começaram a ser consumidos 1 hora após o exercício, para combater os radicais livres formados, até 24 horas após. Vinte e quatro horas após o exercício exaustivo os valores de ácido ascórbico retomam aos valores basais e se igualam entre as fases, assim como os valores de retinol também se igualam. Segundo Cruzat et al. (2007) as reservas de vitamina C e vitamina E parecem ser mobilizadas na tentativa de reduzir o estresse oxidativo promovido pelas EROs. Ao mesmo tempo, um aumento das concentrações de antioxidantes não enzimáticos é um mecanismo característico do processo de adaptação ao treinamento.

De acordo com o presente estudo, Goldfarb et al. (2005) também encontraram aumento da **vitamina C** sérica com uso de 0,5 g e 1 g de suplemento de vitamina C em relação ao placebo. Em outro estudo, a suplementação aguda de

1000 mg de vitamina C, 2 horas antes do exercício, levou ao aumento das concentrações séricas dessa vitamina antes e depois de 30 minutos de corrida a 75% do VO_{2max} (NAKHOSTIN-ROOHI et al., 2008). Ainda, concordando com os achados do presente estudo, Nakhostin-Roohi et al. (2008) observaram um início de declínio dos níveis de ácido ascórbico 2 horas após o exercício, com retomada dos valores basais 24 horas após. De acordo com estes autores as concentrações plasmáticas de ácido ascórbico, 2 horas após o uso de suplemento de vitamina C, eram similares as reportadas seguindo várias semanas de suplementação, sugerindo que os níveis plasmáticos de vitamina C respondem rapidamente a suplementação, e por isso suplementação prolongada seria desnecessária.

De acordo com Peake (2003) geralmente ocorre aumento de ácido ascórbico circulante nas horas seguintes ao exercício e um declínio abaixo dos níveis pré-exercício alguns dias após. No presente estudo 24 horas após o exercício os valores de ácido ascórbico não eram menores que os níveis de antes do exercício em nenhuma das fases. Mas o que podemos observar é que quanto maiores os níveis circulantes de ácido ascórbico logo após o exercício provavelmente menores serão os valores nos momentos seguintes de recuperação após o exercício, indicando que o ácido ascórbico foi bastante utilizado. Ou seja, quando há muita vitamina C disponível o organismo usa preferencialmente este antioxidante para combater o estresse oxidativo, mobilizando de modo mais discreto outros elementos do sistema antioxidante.

Khassaf et al. (2003) observaram que a suplementação de 500 mg por dia de vitamina C durante 8 semanas, aumentou as concentrações de vitamina C sérica em aproximadamente 50%. No presente estudo os valores basais de ácido ascórbico, antes do exercício, foram maiores na fase suplemento, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). Isto pode ser consequência do fato de os sujeitos terem parado de tomar o suplemento de vitamina C um dia antes do exercício, e de acordo com Goldfarb et al. (2005) isso pode reduzir a vitamina C da circulação. Apesar disso, ocorre um depósito da vitamina C suplementada que começa a ser liberada após o exercício para combater os radicais livres formados.

De acordo com Tauler et al. (2003) o EO induzido pelo exercício ocorre principalmente nos momentos logo após o exercício, já que observaram uma redução nos níveis plasmáticos de ácido ascórbico durante o curto período de recuperação. Eles ainda concluem que maiores níveis plasmáticos de ácido

ascórbico podem produzir uma mobilização mais rápida e mais efetiva e um consumo eficaz de ácido ascórbico contra os efeitos do EO.

Segundo Bloomer et al. (2006), o uso de um complexo antioxidante (1 g vitamina C + 400 IU vitamina E) por 2 semanas elevou as concentrações séricas de ácido ascórbico e vitamina E, porém enquanto os níveis de vitamina C retomam ao basal após 1 semana sem uso do suplemento, os níveis de vitamina E se mantem elevados, já após 30 minutos de corrida a 80% VO_{2max} não há modificação dos valores séricos de vitamina C, enquanto há uma discreta redução nos níveis de vitamina E, mas não há diferença entre os grupos. Além disso, estudos anteriores mostraram diminuição de antioxidantes plasmáticos após exercício aeróbico crônico e agudo, assim como nenhuma mudança ou aumento nas concentrações plasmáticas de antioxidantes com exercício aeróbico agudo. Embora existam discrepâncias nos achados, é importante manter em mente que mudanças nos níveis sanguíneos destes antioxidantes só são sugestivas de equilíbrio de oxidação e redução celular. Por isso é necessário cautela quanto interpretar mudanças nos antioxidantes plasmáticos após exercício agudo (BLOOMER et al, 2006).

Segundo Muñoz et al. (2010) a **vitamina E** parece ser mobilizada de estoques teciduais apenas quando outro sistema antioxidante não é capaz de neutralizar as EROs. No presente estudo o uso de vitamina C poupou o uso de α -tocoferol, já que as concentrações séricas foram praticamente constantes nas 24 horas de recuperação. Enquanto com uso placebo o α -tocoferol foi utilizado para combater a formação de radicais livres após o exercício, visto que houve um aumento logo após o exercício e a partir de 1 hora após uma redução das suas concentrações séricas, sendo que 24 horas depois do exercício exaustivo os valores séricos de α -tocoferol são menores que os valores pré-exercício. Sendo assim, o α -tocoferol se comporta da mesma maneira que o ácido ascórbico, quanto maior os valores séricos de α -tocoferol antes do exercício, maior deve ser a sua diminuição ao longo de 24 horas, mostrando que ele foi consumido. 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).

Segundo Margaritis e Rousseau (2008) a integridade da célula muscular requer um status adequado de vitamina E, e quanto maior a intensidade do treino

maior as concentrações plasmáticas de α -tocoferol, já que o exercício mobiliza mais esse antioxidante. Por isso altos valores basais de α -tocoferol podem ser algumas vezes associados com altos índices de dano oxidativo. Com o treino aeróbio bem dirigido, o aumento das concentrações plasmáticas de α -tocoferol não é tão visível (MARGARITIS, ROUSSEAU, 2008). No presente estudo a maioria dos indivíduos apresentou valores séricos basais de vitamina E inadequados, talvez por isso tenha ocorrido uma maior mobilização tecidual desse antioxidante com o exercício exaustivo na fase placebo, quando os indivíduos não possuíam maiores níveis séricos de outro antioxidante, o ácido ascórbico.

Aguiló et al. (2005) observaram um discreto aumento de α -tocoferol após 171km de ciclismo, uma redução abaixo dos valores basais 3h após o exercício e uma retomada aos valores basais no dia seguinte. Em relação as concentrações de retinol não observaram mudanças nos níveis plasmáticos com o exercício exaustivo. Eles descreveram que o aumento do α -tocoferol no plasma pode ser devido a mobilização de estoques teciduais para a circulação plasmática, assim como ocorreu no presente estudo na fase placebo, e que a diminuição após 3 horas de recuperação pode indicar um consumo efetivo desta vitamina antioxidante a fim de defender os componentes celulares dos efeitos nocivos do estresse oxidativo.

Discordando dos achados do presente estudo, Tauler et al. (2003) não observaram modificações nos níveis de vitamina E após duatlon (10 km de corrida, 40 km de bicicleta e mais 5 km de corrida) e os níveis foram semelhantes entres os grupos placebo e o suplementado com vitamina C. O que se deve ressaltar é que os níveis plasmáticos de vitamina E estavam dentro da faixa de normalidade para pessoas saudáveis em todos os indivíduos que participaram do estudo de Tauler et al. (2003), enquanto no presente estudo a maioria dos indivíduos apresentaram valores inadequados de vitamina E. Ou seja, no estudo de Tauler et al. (2003) não ocorre alteração nos níveis de vitamina E pois os indivíduos já possuíam quantidades suficientes deste antioxidante, enquanto no presente estudo, na fase placebo, ocorre uma mobilização tecidual na tentativa de aumentar os valores séricos de α -tocoferol, que eram inadequados, para combater os radicais livres formados.

