

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Educação Física



Dissertação de Mestrado

**Efeitos da suplementação de suco de mirtilo e exercício físico em marcadores  
de estresse oxidativo em indivíduos treinados**

**Priscila Cardoso Meirelles**

Pelotas, 2011

Priscila Cardoso Meirelles

**Efeitos da suplementação de suco de mirtilo e exercício físico em marcadores  
de estresse oxidativo em indivíduos treinados**

Dissertação de Mestrado  
apresentado ao Curso de Pós-  
Graduação em Educação Física da  
Universidade Federal de Pelotas,  
como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em  
Educação Física, na Área de  
Concentração em Atividade Física,  
Saúde e Desempenho.

Orientador: Prof. Dr. Airton José Rombaldi  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alethéa Gatto Barschak

Pelotas, 24 de março de 2011.

Banca examinadora:

Dr. Airton José Rombaldi (Orientador)

Dr<sup>a</sup>.Francieli Moro Stefanello

Dr. Felipe Fossati Reichert

Dr. Marlos Rodrigues Domingues

## Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a todas as pessoas que de uma maneira ou de outra, cada um com seu jeito e dedicação, me ajudaram a chegar até aqui mais tranqüila e confiante.

Aos meus amigos César Bauer e João Guilherme, pois sem eles eu não teria elaborado o projeto no qual conquistei a vaga no mestrado e hoje defendo aqui.

Aos professores e colegas, pela convivência e ensinamentos que vieram a somar no meu amadurecimento profissional e pessoal.

A todos os ciclistas que participaram deste estudo, pois sem eles não teria acontecido.

Aos prof. Felipe e Marlos que me auxiliaram na captação do pessoal para participar do estudo e transporte intermunicipal de suco de mirtilo.

A minha co-orientadora, prof<sup>a</sup>. Alethéa e a prof<sup>a</sup>. Francieli, pois seus conhecimentos em bioquímica foram fundamentais para a concretização deste estudo.

Ao meu orientador prof. Airton, pela confiança, amizade, ensinamentos e grande contribuição na minha vida profissional.

As amigas Andrea, Lyvia, Milena e Thaís pelas risadas e apoio permanente na minha coleta e análise dos dados.

Ao Laboratório de Química Orgânica em nome da mestranda Alana Vasconcelos.

Ao Laboratório de Análises de Metabólitos – Serviço de Genética HCPA/UFRGS em nome da mestranda Giovana Brondani Biancini pelo auxílio fundamental na concretização dos resultados deste estudo.

A todos os meus amigos que mantiveram os ouvidos bem abertos, entre um brinde e outro, para me ouvir falar muito sobre mirtilo, ciclismo e estresse oxidativo.

A minha avó Dinah e tias queridas Cléia, Ana e Márcia que sempre torceram por mim, me incentivando e apoiando, sendo com conversas à base de um belo mate ou com um delicioso sushi.

Ao meu pai, minha mãe e meu irmão. Pessoas para qual o meu sentimento de amor é incondicional.

**Respire bem fundo.**  
**Isso acalma a mente.**  
*(autor desconhecido)*

## SUMÁRIO

	Página
Projeto da dissertação -----	6
Relatório de campo -----	40
Artigo científico -----	46
Normas da revista -----	72
Divulgação para a imprensa -----	82



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
ESCOLA SUPERIOR DE EDUCAÇÃO FÍSICA  
CURSO DE MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA  
LINHA ATIVIDADE FÍSICA, NUTRIÇÃO E SAÚDE**

Projeto de Pesquisa

**Efeitos da Suplementação de Suco de Mirtilo e Exercício Físico  
em Marcadores de Estresse Oxidativo em Indivíduos Treinados**

Orientador(a):  
Prof. Dr. Airton José Rombaldi

Co-orientador(a):  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Alethéa Gatto Barschak

Priscila Cardoso Meirelles  
Pelotas, RS – Brasil  
2010

## SUMÁRIO

1. Introdução -----	9
1.1 Objetivo geral -----	11
1.2 Objetivos específicos -----	11
1.3 Relevância e justificativa -----	12
1.4 Hipóteses -----	13
2. Fundamentação teórica -----	14
2.1 Radicais livres e espécies reativas -----	14
2.2 Sistemas antioxidantes -----	17
2.2.1 Enzimáticos -----	18
2.2.2 Não-enzimáticos -----	19
2.2.2.1 Endógenos -----	19
2.2.2.2 Exógenos -----	20
2.3 Estresse oxidativo -----	21
2.4 Exercício físico, estresse oxidativo e antioxidantes -----	22
2.5 Antioxidantes, fadiga e rendimento -----	26
3. Metodologia -----	28
3.1 Aspectos éticos -----	28
3.2 População -----	28
3.3 Amostra -----	28
3.4 Procedimentos do teste -----	29
3.5 Solução com mirtilo -----	29
3.6 Solução com placebo -----	30
3.7 Controle da alimentação -----	30
3.8 Obtenção de sangue -----	30
3.9 Determinações bioquímicas -----	31
3.9.1 Determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico -----	31
3.9.2 Determinação da atividade da catalase -----	31
3.9.3 Determinação da atividade da glutathione peroxidase -----	31
3.9.4 Determinação da atividade da superóxido desmutase -----	31
3.9.5 Medida de carbonilas -----	31
3.9.6 Medida de lactato -----	32
3.9.7 Determinação da atividade da creatina quinase -----	32
3.9.8 Determinação da atividade da lactato desidrogenase -----	32
3.10 Procedimento estatístico -----	32
4. Cronograma de atividades -----	33
5. Referências -----	34
6. Anexos -----	39

## 1 INTRODUÇÃO

A nutrição é um dos fatores mais importantes para um bom rendimento no exercício físico. O esforço intenso e o consumo energético do treinamento e da competição desportiva impõem exigências incomuns na dieta do atleta. As substâncias ingeridas, como carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, além de apresentarem função bioenergética, protegem o organismo contra os danos teciduais causados pelo treinamento, exercício exaustivo e auxiliam no controle da fadiga (GOMEZ-CABRERA et al., 2000).

Há muito tempo se conhece os benefícios do exercício físico regular no tratamento de diferentes patologias como diabetes, cardiopatias e hipertensão arterial, no auxílio da manutenção de ossos, músculos e articulações, bem como promove bem estar psicológico (United States Department of Health and Human Services, 1996). Contudo, sabe-se que os benefícios do exercício desaparecem com o esgotamento e a falta de treinamento. O exercício extenuante causa dano muscular e induz a elevação de enzimas citosólicas no plasma sanguíneo, tais como creatina quinase, aminotransferases e lactato desidrogenase, bem como promove a formação de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) que causam dano tecidual (GOMEZ-CABRERA et al., 2000).