Em relação aos níveis de vitamina A, o que Margaritis e Rousseau (2008) descrevem é que durante treinamento de sobrecarga e/ou inabitual, as concentrações plasmáticas de beta caroteno permanecem baixas durante a fase de

recuperação. Corroborando os achados do presente estudo, no qual ocorre uma redução dos níveis de retinol após 1 hora de recuperação na fase em que os indivíduos receberam placebo, enquanto na fase que receberam suplemento de vitamina C os níveis séricos de retinol não modificaram, já que as maiores concentrações de ácido ascórbico se incumbiram de combater os radicais livres formados. Ainda, de acordo com Margaritis e Rousseau (2008), quanto menor a concentração de carotenóides no plasma, maior os marcadores de peroxidação lipídica, o que não está de acordo com o presente estudo, que apesar de ter níveis reduzidos de retinol no período de recuperação, não apresentou aumento nos marcadores de peroxidação lipídica após o exercício.

Em relação à **glutathione reduzida (GSH)**, Michailidis et al. (2007) descrevem que após exercício físico exaustivo ocorre consumo de GSH, com menores valores 2 horas após o exercício e retomada dos valores de repouso 24 horas após. Goldfarb et al. (2005) também observaram redução de GSH após 30 minutos de corrida à 75-80% VO_{2max} , independente do uso de vitamina C. No presente estudo a suplementação de vitamina C também não evitou que ocorresse a oxidação de GSH após exercício exaustivo, já que houve uma redução 2 horas após o exercício, com retomada dos níveis 24 horas após. Enquanto na fase placebo não houve consumo de GSH, já que os níveis séricos se mantem constante. Michailidis et al. (2007) utilizaram indivíduos menos ativos que os indivíduos do presente estudo, o que pode explicar a discrepância dos resultados de GSH em resposta a um semelhante protocolo de exercício exaustivo, sem considerar a suplementação de vitamina C. Indivíduos treinados respondem diferentemente ao EO induzido por uma carga aguda de exercício comparado com indivíduos não treinados (MICHAILIDIS et al., 2007).

Porém, em relação à fase placebo, a fase vitamina C apresentou valores menores de GSH desde o repouso até 24 horas após o exercício, representando que o uso de suplemento de vitamina C pode ter favorecido uma menor liberação de GSH de estoques teciduais para o sangue, já que o ácido ascórbico estava presente em maiores concentrações, demandando uma menor utilização da glutathione. O menor consumo de GSH pode nos mostrar uma redução da magnitude do aumento de estresse oxidativo (BLOOMER et al., 2005), mas a interpretação dos seus valores é controversa pois é um antioxidante endógeno que pode ser oxidado, mas os mesmo tempo sintetizado pelo organismo.

A redução de GSH sérico não é só atribuída à sua oxidação (geração de glutathiona oxidada - GSSG), visto que Michailidis et al. (2007) observaram uma diminuição em 63% de GSH e um aumento de apenas 38% de GSSG, 2 horas após o exercício. Sendo assim, uma pequena parte da diminuição de GSH pode ser atribuída a oxidação em GSSG, onde GSH é usado contra os radicais livres e consumido para regenerar ácido ascórbico e α -tocoferol (MICHAILIDIS et al., 2007).

Alguns resultados sugerem que a suplementação de vitamina C não tem nenhum efeito no sistema glutathiona em resposta ao exercício, e que talvez a absorção e distribuição de vitamina C *in vivo* possam ser fatores a serem considerados para explicar porque a glutathiona não é protegida (Goldfarb et al., 2005), discordando do presente estudo que mostra que o uso adicional de vitamina C poupa a liberação de GSH endógeno.

As medidas séricas de **poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)** e a **capacidade antioxidante total (CAT)** também são parâmetros para a avaliação da capacidade antioxidante. No presente estudo o FRAP se comportou de maneira diferente de acordo com a intervenção, na fase em que os indivíduos receberam suplemento de vitamina C ele foi maior e se comportou de maneira constante, ou seja, os indivíduos conseguiram manter uma capacidade antioxidante maior e estável durante as 24 horas de recuperação, após exercício exaustivo, devido o uso adicional de vitamina C. Já na fase placebo os indivíduos apresentaram uma menor capacidade antioxidante, medida pelo FRAP, até 4 horas após o exercício, quando então ocorre um aumento e as concentrações de FRAP se igualam a da fase suplemento de vitamina C.

Em contrapartida a capacidade antioxidante total (CAT) e o **ácido úrico** não alteraram em resposta a suplementação de vitamina C e nem com o exercício físico exaustivo, se mantiveram estáveis até 24 horas após o exercício. O uso do ácido úrico parece estar sendo poupado por outros antioxidantes nas duas fases.

Quando Michailidis et al. (2007) avaliam o comportamento da capacidade antioxidante com o exercício exaustivo, através da CAT, eles observam um aumento significativo imediatamente após o exercício, com pico 2 horas após, e manutenção por 3 horas, quando então ocorre um declínio e os valores retomam aos níveis pré exercício. No presente estudo o uso de vitamina C favoreceu que os indivíduos tivessem uma capacidade antioxidante maior desde antes do exercício, medida pela FRAP, porém pela CAT, não há diferença em relação à fase placebo.

O aumento de CAT no sangue após exercício agudo sugere que há uma ativação das defesas antioxidantes do corpo. A mobilização de reservas de antioxidantes teciduais para o plasma, como por exemplo, o ácido úrico, é provavelmente um mecanismo responsável por aumento da CAT após o exercício (Michailidis et al., 2007). Sendo assim, uma possível explicação para o não aumento da CAT no presente estudo, é que as concentrações de ácido úrico também se mantiveram estáveis, uma vez que a presença de outros antioxidantes no soro, como vitamina C, vitamina A e vitamina E poupam sua eliminação dos tecidos para o sangue. Segundo Finaud, Lac e Filaire (2006) o aumento de ácido úrico no plasma ocorre para compensar a depleção de outros antioxidantes. O que se deve observar também, é que há uma grande variabilidade dos dados, e um desvio padrão grande nos valores da CAT, e isso pode ser responsável pela não diferença estatística entre as intervenções.

Apesar de não haver aumento da CAT, no presente estudo, as maiores concentrações dos antioxidantes, vitamina C na fase suplemento e vitaminas E e A na fase placebo, foram capazes de conter a peroxidação lipídica e oxidação protéica, evitar a oxidação de GSH na fase placebo e favorecer menor liberação tecidual de GSH na fase suplemento, devido uma menor dependência da glutathione como antioxidante enógeno. Enquanto no estudo de Michailidis et al. (2007), apesar de ocorrer aumento de CAT, esse aumento não foi suficiente para inibir o aumento da oxidação de glutathione, lipídeo e proteína.

Nakhostin-Roohi et al. (2008) observaram aumento da CAT logo após 30 minutos de corrida a 75% VO_{2max} , tanto no grupo placebo como no grupo suplementado com 1000 mg de vitamina C 2 horas antes do exercício. Porém no grupo placebo ocorre uma redução significativa da CAT 24 horas após o exercício em relação aos valores de antes do exercício, enquanto no grupo suplementado, a CAT que já apresentou um aumento depois da suplementação, se mantém elevada até 2 horas após o exercício e retoma aos valores basais depois de 24 horas. Apesar de não ter nenhuma diferença significativa entre os grupos, eles enfatizam que estes resultados mostram os efeitos benéficos da suplementação de vitamina C.

Discordando dos nossos achados, Aguiló et al. (2005) relataram um aumento nas concentrações plasmáticas de ácido úrico após exercício exaustivo (171 km de bicicleta), independente de ter ocorrido um aumento no antioxidante α -tocoferol, e esse aumento foi mantido até 3 horas de recuperação. Este aumento de ácido úrico

pode ter ocorrido já que o exercício exaustivo foi de longa duração, diferente do presente estudo. Ao mesmo tempo Aguiló et al. (2005) observaram um aumento discreto de α -tocoferol, que pode não ter sido suficiente para poupar a eliminação de ácido úrico, que também precisou agir na tentativa de melhorar o sistema antioxidante em defesa da produção de EROs.

Tauler et al. (2003) observaram uma resposta diferente do ácido úrico de acordo com o uso de vitamina C, no grupo controle houve aumento de 37% nas concentrações de ácido úrico após duatlon (10 km de corrida, 40 km de bicicleta e mais 5 km de corrida), enquanto no grupo que consumia 7 vezes mais vitamina C esse aumento não foi significativo. Por isso Tauler et al. (2003) descrevem que o aumento de ácido úrico depende dos níveis de ácido ascórbico no plasma antes do exercício, uma vez que ácido úrico não aumentou no grupo suplementado, ao contrário do grupo controle. Como no presente estudo os níveis de ácido ascórbico antes do exercício são iguais não ocorre aumento de ácido úrico após exercício exaustivo em nenhuma das fases, independente do uso adicional de vitamina C.

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 MDA e 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 após 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 (BLOOMER et al., 2005). 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). Há algumas ressalvas sobre a validade do método TBARS em detectar a peroxidação lipídica *in vivo*, porque o ensaio TBARS não é específico ao malonaldeído, ao mesmo tempo que a peroxidação lipídica não é fonte exclusiva de MDA (BLOOMER, 2008; VOLLAARD; SHEARMAN; COOPER, 2005).

Na presente pesquisa, como marcadores de peroxidação lipídica foram analisados **TBARS, MDA e FOX**. De acordo com a intervenção, uso de suplemento de vitamina C ou placebo, o MDA apresentou uma resposta diferente, enquanto TBARS e FOX tiveram comportamentos semelhantes. Em relação ao MDA, houve uma redução após o exercício exaustivo em ambas as fases, o que sugere que os antioxidantes presentes foram capazes de conter a peroxidação lipídica, porém com o uso de vitamina C o grau de peroxidação lipídica foi sempre menor, exceto 24 horas após o exercício, quando os níveis de MDA se igualam entre as fases. Ao contrário do MDA, as TBARS, que também reduziram 4h após o exercício, estiveram sempre em maiores concentrações com o uso de suplemento de vitamina C. Já a FOX, apesar de ter um aumento logo após o exercício quando os indivíduos fizeram uso adicional de vitamina C, não foi diferente entre as fases. É importante salientar que o MDA é um composto intermediário de peroxidação lipídica relativamente estável, enquanto a formação de TBARS é bastante inespecífica (LAMPRECHT et al., 2004).

Michailidis et al. (2007), utilizaram protocolo de exercício exaustivo semelhante ao do presente estudo, eles observaram aumento de TBARS após exercício, com pico 1 hora após e retomada os valores pré exercício 4 horas depois, o exercício teve duração média de 51,4 minutos e os indivíduos eram homens não treinados que realizavam atividade física de baixa a moderada intensidade no máximo 3 vezes por semana. Já no presente estudo não houve aumento de TBARS após o exercício exaustivo em nenhuma das fases, e a duração média do exercício foi de 41 minutos e os indivíduos eram praticantes de atividade física de moderada a vigorosa intensidade em média 4x/semana. A divergência de resultados pode ser devido à diferença de métodos empregados para avaliar as TBARS, a duração do exercício, além da eficiência do sistema antioxidante. Os indivíduos do presente estudo podem ter uma maior proteção antioxidante, devido a adaptação do sistema de defesa antioxidante em resposta a uma maior produção de radicais livres, uma vez que praticavam exercícios de maior intensidade e com maior frequência (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Goldfarb et al. (2005) não encontraram mudanças nas concentrações de TBARS após 30 minutos de corrida à 75-80% VO_{2max} , nem com uso de 500 mg por dia e 1000 mg por dia de suplemento de vitamina C, por 2 semanas. Ou seja, o uso adicional de vitamina C não influenciou na resposta das TBARS, e apesar das

concentrações de TBARS parecerem menores quando foi feito o uso de suplemento, essa diferença não foi significativa. Estes autores fizeram apenas a dosagem logo após o exercício, talvez se tivessem sido feitas mais coletas de sangue, alguma redução em TBARS poderia ter sido detectada. Da mesma forma, Peake, Suzuki e Coombes (2007) não encontraram modificações dos níveis de MDA após exercício, nem com 1000 mg de vitamina C por dia durante 1 semana, nem com 400 mg por dia durante 3 dias. Já Alessio, Goldfarb e Cao (1997) suplementaram os sujeitos com 1 g de vitamina C por 1 dia ou 2 semanas, e reportaram uma modesta atenuação nas TBARS plasmáticas em resposta a um exercício mais intenso, 30 minutos de corrida a 80% VO_{2max} . Os indivíduos eram fisicamente ativos, mas não eram atletas.

O uso de suplementação aguda de 1000 mg de vitamina C foi capaz de conter a peroxidação lipídica, avaliada pelo MDA, após 30 minutos de corrida a 75% do VO_{2max} , já que no grupo placebo houve aumento de MDA 2 horas após o exercício em relação a antes do exercício. Apesar disso não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos. De acordo com Nakhostin-Roohi et al. (2008) uma potencial explicação é que as defesas antioxidantes dos sujeitos do estudo eram inadequadas, uma vez que apresentavam valores basais de vitamina C baixos, e portanto a disponibilidade de vitamina C após a suplementação ofereceu benefício adicional. No presente estudo os benefícios da suplementação adicional de vitamina C são as concentrações mais baixas de MDA desde antes do exercício, pois não houve aumento de MDA após o exercício mesmo com uso de placebo, e isto pode ser consequência das quantidades adequadas de ácido ascórbico no soro para a maior parte dos indivíduos. Segundo Nakhostin-Roohi et al. (2008), indivíduos ativos parecem exibir melhor status de vitamina C que as pessoas menos ativas. Ainda Nakhostin-Roohi et al. (2008) descrevem que é provável que, antes da suplementação com vitamina C o estoque de vitamina C dos sujeitos não era suficiente para saturar a maioria dos compartimentos corporais. E assim eles concluem que a suplementação de vitamina C tem sido capaz de promover o sistema antioxidante e inibir a peroxidação lipídica.

De acordo com Bloomer et al. (2006) os valores de MDA não foram afetados nem por 30 minutos de corrida a 80% VO_{2max} , nem pelo uso de suplemento antioxidante (1 g vitamina C + 400 UI vitamina E) ou uso de suco concentrado de frutas e legumes. Os valores de MDA permaneceram relativamente estáveis.