Radical livre é qualquer átomo ou molécula que apresenta um ou mais elétrons desemparelhados. Os elétrons desemparelhados alteram a reatividade química de um átomo ou molécula, geralmente tornando-a mais reativa que o correspondente (HALLIWELL, 1994). As espécies reativas de oxigênio são uma família de radicais livres e outros não radicais produzidos como resultado das reações com o oxigênio na mitocôndria (FRISARD; RAFUSSIN, 2006).

O equilíbrio entre as exigências fisiológicas do exercício e a disponibilidade de fatores nutricionais é essencial para a homeostase dos sistemas corporais responsáveis pela manutenção da saúde e do desempenho físico. Dentre esses sistemas, está o de defesa antioxidante, uma vez que uma única sessão de exercício físico pode aumentar significativamente a produção de radicais livres (VOLEK; KRAEMER; RUBIN, 2002).

A quantidade fisiológica de antioxidantes em um indivíduo pode não ser suficiente para prevenir o excesso de espécies reativas induzido pelo exercício físico

e a presença de antioxidantes adicionais pode ser necessária para reduzir o dano oxidativo, dano muscular e processo inflamatório (KÖNIG et al., 2001).

Exercícios físicos de longa duração e alta intensidade, com uma alta contribuição de metabolismo aeróbio, podem colaborar para um aumento na produção de ERO (MORRILAS-RUIZ et al., 2005).

Os antioxidantes são benéficos para a saúde atuando principalmente como neutralizadores dos efeitos degenerativos de peroxidações causadas pelo excesso de radicais livres e, assim, prevenindo doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer e outros processos degenerativos (DE ANGELIS, 2004).

Mais atenção tem sido dada a atividade de antioxidantes naturais presentes em frutas e vegetais, porque esses componentes podem reduzir potencialmente o nível de estresse oxidativo nas células (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005), na medida em que as frutas, além dos nutrientes essenciais, fibras e uma série de micronutrientes, como os minerais e vitaminas, fornecem diversos componentes metabólicos secundários de natureza fenólica, denominados polifenóis (HARBORNE; WILLIANS, 2000).

Os fenóis, especialmente os flavonóides (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002) e as antocianinas (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; MOYER et al., 2002), mostram uma grande capacidade para capturar radicais livres, moléculas causadoras do estresse oxidativo, atribuindo-se a eles um efeito benéfico ao organismo (SCHRAMM; GERMAN, 1998; ISHIGE; SCHUBERT; SAGARA, 2001; KATSUBE et al., 2003).

Entre as plantas frutíferas, o grupo das pequenas frutas abrange várias espécies, dentre elas, as culturas do morango, framboesa, mirtilo e amora preta. Os frutos de mirtilo são classificados como as frutas frescas mais ricas em antioxidantes já estudadas, tendo um conteúdo elevado de polifenóis tanto na casca quanto na polpa (PAYNE, 2005).

O mirtilo, também conhecido como *blueberry*, em inglês, ou “arândano”, em espanhol, é uma espécie arbustiva, com 1,5 a 3 metros de altura, adaptada a climas temperados e exigentes em frio para quebra da dormência. Os frutos são de cor azul intensa, recobertos de cera, com diâmetro entre 1,5 a 2,5 cm, com polpa de sabor doce-ácido e muitas sementes de pequeno tamanho. Esta espécie frutífera nativa dos Estados Unidos e Canadá tem sua popularidade e interesse de produtores e consumidores associados às excepcionais propriedades funcionais da fruta, que a

tornaram conhecida como “fruta da longevidade”. Sua riqueza em pigmentos antocianos, substâncias de alto poder antioxidante e preventiva de doenças degenerativas, seu sabor único e sua cor inconfundível são fatores que atraem diretamente o consumidor (HOFFMANN; ANTUNES, 2004).

As berries estão entre as frutas que possuem maior reconhecimento pelos seus potenciais benefícios a saúde. Muitas das suas propriedades benéficas são geralmente atribuídas aos seus compostos bioativos (flavonol, flavanol, proantocianidinas e antocianinas) (SANCHEZ-MORENO et al., 2003; SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000). As antocianinas são um grupo de pigmentos vegetais hidrossolúveis, amplamente distribuídos no reino vegetal. Seu espectro de cor vai do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons de púrpura (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). A combinação das 11 antocianinas presentes no mirtilo responde por 56,3% do valor total da capacidade antioxidante (SELLAPPAN; AKOH; KREWER, 2002).

### **1.1 Objetivo Geral**

Verificar marcadores do estresse oxidativo em indivíduos treinados submetidos a exercício aeróbico prolongado com e sem o uso de suplementação de polpa de mirtilo, fruta rica em antioxidantes.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Determinar se a introdução de suplemento antioxidante reduz dano tecidual provocado por espécies reativas de oxigênio produzidas durante o exercício físico;
- Determinar o tempo até a fadiga muscular com e sem o uso de suplementação antioxidante;
- Descrever a associação entre a formação excessiva de radicais livres com o surgimento da fadiga;
- Avaliar a concentração de colesterol sanguíneo total e frações, além da glicemia dos indivíduos e relacionar com a capacidade antioxidante do mirtilo;

- Determinar a produção das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e superóxido desmutase (SOD) antes e depois do início da suplementação com mirtilo ou placebo;
- Avaliar oxidação de lipídios através da medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) comparando as medidas antes e depois do início da suplementação com mirtilo ou placebo;
- Avaliar a oxidação de proteínas através da medida da presença do grupamento carbonil) comparando as medidas antes e depois do início da suplementação com mirtilo ou placebo;
- Determinar os níveis séricos de lactato, enzimas creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) antes e depois do início da suplementação com mirtilo ou placebo;

### **1.3 Relevâncias e Justificativa**

O estudo de agentes antioxidantes está relacionado à freqüente associação entre danos teciduais e formação de radicais livres. Dieta equilibrada e rica em antioxidantes fornece o aparato nutricional adequado para prevenção de situações formadoras de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como a prática de exercício físico exaustivo.

A utilização de frutas na dieta habitual já é bem estabelecida. Segundo o Guia Alimentar para a População Brasileira (Ministério da Saúde, 2006), o consumo de frutas deve ser de três porções ou mais, ao dia. Em uma dieta equilibrada contendo porções adequadas de frutas, o organismo receberá não somente um único nutriente, como em suplementos comerciais, mas sim um conjunto de vitaminas, minerais e antioxidantes importantes para manutenção do estado de saúde do organismo.

A importância do estudo da capacidade antioxidante de frutas traz benefícios a todos os atletas e praticantes de atividade física, pois seu consumo diário tem a função de prevenção tanto relacionada à formação de radicais livres pelo exercício físico exaustivo, bem como por patologias, fazendo com que a incidência de lesões e doenças seja reduzida. Com isso, o tempo de afastamento de treinos e competições, alteração da rotina social e de trabalho dos indivíduos, será drasticamente menor.

Isso faz com que pesquisas em torno do uso de suplementos antioxidantes naturais relacionadas a estresse oxidativo tornem-se extremamente relevantes, principalmente no que diz respeito a atletas, pois só vem a melhorar o rendimento e capacidade de trabalho destes.

Diante à comprovação obtida em estudos (JI, 1999; GOMEZ-CABRERA et al., 2000; VOLEK et al., 2002; KOURY; DONANGELO, 2003) de que o exercício físico intenso causa estresse oxidativo, com aumento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, causando danos teciduais e fadiga muscular, é de extrema importância o estudo de antioxidantes naturais que possam ser adicionados ou suplementados a dieta habitual de atletas, com o objetivo de minimizar os danos do exercício físico exaustivo. O uso destes alimentos com propriedades antioxidantes fazem com que o organismo esteja preparado e prevenido contra os possíveis danos causados pelo excesso de radicais livres.

#### **1.4 Hipóteses**

- Dieta habitual com alimentos ricos em propriedades antioxidantes auxilia na redução do estresse oxidativo gerado no organismo de pessoas treinadas submetidos a exercício aeróbio prolongado;
- Modificação nas concentrações de colesterol total e frações no grupo de indivíduos que consumiram a polpa de mirtilo;
- Diminuição da peroxidação lipídica, através da redução da formação de TBARS, principalmente no grupo de pessoas treinadas em uso de suplementação de polpa de mirtilo;
- Aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD entre os grupos de pessoas treinadas, com e sem suplementação de polpa de mirtilo, induzido pelo conteúdo antioxidante da fruta;
- Melhor rendimento no grupo de indivíduos submetidos a exercício físico intenso com suplementação de polpa de mirtilo, mostrando um maior espaço de tempo entre o início do exercício físico e fadiga muscular.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Durante a atividade física ocorrem diversas adaptações fisiológicas, sendo necessários ajustes cardiovasculares e respiratórios para compensar e manter o esforço realizado (KOURY; DONANGELO, 2003).

O exercício físico pode implicar uma maior utilização de nutrientes específicos, como os envolvidos com o sistema de defesa antioxidante (PANZA; WAZLAVIK; SILA, 2007).

### 2.1 Radicais livres e Espécies Reativas

Os radicais livres e outras moléculas chamadas espécies reativas são constantemente produzidas *in vivo* por todos os tecidos do corpo. Muitos tipos de espécies reativas podem ser produzidos nos sistemas vivos, com destaque para o grupo das espécies reativas de oxigênio (ERO). Da mesma forma como o termo ERO foi introduzido na biologia, temos os termos espécies reativas de nitrogênio (ERN), espécies reativas de cloro (ERC), espécies reativas de bromo (ERB) e espécies reativas de enxofre (ERS) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) (tabela 1).

Radicalis livres são parte de um processo natural resultante da presença do oxigênio e necessário para algumas funções orgânicas. Porém, o seu excesso em relação aos antioxidantes presentes no organismo pode causar transtornos. Este desequilíbrio pode ser causado por excesso na formação de radicais livres e/ou por carência dos nutrientes que direta ou indiretamente participam da ação antioxidante (CARREIRO, 2006). Alguns exemplos de radicais livres são: oxigênio singlet ( $O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^-$ ), óxido nítrico ( $NO^-$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).

As ERO são uma família de radicais livres produzidos como resultado das reações com o oxigênio na mitocôndria (FRISARD; RAFUSSIN, 2006). A produção de ERO e o óxido nítrico é contínua. A produção aumenta durante o exercício físico árduo, e, ambas as substâncias, estão envolvidas na função contrátil. Sob condições basais, baixos níveis de ERO aumentam a produção de força. Já o acúmulo excessivo à inibe, por exemplo, durante um exercício extenuante (FONSECA; PASCHOAL, 2004).

Tabela 1 – Nomenclatura de espécies reativas

Radicais livres	Não radicais
<b>Espécies reativas de oxigênio (ERO)</b>	<b>Espécies reativas de oxigênio (ERO)</b>
Superóxido, $O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrogênio, $H_2O_2$
Hidroxil, $OH^{\bullet}$	Ácido hipobromoso, $HOBr^a$
Hidroperoxil, $HO_2^{\bullet}$	Ácido hipocloroso, $HOCl^b$
Carbonato, $CO_3^{\bullet-}$	Ozônio, $O_3$
Peroxil, $RO_2^{\bullet}$	Oxigênio singlet, $O_2$
Alcoxil, $RO^{\bullet}$	Peróxidos orgânicos, ROOH
Dióxido de carbono, $CO_2^{\bullet-}$	Peroxinitrito, $ONOO^{\bullet-}$ <sup>c</sup>
Oxigênio singlet, $O_2$	Peroxinitrato, $O_2NOO^{\bullet-}$
	Ácido peroxinitroso, ONOOH
	Nitrosoperoxicarbonato, $ONOOCO_2^{\bullet-}$
	Peroxomonocarbonato, $HOOCO_2^{\bullet-}$
<b>Espécies reativas de nitrogênio (ERN)</b>	<b>Espécies reativas de nitrogênio (ERN)</b>
Óxido nítrico, $NO^{\bullet}$	Ácido nitroso, $HNO_2$
Dióxido de nitrogênio, $NO_2^{\bullet}$	Cátion nitrosil, $NO^+$
Nitrato, $NO_3^{\bullet}$	Ânion nitroxil, $NO^{\bullet-}$
	Tetroxido de dinitrogênio, $N_2O_4$
	Trióxido de dinitrogênio, $N_2O_3$
	Peroxinitrito, $ONOO^{\bullet-}$
	Peroxinitrato, $O_2NOO^{\bullet-}$
	Ácido peroxinitroso, ONOOHC
	Cátion nitrônio (nitril), $NO_2^+$
	Alquil peroxinitrito, ROONO
	Alquil peroxinitrato, $RO_2ONO$
	Cloreto de nitrilo, $NO_2Cl$
	Peroxiacetilnitrato, $CH_3C(O)OONO_2^e$

Fonte: Adaptado de Halliwell; Gutteridge, 2007.

“Espécies reativas de oxigênio” é um termo coletivo que inclui radicais oxigênio e certos não radicais que são agentes oxidantes/ou são facilmente convertidos até radicais ( $HOCl$ ,  $HOBr$ ,  $O_3$ ,  $ONOO^{\bullet-}$ ,  $O_2$ ,  $H_2O_2$ ). Todos radicais oxigênio são EROS, mas nem todos são radicais oxigênio. Peroxinitrito e  $H_2O_2$  são freqüentemente descritos erroneamente como radicais livres, por exemplo. “Espécies reativas de nitrogênio” é um termo coletivo similar que inclui  $NO^{\bullet}$  e  $NO_2^{\bullet}$  bem como não radicais, tal como  $HNO_2$  e  $N_2O_4$ . “Reativo” nem sempre é um termo apropriado:  $H_2O_2$ ,  $NO^{\bullet}$  e  $O_2^{\bullet-}$  reagem rapidamente com poucas moléculas, considerando que o  $OH^{\bullet}$  reage rapidamente com quase tudo. Tais espécies como  $RO_2^{\bullet}$ ,  $NO_3^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$ ,  $HOCl$ ,  $HOBr$ ,  $CO_3^{\bullet-}$ ,  $CO_2^{\bullet-}$ ,  $NO_2^{\bullet}$ ,  $ONOO^{\bullet-}$ ,  $NO_2^+$  e  $O_3$  tem reatividade intermediária.