Estudos anteriores sugerem que os marcadores de MDA podem ser afetados pela duração e intensidade do exercício. Contudo, nem todos os estudos tem demonstrado aumento com exercícios nestas variáveis. Bloomer et al. (2006) reportam que a combinação de vitamina C e E tem pouco impacto no MDA, e enquanto a vitamina E pode agir para suprimir a peroxidação lipídica, a vitamina C isoladamente parece não ter essa capacidade. De acordo com estes autores, pode não ter ocorrido modificações em MDA, já que estes indivíduos são treinados aerobicamente de forma moderada e por isso podem ter melhor proteção antioxidante, pelo aumento das defesas antioxidantes, assim como foi observado no presente estudo. Para eles, outra possível explicação é a duração do exercício, algumas investigações tem reportado aumento da peroxidação lipídica seguindo exercício de intensidade semelhante a que eles utilizaram, porém de longa duração. Talvez se a duração do exercício do presente estudo, assim como do estudo de Bloomer et al. (2006) tivesse sido maior, um aumento da oxidação de lipídeos pudesse ter ocorrido, porém como dito anteriormente o status antioxidante dos indivíduos do presente estudo, assim como o nível de aptidão física, podem ter sido os responsáveis pelo não aumento da peroxidação lipídica após exercício exaustivo.

Muñoz et al. (2010) reportaram que o aumento no consumo de oxigênio a valores máximos pode resultar em maiores níveis de MDA, no entanto, apesar de os indivíduos do presente trabalho serem expostos a um protocolo exaustivo, não apresentaram aumento dos níveis de MDA, uma vez que o VO_2 atingido foi submáximo. Sendo assim, o que se deve destacar é que o tipo e intensidade do exercício assim como a dose de vitamina C utilizada podem variar a resposta da peroxidação lipídica.

A **oxidação protéica** foi avaliada pela dosagem de **AOPP e PC**. Não houve aumento de oxidação protéica com protocolo de exercício exaustivo em nenhuma das fases. Porém, enquanto a AOPP tem concentrações iguais independente da intervenção, e se comporta de maneira estável até 24 horas após o exercício, as PC, que também permanecem praticamente estáveis, estão em menores concentrações quando se faz o uso de suplemento de vitamina C. Ou seja, o uso de suplemento de vitamina C favoreceu menores níveis de oxidação protéica, avaliada pelas PC, independente do exercício. Na literatura o conteúdo de proteínas carboniladas é o marcador de oxidação protéica mais amplamente utilizado, talvez porque pareça

fornecer uma avaliação global da carga suportada na célula em consequência do EO (BLOOMER, 2008).

Michailidis et al. (2007), observaram um aumento de PC após protocolo de exercício exaustivo, com pico 4 horas após e retorno ao basal em 24 horas. Alguns estudos referem que o aumento da oxidação protéica parece ocorrer em resposta a exercício que cause dano muscular (Goldfarb et al., 2005) e exercícios de longa duração (Michailidis et al., 2007). No presente estudo houve dano muscular, porém sem aumento da oxidação protéica, enquanto Goldfarb et al. (2005) reportaram maior oxidação protéica após exercício sem significativo dano muscular. O nível de aptidão física dos sujeitos do presente estudo e a adaptação do sistema de defesa antioxidante (aumento da produção de antioxidantes endógenos e/ou diminuição da geração de radicais livres), assim como a curta duração do protocolo do exercício exaustivo podem ter favorecido para que não houvesse aumento da oxidação protéica, apesar de significativo dano muscular e exercício de alta intensidade. Outra possível explicação para as não modificações na oxidação protéica é que a proteína sofre constante turnover dentro do corpo humano, e algum dano devido as EROs poderia não resultar em acúmulo significativo de proteínas estruturais modificadas (BLOOMER, 2008).

Goldfarb et al. (2005) que observaram aumento de PC após corrida à 75-80% VO_{2max} , sem significativo dano muscular, reportaram uma atenuação, dose dependente, dessa oxidação protéica com o uso de suplemento de vitamina C, sendo que a ingestão diária de 1000 mg de vitamina C favoreceu uma menor oxidação protéica que 500 mg de vitamina C. Apesar da suplementação de vitamina C não prevenir completamente a oxidação protéica em resposta ao exercício, ela reduziu o grau de oxidação após o exercício.

De acordo com Bloomer et al. (2006), tanto o uso de 1 g de vitamina C + 400 IU de vitamina E como o consumo de suco em pó cocentrado de frutas e legumes (12500 IU vitamina A, 1081 IU vitamina E, 276 mg vitamina C) por 14 dias apresentaram resultados similares em relação as PC para indivíduos fisicamente ativos. Houve uma atenuação do aumento de PC após 30 minutos de corrida a 80% VO_{2max} após 2 semanas de suplementação e uso de suco, e essa superexatção de PC foi mantida após 1 semana sem a suplementação e uso do suco, quando comparados com o grupo placebo. Como vitaminas C e E estavam em maiores concentrações séricas no grupo que foi suplementado em relação ao grupo que

ingeriu o suco concentrado, é possível que outros antioxidantes tenham agido para proteger contra as EROs produzidas durante o exercício aeróbico agudo. Talvez fitonutrientes dentro do suco possam ter servido de proteção. O que estes autores destacam é que apesar dos indivíduos apresentarem consumo adequado dos micronutrientes antioxidantes (vitamina C, E e A), os antioxidantes adicionais parecem necessários para suprimir a oxidação protéica. Estes autores ainda sugerem que embora o uso de altas doses de vitamina C + E isoladas possam ser benéficas, efeitos similares podem ser visto com menores concentrações destas vitaminas quando consumidas como parte de um suco em pó concentrado de frutas e legumes. Fitonutrientes, incluindo polifenóis e carotenóides como a luteína e licopeno, em conjunto com as vitaminas C e E, podem trabalhar sinergicamente para proteger macromoléculas da oxidação de proteínas. Merece atenção os achados de que a suplementação com um suco concentrado de frutas e legumes pode oferecer proteção contra o EO induzido pelo exercício de maneira similar a altas doses de vitamina C e E. Especialmente por conta de estudos que sugerem efeitos adversos para saúde da suplementação de vitamina E em altas doses e longa duração, prática esta que é feita rotineiramente (BLOOMER et al., 2006).

Os marcadores de lesão muscular (**creatina quinase – CK**), lesão hepática (**transaminase glutâmico-oxalacética – TGO**) e dano tecidual (**lactato desidrogenase – LDH**), servem como marcadores indiretos 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 para a circulação (BLOOMER, 2008; 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). No presente estudo estes marcadores, CK, TGO e LDH, se comportaram de maneira igual com ou sem o uso de suplemento de vitamina C. Após exercício houve aumento de lesão hepática e muscular, sendo que a lesão hepática é restaurada após 1 hora de recuperação e a lesão muscular se mantém 24 horas após o exercício, concordando com Cruzat et al. (2007), que relatam que o pico de atividade de CK é usualmente mantido entre 24 e 72 horas após o exercício.

Após 30 minutos de corrida à 75% do VO_{2max} , Nakhostin-Roohi et al. (2008) também observaram aumento nas concentrações séricas de CK, tanto no grupo que

recebeu 1000 mg de vitamina C 2 horas antes do exercício, como no grupo placebo. Porém a CK permaneceu elevada até 24 horas após o exercício apenas no grupo placebo, discordando dos achados do presente estudo. Por isso eles concluem que a suplementação aguda de vitamina C foi capaz de recuperar o dano muscular 24 horas após o exercício, e a causa deste efeito é provavelmente devido a inibição da peroxidação lipídica que ocorreu no grupo suplementado. Essa divergência pode ter ocorrido já que o exercício utilizado no presente estudo foi exaustivo, e por isso pode ter resultado em maior dano muscular e recuperação mais lenta. O uso de complexo antioxidante em triatletas não beneficiou o dano muscular (MARGARITIS et al., 2003). Já de acordo com Palazzetti et al. (2004), a suplementação do mesmo complexo antioxidante induziu a uma redução do aumento de CK após atividade.