<sup>a</sup>  $HOBr$  e  $BrCl$  também pode ser considerado como ERB.

<sup>b</sup>  $HOCl$  e  $HOBr$  são freqüentemente incluídos como ERO.

<sup>c</sup>  $ONOO^{\bullet-}$  e  $ONOOH$  são freqüentemente incluídos como ERO.

<sup>d</sup>  $NO_2Cl$  também pode ser considerada como uma ERN.

<sup>e</sup> Espécie oxidativa formada no ar poluído.

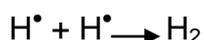
Dois a cinco por cento do oxigênio utilizado no organismo resultam em radicais livres que se caracterizam como átomos ou moléculas altamente instáveis e

reativas (CARREIRO, 2006) que, por sua vez, podem causar danos às moléculas que são importantes para o funcionamento de células, levando a uma redução da função celular (EVANS, 2000). Além disto, este processo irá gerar outro radical livre e assim sucessivamente, numa ação em cascata. Este só é neutralizado quando um radical livre reage com uma molécula de um nutriente antioxidante, uma enzima antioxidante ou outro radical livre (CARREIRO, 2006).

Há inúmeras maneiras através das quais os radicais livres podem ser produzidos normalmente pelo metabolismo, entre as quais: durante a beta-oxidação dos ácidos graxos nos peroxissomos, durante o metabolismo dos compostos xenobióticos pelas enzimas da citocromo P-450 e quando as células fagocíticas atacam os patógenos com uma mistura de oxidantes e radicais livres (RAMOS; POU; BRITIGAN, 1992).

Traumas, infecções, radiações, exercício intenso, O<sub>2</sub> elevado, isquemias, fumo, poluição, certos medicamentos, hiperglicemia e estresse emocional são condições que podem causar aumento exagerado de espécies reativas (DE ANGELIS, 2004).

Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), se dois radicais livres se encontram, eles podem juntar seus elétrons não pareados para formar uma ligação covalente. Assim, o átomo de hidrogênio forma um hidrogênio diatômico:



O maior exemplo biologicamente relevante é a rápida reação do óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) e O<sub>2</sub><sup>•-</sup> para formar um produto não radical, peroxinitrito:



Entretanto, muitas moléculas biológicas são não radicais. Quando um radical livre reage com um não radical, resulta em um novo radical, e uma cadeia de reações pode ocorrer:

1. um radical pode adicionar-se a uma outra molécula. O receptor ainda deve ter um elétron desemparelhado;
2. um radical pode ser um agente redutor, doar um único elétron para um não radical;
3. um radical pode ser um agente antioxidante, tendo um único elétron de um não radical. O não radical deve então ter um elétron desemparelhado;

4. um radical pode roubar um átomo de hidrogênio de uma ligação C-H. como o H<sup>•</sup> tem somente um elétron, um elétron desemparelhado deve ser deixado no carbono. Uma cadeia de reações pode, então, ocorrer desde o carbono central radicais pode reagir com O<sub>2</sub> fazendo radicais peroxil.

Em resposta ao esforço físico, diversos são os mecanismos que podem contribuir para a elevação da produção de radicais livres. Entre esses mecanismos, está o metabolismo oxidativo mitocondrial, a resposta inflamatória e o processo isquemia-reperfusão (JI, 1999; VOLEK et al, 2002). O exercício físico intenso induz a formação excessiva de ERO associadas ao metabolismo energético acelerado. Essas espécies podem contribuir para danos tissulares e celulares e prejudicar o desempenho do atleta (KOURY; DONANGELO, 2003).

## 2.2 Sistemas Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias químicas capazes de interagir com os radicais livres, tornando-os inativos ou menos ativos sem formar outros radicais livres. A capacidade antioxidante do organismo envolve o sistema enzimático endógeno e o sistema não-enzimático tanto endógeno como exógeno (CARREIRO, 2006). No quadro 1 podem ser observados as principais espécies reativas e seus antioxidantes.

Quadro 1 – Principais espécies reativas, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos

Espécies reativas	Antioxidantes Enzimáticos	Antioxidantes Não- Enzimáticos	
		Endógenos	Exógenos
Superóxido	Superóxido desmutase	Glutationa	Vitamina E
Peróxido de hidrogênio	Catalase	Ácido $\alpha$ -lipóico	Vitamina C
Radical hidroxila	Glutationa redutase	Ubiquinona	Carotenóides
Oxigênio singlet	Glutationa peroxidase	Ácido úrico	Flavonóides
Radical peroxil		Matalationeínas	
		Transferrina	
		Ceruloplasmina	

Fonte: Carreiro, 2006.

O sistema de defesa antioxidante do organismo tem como principal função inibir ou reduzir os danos causados às células pelas espécies reativas. Existe uma grande variedade de substâncias antioxidantes as quais podem ser classificadas em função da origem e/ou localização em antioxidantes dietéticos e antioxidantes intra e extracelulares (TELESI; MACHADO, 2008).

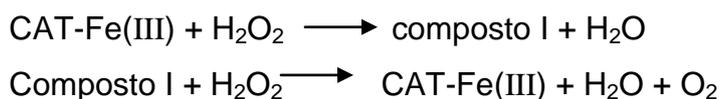
No tocante aos sistemas antioxidantes existentes na célula, que compreendem os varredores enzimáticos e os vitamínicos, a sua eficiência depende de uma estreita cooperação entre as ações de uns e de outros, completando assim atividades de inibição da síntese ou inativação das espécies reativas já formadas (PASCHOAL, 1998).

Para melhor entendimento, vamos dividi-los em enzimáticos e não-enzimáticos.

### 2.2.1 Enzimáticos

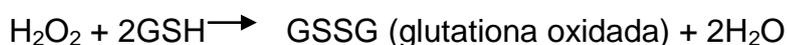
Um dos sistemas de defesa antioxidante humano é o enzimático, composto principalmente pelas enzimas catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD) e glutaciona peroxidase (GPx).