No presente estudo o extravasamento de proteínas intracelulares após exercício exaustivo ocorreu sem que houvesse aumento da peroxidação lipídica após exercício. Bouzid et al. (2014) apesar de encontrar uma significativa correlação entre os biomarcadores de lesão muscular e MDA no grupo idoso, observaram ausência de correlação entre os marcadores de lesão muscular e peroxidação lipídica no grupo jovem, e atribuíram essa ausência de correlação à uma melhor defesa antioxidante, que pode reduzir a peroxidação lipídica pela eliminação dos radicais livres produzidos durante o exercício. Esta resposta adaptativa do sistema antioxidante também pode ter ocorrido com os participantes do presente estudo, já que eram indivíduos fisicamente ativos e podem ter se beneficiado da super regulação dos sistemas de defesa antioxidantes (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009; NIESS; SIMON, 2007). De acordo com Gomez-Cabrera, Domenech e Viña (2008) o aumento do consumo de antioxidantes pode prevenir alguns danos musculares, que são devido a produção de radicais livres, no entanto, no presente estudo, a suplementação de vitamina C não modificou as concentrações de TGO, CK e LDH, e não impediu que ocorresse a lesão hepática e muscular, em resposta ao exercício exaustivo.

Tauler et al. (2003) avaliaram os níveis de LDH após competição de duatlon, e observaram 168% de aumento de LDH após o exercício, com retomada aos níveis basais logo após, enquanto no grupo que recebeu suplemento de vitamina C não houve modificação dos níveis circulantes de LDH, isto reflete um maior grau de lise celular no grupo controle, e um efeito protetor da vitamina C em prevenir o dano de membrana e liberação de LDH de eritrócitos e de outros tecidos na presença de EO.

Há achados contraditórios da relação entre a suplementação de vitamina C e seu potencial papel antioxidante benéfico em reduzir o estresse oxidativo induzido pelo exercício. Em parte porque as doses do suplemento têm variado de estudo para estudo e porque a intensidade do exercício não tem sido controlada (GOLFARB et al., 2005). Ainda possíveis razões para estas inconsistências incluem: diferenças no tipo, duração e intensidade do exercício, assim como variações nas metodologias utilizadas para avaliar os biomarcadores de EO (NAKHOSTIN-ROOHI et al, 2008), tempo de coleta das amostras de sangue (MICHAILIDIS et al, 2007), diferenças no nível de aptidão dos sujeitos (treinado versus não treinado) (AGUILÓ et al, 2005) e status nutricional (MARGARITIS, ROUSSEAU, 2008).

No presente estudo é possível que o consumo alimentar habitual médio de vitamina C acima das RDA, sem a suplementação adicional, possa ter atenuado a resposta do EO induzido pelo exercício exaustivo na fase placebo. No entanto Goldfarb et al. (2005) observaram que apesar dos indivíduos também apresentarem um consumo de vitamina C maior que a RDA, eles não estavam adequadamente protegidos sem a adição de vitamina C, já que tiveram maior oxidação protéica e aumento da glutatona oxidada (GSSG) após o exercício. Os níveis séricos de antioxidantes destes indivíduos podem ser inadequados, já que é limitada a qualidade dos dados de alguns antioxidantes apresentados pelas tabelas de composição química de alimentos e por isso a elevada ingestão pode ser apenas aparente (ROSSEAU et al., 2004).

Ainda, no presente estudo, o exercício extenuante pode não ter resultado em aumento significativo de EO porque os indivíduos eram praticantes regulares de atividade física e possuíam de bom a excelente nível de aptidão física. Segundo Nikolaidis et al. (2012) esta participação regular pode estar associada com uma regulação positiva na defesa antioxidante, servindo para proporcionar proteção contra o aumento de radicais livres induzidos pelo exercício, apresentando mínimos benefícios com o uso adicional de vitamina C. Segundo Bloomer et al. (2007) a intensificação dos mecanismos de defesa antioxidante, devido a adaptações associadas a repetida carga de treino já estão presentes em homens treinados, por isso, adaptações adicionais resultantes de um novo estímulo podem ser mínimas. De acordo com Draeger et al. (2014) o exercício é capaz de aumentar a capacidade antioxidante do músculo esquelético e potencializar a ação dos antioxidantes endógenos. No presente estudo o uso de suplemento de vitamina C não influenciou

essa resposta adaptativa, concordando com os achados de Nikolaidis et al. (2012), ao mesmo tempo que apresentou benefícios adicionais às adaptações positivas do sistema de defesa antioxidante endógeno. Deve ser notado que não medimos EO em tecido muscular, por isso é possível que possa ter ocorrido EO no músculo apesar de mudanças mínimas nos marcadores do sangue.

Porém a análise do risco benefício surge em evidência a um risco da ingestão de antioxidantes acima das necessidades nutricionais, um suposto prejuízo aos efeitos adaptativos do sistema antioxidante endógeno e um desconhecido risco em longo prazo. Margaritis e Rousseau (2008) afirmam, por outro lado, que a manutenção de um status nutricional antioxidante adequado é essencial para o processo de adaptação e pode ser alcançado por uma dieta alimentar variada e equilibrada, adaptada às necessidades específicas, com a ingestão de alimentos de alta densidade de micronutrientes. Por isso, uma alternativa segura e eficaz para atenuar o EO induzido pelo exercício, pode ser uma dieta balanceada com quantidades recomendadas de antioxidantes (DRAEGER et al, 2014).

A ação combinada de vários compostos derivados de uma dieta rica em frutas e legumes não pode ser substituída pela suplementação de um único antioxidante ou uma combinação deles (MARGARITIS, ROUSSEAU, 2008). De acordo com Alam, Bristi e Rafiquzzamanl (2013) a proteção antioxidante pode ser reforçada por uma ampla ingestão de antioxidantes na dieta ao invés de uso individual de um único antioxidante. As combinações de antioxidantes podem ser de grande importância para prevenir ou adiar as doenças degenerativas e melhoria da qualidade de vida. Segundo Nikolaidis et al. (2012) não deve ser recomendada uma ingestão permanente de doses não fisiológicas de vitamina C e/ou E para indivíduos saudáveis, uma vez que os resultados ainda são conflitantes. Porém isto não deve ser confundido com uma alta ingestão de frutas e legumes, que é considerada benéfica.

Os efeitos da suplementação antioxidante são principalmente visíveis quando os sujeitos são inicialmente deficientes em antioxidantes ou quando a ingestão alimentar de antioxidante é limitada. Por isso a relação entre o consumo de antioxidantes exógenos e efeitos do treinamento requer a vinculação da interpretação de dados biológicos para cada caso individual. Porém os dados disponíveis ainda não permitem definir o consumo ideal de antioxidantes que protegeria a sobrecarga de exercício (MARGARITIS, ROUSSEAU, 2008). Apesar de

a suplementação ter pouco ou nenhum efeito, a redução de seus estoques teciduais corporais pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo (CRUZAT et al., 2007).

Algumas limitações deste estudo devem ser consideradas. A primeira é não ter sido feita a análise do estresse oxidativo e antioxidantes no músculo, tecido que é muito utilizado durante o exercício, e pode fornecer resultados mais precisos do que os resultados no soro. Porém a necessidade de realização de biópsia muscular se torna difícil uma vez que a amostra é composta por humanos. A segunda limitação foi o programa de avaliação de dieta utilizado, o qual não permite que os registros alimentares adicionados uma vez sejam reutilizados para nova análise, utilizando diferentes tabelas de composição de alimentos, para avaliação de diferentes nutrientes. Se isso fosse possível poderia ter sido analisado o consumo de outros micronutrientes antioxidantes, como selênio, zinco e vitamina E.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O exercício exaustivo utilizado no presente estudo foi capaz de alterar vários parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo nos protocolos experimentais utilizados. O uso de 500 mg de vitamina C, através de suplemento alimentar, por 7 dias antes de exercício exaustivo, em indivíduos fisicamente ativos, apresenta como vantagens: a maior proteção antioxidante desde o início do exercício até 4 horas após, avaliada pelo FRAP, com maiores níveis séricos de ácido ascórbico, o menor grau de peroxidação lipídica, avaliado pelo MDA, menor grau de oxidação protéica, avaliado pelas PC, e a menor dependência do GSH como antioxidante endógeno. Além disso, altos níveis plasmáticos de ácido ascórbico podem produzir uma mobilização rápida e mais efetiva desse antioxidante contra os efeitos do estresse oxidativo, poupando a vitamina E assim como a glutatona reduzida. Sem o uso adicional de vitamina C, as defesas antioxidantes endógenas foram capazes de conter o aumento da produção de EROs, como observado pelos maiores níveis séricos de α -tocoferol, retinol e GSH, que não permitiram o aumento da peroxidação lipídica e oxidação protéica após o exercício, porém ao longo do tempo esta maior utilização do sistema antioxidante pode levar a uma depleção das reservas destes nutrientes. Vale ressaltar que estes indivíduos são praticantes regulares de exercício físico, de moderada a vigorosa intensidade, e apresentam no geral um adequado status antioxidante e nutricional.

Considerando os efeitos adversos do uso inadequado de suplementos alimentares e as quantidades excessivas utilizadas, geralmente muito acima do recomendável, o ideal é manter uma alimentação equilibrada diariamente para obtenção de um status nutricional e antioxidante adequados, para que o indivíduo possa estar pronto para se proteger de alterações na produção de EROs resultantes de um exercício exaustivo. Mas reafirmamos que os resultados do presente estudo mostram que o uso de uma dose modesta de vitamina C, por um curto período de tempo, foi capaz de auxiliar na proteção antioxidante, sem nenhum efeito danoso aos indivíduos.

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.
- AGUILÓ, A. et al. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. **Physiology & Behavior**, v. 84, p. 1-7, 2005.
- ALAM, N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.
- ALESSIO, H. M. et al. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Medicine Science Sports Exercise**, v. 32, p. 1576-1581, 2000.
- ALESSIO, H.M.; GOLDFARB, A.H.; CAO, G. Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. **International Journal of Sports Nutrition**, v. 7, p. 1-9, 1997.
- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. **ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription**. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- ANDERSTAM, B. et al. Modification of the oxidative stress biomarker AOPP assay: Application in uremic samples. **Clinica Chimica Acta**, v. 393, p. 114-118, 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.
- BENTLEY, D.J.; NEWELL, J.; BISHOP, D. Incremental exercise test design and analysis: implications for performance diagnostics in endurance athletes. **Sports Medicine**, v. 37, p.575-586, 2007.
- BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, jul, 1996.

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

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. et al. Plasma protein carbonyl response to increasing exercise duration in aerobically trained men and women. **International Journal of Sports Medicine**, v. 28, p. 21-25, 2007.

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. Prior exercise and antioxidant supplementation: effect on oxidative stress and muscle injury. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 4, p. 9, 2007.

BOUZID, M. A. et al. Changes in Oxidative Stress Markers and Biological Markers of Muscle Injury with Aging at Rest and in Response to an Exhaustive Exercise. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

BORG, G. A. Psychophysical bases of perceived exertion. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 14, p.377-381, 1982.

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.

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

COOPER, K. H. A means of assessing maximal oxygen uptake. **Journal of the American Medical Association**, v. 203, p. 201-204, 1968.

COSTA, C.M.; SANTOS, R.C.C.; LIMA, E.S. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, outubro, v. 42, n. 5, p. 345-350, 2006.

CRUZAT, V.F. et al. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niterói, v. 13, n. 5, 2007.

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

D'ANTONA, G. **Nutritional Interventions as Potential Strategy to Minimize Exercise-Induced Muscle Injuries in Sports**. Set, 2013. Cap 2, p. 63-93 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/56590>. Acesso em: 10 dez. 2014.

DILL, B.D.; Costill, D.L. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. **Journal of Applied Physiology**, v. 37, p. 247-248, 1974.

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.

DRAEGER, C. L. et al. Controversies of antioxidant vitamins supplementation in exercise: ergogenic or ergolytic effects in humans? **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, p.4, 2014.

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.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 277-285, 2007.

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

FERNÁNDEZ, J.M. et al. A dose of fructose induces oxidative stress during endurance and strength exercise. **Journal of Sports Sciences**, v. 27, n. 12, p. 1323-1334, October, 2009.

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.

FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 86, p. 6377-6381, 1989.

GERARD-MONNIER, D. et al. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 1176–1183, 1998.

GOLDFARB, A.H. et al. Effects of a Fruit/Berry/Vegetable Supplement on Muscle Function and Oxidative Stress. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, aug. 2010.

GOLDFARB, A.H. et al. Vitamin C Supplementation Affects Oxidative-Stress Blood Markers in Response to a 30-Minute Run at 75% VO₂max. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 15, p. 279-290, 2005.

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.

GOODWIN, M.L. et al. Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 1, p. 558-569, 2007.

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.

KHASSAF, M. et al. Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. **Physiology**, v. 549, n. 2, p. 645-652, 2003.

LAMPRECHT, M. et al. Analytical Aspects of Oxidatively Modified Substances in Sports and Exercises. **Nutrition**, v. 20, n. 7/8, 2004.

LEVINE, M. et al. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 93, p. 3704-3709, 1996.

LEVINE, R.L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methodos Enzymol**, v. 186, p. 446-479, 1990.

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

MATSUDO, S. et al. Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ): Estudo de Validade e Reprodutibilidade no Brasil. **Revista Atividade Física e Saúde**, v. 6 n. 2, p. 5-18, 2001.

MICHAILIDIS, Y.A.Z. et al. Sampling Time is Crucial for Measurement of Aerobic Exercise-Induced Oxidative Stress. **Medicine Science Sports Exercise**, v. 39, n. 7, p. 1107-1113, 2007.

NAKHOSTIN-ROOHI, B. et al. Effect of vitamin C supplementation on lipid peroxidation, muscle damage and inflammation after 30-min exercise at 75% VO₂max. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 48, n. 2, p. 217-224, jun. 2008.

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.

NIKOLAIDIS, M. G. et al Does Vitamin C and E Supplementation Impair the Favorable Adaptations of Regular Exercise? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

NIKOLAIDIS, M.G. et al. Exercise induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 38, p. 1443-1450, 2006.

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.

ODETTI, P. et al. Protein Oxidation in Hemodialysis and Kidney Transplantation. **Metabolism**, v. 45, n. 11, p. 1319-1322, 1996.

PADAYATTY, S.J. et al. Human adrenal glands secrete vitamin C in response to adrenocorticotrophic hormone. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, p. 145-159, 2007.

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.

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.

PETRY, E.R. et al. Exercício físico e estresse oxidativo: mecanismos e efeitos. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 18, n. 4, p. 90-99, 2010.

RADAK, Z. et al. Changes in urine 8- hydroxydeoxyguanosine levels of supermarathon runners during a four-day race period. **Life Science**, v. 66, p. 1763-1767, 2000.

RADAK, Z. et al. Super-marathon race increases serum and urinary nitrotyrosine and carbonyl levels. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, p. 726-730, 2003.

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.

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.

SCHNEIDER, M. et al. Vitamin E supplementation does not increase the vitamin C radical concentration at rest and after exhaustive exercise in healthy male subjects. **European Journal of Nutrition**, v. 42, p. 195-200, 2003.

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

SILVA, G.S.F. et al. Avaliação do nível de atividade física de estudantes de graduação das áreas saúde/biológica. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 1, 2007.

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 defences during exhaustive exercise. **European Journal of Physiology**, v. 446, p. 658-664, 2003.