A CAT é dependente de ferro e catalisa uma reação de dismutação, onde um  $\text{H}_2\text{O}_2$  é reduzido à  $\text{H}_2\text{O}$  e o outro oxidado à  $\text{O}_2$ , sendo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007):



A SOD é uma família de enzimas dependente de cobre, zinco e manganês, altamente eficiente na remoção catalítica do  $\text{O}^{\bullet-}_2$ , que juntamente com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é o responsável pelos danos celulares e teciduais (PASCHOAL, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A GPx também é uma família de enzimas, na qual a maioria é dependente de selênio. A GPx remove o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela ligação de sua redução a  $\text{H}_2\text{O}$  com a oxidação de glutaciona reduzida, GSH, um tiol contendo tripeptídeo, sendo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007):



Desta maneira, o consumo regular de vitaminas e minerais é indispensável para o funcionamento do sistema antioxidante do organismo, principalmente em casos de estresse físico.

### 2.2.2 Não enzimáticos

Outro grande grupo de defesas antioxidantes é o não enzimático, que pode ter origem endógena ou exógena.

#### 2.2.2.1 Endógenos

Os antioxidantes não-enzimáticos endógenos (quadro 1) possuem funções como ligar-se ao ferro, cancelando a sua atividade pró-oxidante (trasferrina e lactoferrina) e de ativação do metabolismo do ferro e ligação ao cobre, que pode ser pró - oxidante (ceruloplasmina).

O ácido lipóico é um componente essencial do piruvato e do complexo multienzimático  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, mostrando propriedades antioxidantes podendo eliminar  $RO^{\bullet}_2$ , HOCl,  $CO^{\bullet}_3$ ,  $NO^{\bullet}_2$ ,  $OH^{\bullet}$  e ONOOH e se ligar aos íons ferro e cobre.

A coenzima Q é essencial no transporte de elétrons mitocondrial, sofrendo oxidação e redução através de um intermediário de radicais livres, semiquinona ( $CoQ^{\bullet}H$ ). Também é encontrada em outras membranas celulares e em lipoproteínas. *In vitro*, o ubiquinol ( $CoQH_2$ ) pode expulsar o radical  $RO^{\bullet}_2$  e inibir a peroxidação lipídica.

O ácido úrico é produzido a partir da hipoxantina e xantina pela enzima xantina oxidase. O urato é um potente varredor de  $O_3$  e  $NO^{\bullet}_2$  e pode ajudar a proteger biomoléculas contra esses poluentes atmosféricos oxidantes no trato respiratório. Ainda, o urato em altos níveis, *in vivo*, tem o papel viável de limpeza de espécies reativas. Isto é suportado pelas observações que produtos da degradação do urato por espécies reativas, especialmente a alantoína, aumentam suas concentrações em pacientes sujeitos a estresse oxidativo como, por exemplo, em doença de Wilson, Síndrome de Down, hemocromatose, artrite reumatóide, exercício intenso e parto prematuro (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

### 2.2.2.2 Exógenos

Muitos constituintes da dieta possuem ação antioxidante, como as vitaminas C, E, carotenóides e flavonóides (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A vitamina E, ou melhor, os tocoferóis e tocotrienóis, suas substâncias ativas, são os principais antioxidantes das membranas celulares. Eles inibem a peroxidação lipídica, pois varrem os radicais peroxil ( $LO^{\bullet}_2$ ) muito mais rapidamente do que esses radicais possam reagir com as cadeias laterais dos ácidos graxos ou com proteínas da membrana (PASCHOAL, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A vitamina C, ácido ascórbico ou ascorbato é um sólido branco cristalino muito solúvel em água. Entre as suas várias funções, o ácido ascórbico tem a capacidade de ceder e receber elétrons, característica que lhe confere um papel como antioxidante. Ele varre do organismo as principais espécies reativas de oxigênio, como  $O^{\bullet}_2$ ,  $HO^{\bullet}_2$  e  $OH^{\bullet}$ . (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; TELES; MACHADO, 2008).

Os carotenóides, precursores da vitamina A, são corantes naturais presentes nas frutas e vegetais (cenouras, tomates, espinafre, etc.), sendo que a sua estrutura química é composta por ligações duplas conjugadas, que são responsáveis por sua cor e por algumas funções biológicas (TELES; MACHADO, 2008). Eles podem interagir com os radicais oxidantes por transferência de elétrons como, por exemplo, o radical peroxil:



Segundo sugere um estudo de coorte em Netherlands (estudo Zutphen, 1985), há uma correlação inversa entre a incidência de doença coronariana e consumo de flavonóides na dieta (frutas e vegetais) na população estudada. Desde então, muitos outros estudos tem confirmado associações similares. Com isso, foi amplamente assumido que o efeito benéfico dos flavonóides é devido as suas ações antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Atualmente, mais atenção tem sido dada ao conteúdo de antioxidantes em frutas, pois estudos epidemiológicos têm revelado que um alto consumo de frutas parece estar correlacionado com a redução da mortalidade por doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (LILA, 2004). Um dos possíveis

mecanismos responsáveis é atribuído a atividade antioxidante presente nas frutas (FARIA et al., 2005).

A eficácia de fitoquímicos na atenuação de danos oxidativos viscerais relacionados ao exercício foi demonstrada por alguns autores. Minato et al. (2003) submeteram ratos treinados a corrida em declive por 35 min, 4hs após a administração de uma solução contendo eriocitrina (flavanona), extraído do albedo do limão. O tratamento atenuou a elevação das concentrações hepáticas de malondialdeído (MDA), induzida pelo esforço, marcadores de oxidação de proteínas e glutathiona oxidada (GSSG).

As frutas, principalmente as que apresentam a coloração vermelha/azul, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares. As berries, como o mirtilo, destacam-se neste grupo.

Em um estudo realizado por Sellappan, Akoh e Krewer (2002), analisou-se o conteúdo de antocianinas, polifenóis e capacidade antioxidante de diversas variedades de mirtilo e amora. Foi encontrado um alto conteúdo de polifenóis e capacidade antioxidante em duas cultivares do mirtilo rabbiteye (*Vaccinium ashei* Reade) sendo a catequina o principal polifenol com concentração de 387,48 mg/100 g de peso fresco (PF). O total de antocianinas foi um pouco mais elevado na amora (116, 59mg/100g PF) do que no mirtilo rabbitieye (113,55mg/100g PF). Muitos destes compostos apresentam uma grande gama de efeitos biológicos, incluindo ações antioxidantes, antimicrobiana, antiinflamatória e vasodilatadora.

Existem vários relatos que avaliaram se antioxidantes atenuam danos musculares, uma vez que um aumento significativo de produtos oxidativos é notado no músculo e corrente sanguínea após o exercício, em paralelo a outros parâmetros de lesão muscular. A lesão oxidativa após exercício agudo pode ser evitada através da ingestão de antioxidantes, como as vitaminas C e E, carotenóides ou polifenóis, não só durante o exercício, mas também na base diária da alimentação (KATO et al., 2000; TAKANAMI et al., 2000; PHILLIPS et al., 2003).

### **2.3 Estresse oxidativo**

Em indivíduos aeróbios saudáveis, a produção de espécies reativas é aproximadamente equilibrada com os sistemas de defesa antioxidante. O equilíbrio não é perfeito, de modo que alguns danos mediados pelas espécies reativas

ocorrem continuamente. Em outras palavras, as defesas antioxidantes controlam os níveis de espécies reativas. Tendo espécies reativas em excesso em relação aos antioxidantes disponíveis geralmente é dito ser um estado de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo é definido como um distúrbio no balanço pró-oxidante/antioxidante no organismo a favor do estado pró-oxidante (CARREIRO, 2006). Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar de: (1) diminuição de antioxidantes, como por mutações que reduzem os níveis de enzimas de defesa antioxidantes como a GSH e MnSOD e/ou depleção de antioxidantes e outros constituintes essenciais da dieta, como cobre, ferro, zinco e magnésio; e/ou (2) aumento na produção de espécies reativas, como por exposição ao O<sub>2</sub> elevado, ou excessiva ativação do sistema 'natural' de produção de espécies reativas, como a ativação inapropriada de células fagocíticas em doenças inflamatórias crônicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A alta produção de espécies reativas de oxigênio, por sua vez é desencadeada por inúmeros fatores, tais como: estresse emocional, alta ingestão de ácidos graxos trans, contaminação por metais tóxicos, alto consumo de bebidas alcoólicas e prática desregulada de exercícios físicos (CECARINI et al, 2007). Se levarmos em consideração a causa exercício físico, de acordo com Scheneider e Oliveira (2004), os fatores mais importantes na formação do estresse oxidativo são a intensidade e, conseqüentemente, o nível de exaustão do indivíduo submetido ao exercício e, portanto, a exposição a um maior fluxo de oxigênio.

O estresse oxidativo pode levar à destruição das moléculas celulares como lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. Desta forma, o estresse oxidativo pode ser associado com uma diminuição da performance física, fadiga muscular, estresse muscular e overtraining (KÖNIG et al., 2001).

## **2.4 Exercício físico, estresse oxidativo e antioxidantes**

A prática de exercícios físicos predominantemente aeróbios está associada a danos celulares acarretados pela produção excessiva de espécies reativas, dentre os quais se destaca a lesão da membrana celular, representada pelo aumento no extravasamento da enzima citosólica CK para o plasma durante o esforço (SOUZA; FERNANDES; CYRINO, 2006).

Na atividade física intensa há um aumento de 10 a 20 vezes no consumo total de oxigênio do organismo e um aumento de 100 a 200 vezes na captação de oxigênio pelo tecido muscular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), favorecendo o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. As modalidades esportivas que obtêm energia através do metabolismo aeróbio apresentam, portanto, maior facilidade de promover a liberação dessas substâncias em comparação com aquelas que obtêm energia através do metabolismo anaeróbio. Com isso, os atletas ligados a modalidades aeróbias sofrem mais as conseqüências da presença de espécies reativas de oxigênio (GOLDFARB, 1999).

No esforço físico intenso, seja em organismos treinados ou não treinados, a porcentagem representativa da quantidade de oxigênio que não é reduzido pela citocromo oxidase aumenta na mesma proporção do aumento do volume global de O<sub>2</sub> que é admitido no organismo treinado, pelo fato de ele possuir uma maior capacidade de admissão de O<sub>2</sub> aos tecidos. Isso implica um consumo maior de antioxidantes pela célula, significando que no estresse oxidativo a depleção de antioxidantes ocorre mais rapidamente (PASCHOAL, 1998).

A formação de produtos na metabolização de lipoperóxidos e a medida da capacidade antioxidante total no plasma sanguíneo são marcadores do efeito oxidante do exercício físico intenso no organismo. Souza, Oliveira e Pereira (2005), estudaram a possível ocorrência de lesões oxidativas em lipídeos em diferentes tempos em treinamento de corrida em esteira rolante até a exaustão e mostraram aumentos significativos no malondialdeído (MDA) plasmático, principalmente aos 6min (33%), 23min (714%) e 26min (761%) de exercício físico, mas redução entre os tempos 9 e 12min, sendo significativamente menor (24%) aos 12min de corrida. A capacidade antioxidante total plasmática aumentou aos nove (34%) e aos 12min (36%), enquanto que foi reduzida significativamente aos 23 (52%) e 26min (59%) de exercício. Constata-se diminuição no MDA plasmático no início do exercício em consonância com presença de alto teor de antioxidante plasmático, invertendo-se esta relação ao final do exercício. Assim, pode-se dizer que a elevação no plasma de produtos de peroxidação lipídica durante o exercício físico intenso prolongado pode retratar falta de capacidade do organismo em suportar o excesso na produção de espécies reativas contínuas por longo tempo.

Aguilar-Silva et al. (2002), relataram algumas respostas bioquímicas adaptativas de nadadores moderadamente treinados usando parâmetros do sangue

para medida do estado antioxidante, onde os nadadores foram treinados 6 dias por semana, durante 30 dias. No último dia de treinamento foram feitas coletas sanguíneas antes e depois do treino, mostrando um aumento significativo nos níveis sanguíneos da SOD e uma redução nos níveis da GSH (glutathiona reduzida), de 18,4% e 29,1%, respectivamente, ao final do treinamento. Também, os valores de lactato alcançaram  $5,21 \pm 2,41$  mmol/l, nos 30 minutos de exercício e não voltaram aos valores basais em 30 minutos de repouso. Isso mostra que o treinamento ao exercício de resistência excedeu o limiar anaeróbio dos atletas, provocando um estresse oxidativo moderado, refletido no aumento da atividade da SOD eritrocitária, consumo de GSH (a glutathiona é um dos primeiros antioxidantes de defesa do organismo) e aumento dos níveis de lactato sanguíneo.

Bloomer et al. (2005) compararam os efeitos agudos do exercício aeróbio (ciclismo) e anaeróbio (agachamento) em homens treinados. O mesmo grupo atuou nos dois protocolos de exercício, tendo um intervalo de duas semanas entre eles. As coletas sanguíneas foram feitas imediatamente antes de cada protocolo e 1, 6 e 24 horas após o término do exercício para avaliação de marcadores de estresse oxidativo. Verificou-se que as carbonilas e a glutathiona oxidada aumentam significativamente logo após o exercício aeróbio, em relação aos valores pré-exercício, voltando ao valor de base 24 horas após o início do exercício, mostrando a adaptação do organismo frente ao estresse oxidativo produzido pelo exercício físico.

Os efeitos de um encapsulado de frutas e vegetais e o conjunto de vitamina C + vitamina E foram comparados em relação aos seus efeitos no estresse oxidativo induzido pelo exercício. Voluntários, de ambos os sexos, foram submetidos a exercício a 80%  $VO_2$  máximo para determinar o nível de capacidade aeróbia de cada um e receberam suplementos durante duas semanas. Os sujeitos foram divididos em três tratamentos: placebo, vitamina C + vitamina E e concentrado de frutas e vegetais em pó encapsulados. Os resultados mostraram que o conteúdo de carbonilas, marcador de oxidação protéica, elevou-se em todos os tratamentos, sendo que grupos que receberam as suplementações de vitamina E + vitamina C e o concentrado de frutas e vegetais, atenuaram em 21% e 17%, respectivamente, o aumento desse marcador se comparado ao grupo placebo (BLOOMER; GOLDFARB; MACKENZIE, 2006).