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.

WATSON, T. A. et al. Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. **Medicine Science Sports Exercise**, v. 37, p. 63-71, 2005.

WEISS, C. et al. Tissue factor-dependent pathway is not involved in exercise-induced formation of thrombin and fibrin. **Journal Applied Physiology**, v. 92, p. 211-218, 2002.

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.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada **“Efeitos do Ácido Ascórbico nos Biomarcadores de Estresse Oxidativo Induzido por Exercício Físico Exaustivo”**. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de vitamina C na produção de radicais livres após exercício exaustivo. Radicais livres quando produzidos em excesso podem ser prejudiciais a saúde, uma vez que o organismo pode não ser capaz de combatê-los. Nestas situações de grande produção de radicais livres, que chamamos de estresse oxidativo, pode haver uma maior necessidade de substâncias advindas da alimentação, como a vitamina C, que parecem desempenhar um importante papel no combate destes radicais minimizando os danos à saúde.

Se você aceitar participar desta pesquisa deverá comparecer ao laboratório de Fisiologia do Exercício da Universidade Federal de São Carlos (Ufscar) e inicialmente precisará submeter-se a um teste para determinação do consumo máximo de oxigênio, com duração de aproximadamente 20-25 minutos, e coleta de sangue que permita avaliar se você está saudável e se poderá participar da pesquisa. Você será informado dos resultados destes exames. Se for incluído na pesquisa, de acordo com o seu nível de atividade física, participará então de 2 fases. Em uma fase fará o uso de suplemento de vitamina C por 7 dias consecutivos, e na outra, uso de placebo (comprimido com farinha) também por 7 dias. Ao final de ambas as fases realizará uma série de exercício exaustivo e serão feitas coletas de sangue antes do exercício, logo após o mesmo, 1, 2, 4 e 24 horas após. Assim deverá permanecer no laboratório por 5 horas e voltar no dia seguinte para a coleta das 24 horas após o exercício. Ainda deverá fazer o “Registro alimentar” dos 7 dias que fizer o uso de suplemento de vitamina C e placebo. Você será orientado corretamente sobre a maneira de relatar o que comeu nestes 7 dias.

O uso de vitamina C e placebo não lhe causará nenhum efeito adverso. Tanto o suplemento de vitamina C como o placebo serão entregues para você sem nenhum custo.

Você receberá um café da manhã padrão e um lanche após o exercício também sem nenhum custo e qualquer despesa de transporte que tiver em função da sua participação neste projeto será paga pela pesquisadora.

O teste para determinação do consumo máximo de oxigênio é feito em esteira monitorada utilizando uma máscara para analisar gás carbônico (CO₂) e oxigênio(O₂) e clipe nasal, que podem causar desconforto passageiro, porém não causam nenhum tipo de dor e/ou danos. E o teste até a exaustão pode levar à fadiga muscular. Serão mensuradas frequência cardíaca e pressão arterial de repouso e durante a execução dos exercícios, caso você se sinta mal será prestado socorro imediato e encaminhamento para assistência médica de urgência. As coletas de sangue serão feitas no braço com uma seringa, por enfermeiro treinado. Esta picada pode trazer algum desconforto, como a formação de uma pequena mancha roxa no local. Se isto ocorrer teremos gelo disponível para você colocar no local da picada.

O principal benefício deste estudo é que você poderá saber se com exercício vigoroso há uma maior necessidade alimentar de vitamina C para evitar prejuízos à saúde. Ainda terá acesso aos resultados de exames bioquímicos, composição corporal e análise de consumo alimentar. Caso sejam encontradas quaisquer anormalidades será orientado e encaminhado à um profissional competente e receberá uma orientação nutricional da pesquisadora.

Você terá os esclarecimentos quanto às possíveis dúvidas e poderá se recusar a participar, ou retirar seu consentimento a qualquer momento da pesquisa, sem nenhum problema. Terá também a garantia de sigilo dos resultados e de todas as informações a seu respeito. Diante de eventuais danos decorrentes desta pesquisa você será ressarcido e indenizado.

Assinatura pesquisador responsável

Pesquisadora responsável: Monike Garlipp Picchi (fone 97126958)

Orientador: Alceu Afonso Jordão Júnior (fone: 16-36024564)

Eu, _____,

RG _____, CPF _____, concordo com a participação nessa pesquisa e declaro ter compreendido o termo de consentimento acima.

Assinatura

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

<p>HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO</p> <p>www.hcrp.usp.br</p>
---	--	---

Ribeirão Preto, 20 de julho de 2011

Ofício nº 2590/2011
CEP/RCC

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO NOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR EXERCÍCIO FÍSICO EXAUSTIVO”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 328ª Reunião Ordinária realizada em 18/07/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 2465/2011.

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.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS datada de 21 de março de 2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente,

PROF. DR. RICARDO DE CARVALHO CAVALLI
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
MONIKE GARLIPP PICCHI
PROF. DR. ALCEU AFONSO JORDÃO JÚNIOR (Orientador)
Depto. de Clínica Médica – Curso de Nutrição e Metabolismo

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO C – Questionário Inicial para inclusão em Projeto de Pesquisa

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

Questionário Inicial para Inclusão em Projeto de Pesquisa

Data: __/__/__

DADOS PESSOAIS

Nome: _____

Data de nascimento: __/__/__ Idade: _____ Sexo: _____

Telefones para contato: _____

E-mail: _____

Escolaridade: _____ Profissão: _____

Dias e horários disponíveis: _____

HISTÓRICO CLÍNICO

1. Apresenta algum problema de saúde? () sim () não
() Diabetes () Hipertensão () Dislipidemia () Anemia
() Doenças da tireóide, qual? _____ () Problemas articulares, qual? _____
Observação: _____
2. Faz uso de algum medicamento? () sim () não
Se sim: Qual (is)? _____
Frequência: _____
3. Faz algum tipo de atividade física: () sim () não
Se sim: Qual? _____ Frequência semanal: _____
Quantas horas por dia? _____ Há quanto tempo pratica? _____
4. Você fuma? () sim () não
Se sim quantos cigarros fuma por dia? _____
Se já fumou, há quanto tempo parou? _____

5. Faz uso de bebida alcoólica? () sim () não

Se sim: Quantas vezes por semana? _____ Quantas doses por vez? _____

Uma dose equivale: 1 lata de cerveja ou 1 taça de vinho ou 1 dose de destilado

6. Faz uso de algum suplemento alimentar? () sim () não

Se sim, quais suplementos você utiliza

Nome do suplemento	Forma*	Frequência/dia	Quantidade**	Tempo de uso

* forma: pó, líquido, comprimido

** quantidade em medida da sua casa (ex: colher de sopa, medidor da lata, copo, etc.).

A dosagem que você utiliza segue as instruções do rótulo? _____

De quem recebeu orientação para o uso de suplementos:

() nutricionista () médico () treinador () revista () amigo

() familiares () TV () próprio indivíduo () outra: _____

Se você não toma suplemento, já tomou? () sim () não

Se sim, qual suplemento? _____

Por que parou? _____ Há quanto tempo parou? _____

7. Atualmente faz algum tipo de dieta: () sim () não

Se sim qual?

() restrição calórica () restrição de gorduras () restrição de carboidratos

() outra restrição () reeducação alimentar () Outra: _____

Se sim, de quem recebe (eu) orientação?

() nutricionista () médico () treinador () revista () amigo

() familiares () TV () próprio indivíduo () outra: _____

Responsável pela pesquisa:

Monike Garlipp Picchi – nutricionista doutoranda pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –
FMRP/USP

E-mail: monike.garlipp@usp.br

ANEXO D – Valores médios e desvios-padrão dos antioxidantes e biomarcadores de estresse oxidativo

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS		ANTES EXERCÍCIO	LOGO APÓS EXERCÍCIO	1H APÓS	2H APÓS	4H APÓS	24H APÓS	VALORES DE REFERÊNCIA
α-tocoferol (μmol/L)	PLACEBO	14,65 ± 3,20*	16,91 ± 3,92* ^a	13,94 ± 2,77* ^b	14,16 ± 2,77* ^{ab}	10,05 ± 1,84* ^{abcd}	9,84 ± 1,87* ^{abcd}	18 a 29 ¹
	VIT C	10,38 ± 2,55**	9,71 ± 1,36**	11,72 ± 2,54**	9,69 ± 2,54**	11,92 ± 1,87** ^b	11,58 ± 2,30**	
Retinol (μmol/L)	PLACEBO	1,91 ± 0,41*	2,19 ± 0,52*	1,70 ± 0,28* ^{ab}	1,84 ± 0,25* ^{bc}	1,40 ± 0,32 ^{abcd}	1,35 ± 0,27 ^{abcd}	0,35 a 1,75 ¹
	VIT C	1,13 ± 0,38**	1,10 ± 0,22**	1,25 ± 0,37**	1,11 ± 0,44**	1,56 ± 0,55 ^d	1,24 ± 0,30	
Ácido ascórbico (mg/dl)	PLACEBO	0,63 ± 0,29	0,59 ± 0,12*	0,63 ± 0,21*	0,35 ± 0,20* ^{abc}	0,45 ± 0,18*	0,51 ± 0,28	0,6 a 2,0 ¹
	VIT C	0,82 ± 0,36	0,89 ± 0,35**	1,07 ± 0,42**	0,70 ± 0,28**	0,77 ± 0,18**	0,48 ± 0,30 ^{bce}	
FRAP (mmol/L)	PLACEBO	0,82 ± 0,13*	0,83 ± 0,10*	0,85 ± 0,13*	0,93 ± 0,19*	1,25 ± 0,15 ^{abcd}	1,17 ± 0,12 ^{abcd}	#
	VIT C	1,16 ± 0,13**	1,24 ± 0,12**	1,24 ± 0,12**	1,23 ± 0,11**	1,19 ± 0,12	1,08 ± 0,11	
CAT (μmol/L)	PLACEBO	2,00 ± 0,84	2,18 ± 0,35	2,48 ± 0,42*	2,24 ± 0,68	2,46 ± 0,56	2,51 ± 0,69	#
	VIT C	2,04 ± 0,68	2,13 ± 0,26	1,95 ± 0,49**	2,30 ± 0,39	2,21 ± 0,38	2,20 ± 0,37	
GSH (μmol/gPtn)	PLACEBO	8,87 ± 1,14*	8,11 ± 0,68*	7,97 ± 0,76*	8,10 ± 0,78*	8,16 ± 0,86*	8,43 ± 0,67*	#
	VIT C	3,68 ± 0,82**	5,01 ± 1,86**	3,49 ± 0,98**	2,87 ± 0,77** ^b	3,10 ± 0,47** ^b	3,67 ± 1,13**	
Ácido úrico (mg/dl)	PLACEBO	5,07 ± 1,34	5,33 ± 1,20*	5,51 ± 1,22 ^b	5,25 ± 1,41	5,21 ± 1,01*	4,32 ± 1,72	2,5 a 7 ²
	VIT C	4,29 ± 0,98	4,32 ± 1,11**	4,84 ± 0,90	4,71 ± 0,94	4,65 ± 1,04**	4,42 ± 0,82	

TBARS (nmol/gPtn)	PLACEBO	12,24 ± 4,56*	11,72 ± 2,67*	10,84 ± 2,75*	8,92 ± 3,99*	6,54 ± 3,74* ^a	7,06 ± 3,26* ^b	#
	VIT C	33,91 ± 12,98**	33,18 ± 12,54**	26,65 ± 10,70**	23,38 ± 7,46**	20,35 ± 6,99** ^{bc}	21,01 ± 5,37** ^{abc}	
MDA (nmol/gPtn)	PLACEBO	104,26 ± 28,58*	85,27 ± 19,86* ^a	69,60 ± 19,59* ^a	63,51 ± 27,16* ^{ab}	44,49 ± 11,85* ^{abc}	36,40 ± 11,58 ^{abcd}	#
	VIT C	56,31 ± 12,98**	43,75 ± 7,31**	42,28 ± 16,09**	29,24 ± 4,28** ^{ab}	30,25 ± 8,90** ^a	32,49 ± 9,08 ^{ab}	
FOX (μmol/gPtn)	PLACEBO	0,15 ± 0,10	0,16 ± 0,07	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,06	0,17 ± 0,06	0,16 ± 0,06	#
	VITA C	0,09 ± 0,05	0,17 ± 0,04 ^a	0,19 ± 0,10	0,15 ± 0,05 ^a	0,11 ± 0,05	0,12 ± 0,04	
AOPP (μmol/L)	PLACEBO	11,91 ± 4,41	12,05 ± 3,00	10,58 ± 2,63	10,76 ± 2,47	12,13 ± 3,56	10,90 ± 4,03	#
	VIT C	12,10 ± 3,59	12,89 ± 4,14	11,19 ± 1,96	10,54 ± 1,32	11,68 ± 2,44	12,05 ± 4,05	
PC (μmol/mgPtn)	PLACEBO	0,27 ± 0,06*	0,23 ± 0,04	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,02 ^a	0,24 ± 0,04*	0,25 ± 0,04	#
	VIT C	0,22 ± 0,02**	0,22 ± 0,03	0,22 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,20 ± 0,01**	0,23 ± 0,03	
CK (U/L)	PLACEBO	186,83 ± 118,51	237,33 ± 131,11 ^a	227,17 ± 119,67 ^a	224,92 ± 113,22 ^a	248,33 ± 116,56 ^a	322,85 ± 159,15 ^a	15 a 18 anos: 34 a 147 ² > 18 anos: 26 a 189
	VIT C	180,15 ± 97,43	231,85 ± 103,52 ^a	229,62 ± 104,56 ^a	235,08 ± 104,22 ^a	244,00 ± 106,89	351,40 ± 137,74	
TGO (U/L)	PLACEBO	24,23 ± 7,41	31,69 ± 8,48 ^a	27,85 ± 7,31 ^a	27,23 ± 8,27 ^b	26,31 ± 6,97 ^b	26,62 ± 7,43 ^b	11 a 39 ²
	VIT C	26,54 ± 7,32	33,23 ± 9,31 ^a	28,54 ± 7,39 ^b	28,38 ± 8,87 ^b	26,92 ± 7,80 ^b	28,42 ± 12,47 ^{abcd}	
LDH (U/L)	PLACEBO	395,00 ± 95,14	463,46 ± 64,36	465,36 ± 35,16	438,46 ± 62,09	411,00 ± 53,27 ^b	382,38 ± 81,53 ^b	200 a 480 ²
	VIT C	426,67 ± 137,63	462,62 ± 98,76	434,00 ± 75,25	471,54 ± 114,76	419,85 ± 76,80	365,22 ± 44,13 ^{bcd^e}	

¹YOUNG, D.S. Implementation of SI Units for Clinical Laboratory Data: Style Specifications and Conversion Tables, 1987

² Valores de referência utilizados pela Laboratório Médico Dr.Maricondi (São Carlos)

não possui valor de referência

(*) em números diferentes indicam diferença estatística entre as intervenções (p<0,05).

^a Diferença para momento pré (p<0,05); ^b Diferença para momento pós (p<0,05); ^c Diferença para 1h (p<0,05); ^d Diferença para 2h (p<0,05); ^e Diferença para 4h (p<0,05).