A suplementação com bebidas antioxidantes tem sido estudada para avaliar marcadores de estresse oxidativo e dano muscular durante o exercício extenuante. Homens ciclistas foram submetidos a teste de bicicleta ergométrica por 90 minutos a 70% do VO<sub>2</sub> máximo e receberam, 15 minutos pré- exercício e de 15-15 minutos durante o exercício, bebida com concentrado antioxidante (uva preta, framboesa e groselha vermelha) ou placebo. Este estudo mostrou um aumento no plasma da atividade da enzima CK do grupo placebo (31%) em comparação ao início do exercício. Também, uma significativa diferença entre os dois tratamentos foi encontrada em relação ao conteúdo de carbonilas, com redução de 29% no grupo que usou a bebida antioxidante e aumento de 14% no grupo placebo, mostrando uma contribuição da reposição com bebidas antioxidantes no combate ao estresse oxidativo e dano muscular durante o exercício exaustivo (MORILLAS-RUIZ et al, 2005).

Também, Pilaczynska-Szczesniak et al. (2005), investigaram a influência da suplementação de suco de fruta berry (chocoberry) na redução do estresse oxidativo. Dezenove atletas de remo do sexo masculino foram divididos em 2 grupos, sendo um grupo controle e outro submetido a suplementação de 50ml, 3 vezes ao dia, de suco de chocoberry por 4 semanas. Foram realizados exercícios de remoergômetro e coletadas amostras sanguíneas antes, 1 minuto e 24 horas após os testes. Os resultados mostraram redução da enzima CK após a suplementação, comparando-se o grupo suplementado com a bebida e o grupo controle. Também, observou-se redução significativa no TBARS e na atividade das enzimas GPx e SOD no grupo suplementado, comparando o antes e depois da suplementação, mostrando a influência positiva da bebida rica em antioxidantes na redução do estresse oxidativo.

Rodrigues et al. (2003), utilizaram 12 ratos, divididos em dois grupos, para estudar os efeitos do flavonóide rutina sobre parâmetros bioquímicos séricos, lipoperóxidos e enzimas antioxidantes. Os autores usaram, em um dos grupos, uma solução aquosa de rutina (60mg/kg, 0,9ml/rato), duas vezes por semana, durante 15 dias. A administração de rutina apresentou importante efeito na diminuição dos fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), pois induziu elevação significativa do colesterol-HDL sérico, e não foram observadas alterações na concentração de lipoperóxidos, os quais estão aumentados na presença de aterosclerose, doença inflamatória crônica. Também houve uma elevação

significativa na atividade da enzima antioxidante SOD, sendo possível demonstrar que a redução dos fatores de risco para DCV estão associadas à elevação da atividade da SOD, tendo a rotina como ativadora desta importante enzima antioxidante.

## **2.5 Antioxidantes, fadiga e rendimento**

Substâncias que não têm a capacidade de atravessar a barreira da membrana sarcoplasmática, como CK, lactato desidrogenase (LDH), fragmentos da cadeia pesada de miosina (MHC), troponina-I e mioglobina, extravasam para o meio extracelular após o dano nas estruturas musculares, tornando o aumento da concentração sérica dessas substâncias potentes marcadores indiretos de dano muscular. (FOSCHINI; PRESTES; CHARRO, 2009)

Com o objetivo de verificar o desgaste muscular, após sessões de treino ou competições, pesquisadores têm mensurado as concentrações de CK e da sua fração MB, em atletas de alto nível. Glaner, Lima e Jovita (2009) verificaram se a variação aguda da CK total e da sua fração MB refletem algum risco de desgaste acentuado para a musculatura esquelética e cardíaca de 10 atletas amadores depois de completada uma prova de Ironman 70.3. Eles verificaram um aumento na concentração da CK em 418,2% e CK-MB em 153,3% se comparado aos valores antes da prova. Os resultados mostraram que a elevação aguda extremamente significativa das concentrações de CK total após o término do esforço extenuante de longa duração indica desgaste na musculatura esquelética, porém considerado normal para atletas.

Outro estudo, este com nadadores, utilizou a medida da concentração de CK para avaliar dano muscular. Foi coletado sangue dos atletas 24h antes da primeira sessão de natação, logo após a primeira e segunda sessão e 24h após o término da prova. Os pesquisadores encontraram uma elevação na CK logo após a segunda sessão de natação ( $348,7 \pm 162$ ) e 24hs após o final da prova ( $795,9 \pm 208$ ), comparado com valores da pré-prova ( $114,2 \pm 33$  e  $1143,8 \pm 254$ , respectivamente), tendo uma diferença significativa 24h após o término da prova (SILVA et al., 2009).

A atividade da creatina quinase (CK) no plasma também foi determinada por Almar et al. (2002) em um grupo de ciclistas de estrada, em dois momentos, sendo o primeiro durante uma competição de 3 semanas e o segundo em uma competição

de 4 dias. Os resultados mostraram um aumento significativo e progressivo da enzima na primeira e segunda semana (130% e 423%, respectivamente) e na última semana (179%), em relação à medida de base. Também, na competição do período de quatro dias, foi mostrado um aumento de 100% na CK em relação à medida de base, mostrando um processo de dano muscular.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Aspectos éticos**

O projeto será submetido ao comitê de ética da Escola Superior de Educação Física (ESEF) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

#### **3.2 População**

A população deste estudo é compreendida por seres humanos, do sexo masculino, de aptidão física (nível de treinamento físico) acima da média. Em função do treinamento físico realizado diariamente, a chance destas pessoas produzirem, em função do elevado consumo de O<sub>2</sub> apresentado durante as sessões, espécies reativas de oxigênio é muito maior do que das pessoas pouco ativas.

#### **3.3 Amostra**

Serão selecionados 30 indivíduos, de forma intencional, do sexo masculino, com idades entre 18 e 35 anos pertencentes a ASCORP - Associação de Corredores de Rua de Pelotas. A ASCORP foi fundada em 03/03/2007 com o objetivo de desenvolver a prática do atletismo na região sul, proporcionando a seus integrantes melhor qualidade de vida, possibilitando a participação dos atletas em diversas competições, utilizando a corrida de rua para a prática do turismo e socialização. Esses sujeitos serão divididos em dois grupos: um grupo receberá placebo (suco artificial de groselha negra) e outro que receberá a suplementação de mirtilo, de modo a avaliar os efeitos crônicos do uso do mirtilo como substância antioxidante.

Serão incluídos na amostra sujeitos do sexo masculino, que treinem regularmente, pelo menos, 4 vezes por semana, apresentem estimativa de consumo máximo de O<sub>2</sub> acima de 60 ml/Kg.min, assinem o termo de consentimento e não estejam consumindo suplementos nutricionais antioxidantes por 6 meses antes da realização do estudo.

Além disso, serão selecionados 10 indivíduos, do sexo masculino, estudantes universitários com idades entre 18 e 25 anos, fisicamente ativos

(realizem, ao menos, 150min de atividade física por semana e apresentem consumo máximo de oxigênio igual ou superior à 50ml/Kg.min). Estes serão divididos em dois grupos (placebo x suplementação com mirtilo), onde serão avaliados os efeitos agudos do consumo da suplementação de mirtilo durante uma sessão de exercício físico. Este grupo de sujeitos também assinará termo de consentimento.

### **3.4 Procedimentos de teste**

No primeiro dia, com os indivíduos “limpos” da suplementação ou placebo, será feito teste em esteira, de modo a estimar o consumo máximo de oxigênio individual e a coleta de sangue inicial, antes de começar a suplementação com mirtilo ou placebo. Durante o desenvolvimento do estudo, os sujeitos virão mais uma vez ao laboratório.

Após esta primeira coleta, o consumo de solução com mirtilo será diária, na quantidade de 150ml/dia. Continuarão com a suplementação de mirtilo ou placebo e, após 30 dias, será realizado o segundo e último teste de consumo máximo de O<sub>2</sub> e procedimento de coleta sanguínea no laboratório, para avaliação de efeito crônico da suplementação com mirtilo.

A amostra composta por estudantes universitários fará um teste em esteira no laboratório, onde será avaliado o consumo máximo de oxigênio individual. Após 7 dias, os sujeitos voltarão ao laboratório, divididos em dois grupos (placebo x mirtilo), e realizarão 15 minutos de aquecimento a carga equivalente a 50% do consumo máximo de oxigênio. Após 5 minutos de descanso, os sujeitos receberão 150ml de solução de mirtilo ou placebo e, imediatamente após, realizarão 60 minutos de exercício em esteira rolante a velocidade de 60% da velocidade do consumo máximo de oxigênio. As coletas sanguíneas serão realizadas em repouso (antes do aquecimento), 0, 30 e 60 minutos.

### **3.5 Solução com mirtilo**

Suplementação com mirtilo: doses contendo 30ml de polpa de mirtilo diluídos em 120ml de água, sendo administrado 150ml/dia de suplementação de mirtilo.

### **3.6 Solução placebo**

Suco artificial de groselha negra: cada sujeito do grupo placebo receberá 150ml/dia de suco de groselha negra artificial.

### **3.7 Controle da alimentação**

Serão realizados diários alimentares durante todo o período do estudo, que será de 4 (quatro) semanas. No dia anterior ao início dos procedimentos de teste, serão entregues os diários alimentares referentes aos 7 dias subsequentes, para ser preenchido de acordo com os dias da semana e a partir do desjejum do primeiro dia de procedimento até o desjejum do sétimo dia. No sétimo dia serão recolhidos os diários da semana anterior e entregues os da próxima semana, para começar o preenchimento a partir da hora do almoço do dia da entrega até o desjejum do 14°. E assim será feito até o último dia.

Nos dias dos testes e coletas sanguíneas, será estipulado um mesmo desjejum a todos os participantes.

### **3.8 Obtenção do sangue**

Na amostra composta por corredores, serão realizadas, no total do estudo, 4 (quatro) coletas sanguíneas de 5 ml de sangue a cada coleta, em cada indivíduo, sendo:

Primeira coleta: no dia do teste de consumo máximo de oxigênio (antes da suplementação): linha de base e ao término do teste.

Segunda coleta (trinta dias após o início da suplementação ou placebo): será coletado sangue nas mesmas condições da primeira coleta.

Na amostra composta por estudantes universitários, serão coletadas 4 (quatro) amostras sanguíneas de 5ml de sangue a cada coleta, sendo a primeira antes dos 15 minutos de aquecimento, a segunda medida aos 0 minutos, a terceira aos 30 minutos e a última aos 60 minutos do exercício físico.

As amostras de sangue serão divididas: um tubo contendo EDTA, outro contendo EDTA e fluoreto de sódio e um terceiro tubo sem anticoagulante. O sangue será centrifugado por 10 minutos a 3000 X g, o plasma e o soro serão separados e

congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O sangue heparinizado será centrifugado por 10 minutos a  $3000 \times g$ , o plasma separado será congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os eritrócitos serão lavados 3 vezes com o dobro do volume de NaCl 0,9%, centrifugando-se por 10 minutos a  $3000 \times g$ , após cada lavagem. Os eritrócitos obtidos serão diluídos na proporção de 1:1 em água, congelados e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.9 Determinações bioquímicas**

**3.9.1 Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):** será realizada pelo método de Buege e Aust (1978). A curva de calibração será realizada utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano, seguindo o mesmo tratamento das amostras. Os resultados serão calculados em nmol de TBARS/mg proteína.

**3.9.2 Determinação da atividade da catalase (CAT):** será determinada de acordo com o método descrito por Aebi (1984), baseado na decomposição da  $\text{H}_2\text{O}_2$  acompanhada a 240nm, à temperatura ambiente. Os resultados serão expressos em unidades de atividade para a catalase (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe  $1 \mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  de proteína).

**3.9.3 Determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPx):** o método será conforme descrito por Sinet e colaboradores (1975) e baseia-se na oxidação do NADPH acompanhada a 340nm a  $37^{\circ}\text{C}$ . A atividade da glutathione peroxidase será calculada pela velocidade da oxidação de NADPH, menos a velocidade da mesma independente de hidroperóxido.

**3.9.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD):** o método utilizado será conforme descrito por Spitz e Oberley (1989). Uma unidade de atividade de superóxido dismutase é definida como a quantidade necessária para reduzir a velocidade da reação em 50%.

**3.9.5 Medida de carbonilas:** o método utilizado será conforme descrito por Levine e colaboradores (1990). A presença do grupamento carbonil é um indicativo de oxidação. A medida do dano será feita por leitura de absorbância a 370nm.

**3.9.6 Lactato:** a concentração de lactato será medida no sangue total, através do equipamento Accusport (Mannheim Boehringer – Alemanha), que utiliza tiras reagentes.

**3.9.7 Creatina quinase (CK):** a atividade da CK será determinada utilizando kit comercial da marca Labtest.

**3.9.8 Lactato desidrogenase (LDH):** a atividade da LDH será determinada utilizando kit comercial da marca Labtest.

Como marcadores de lesão muscular, serão avaliadas as enzimas CK e a LDH e a formação de lactato, que avaliará rendimento.

### **3.10 Procedimento estatístico**

Inicialmente será testada a normalidade dos escores. Se a distribuição for normal, será utilizada a ANOVA two-way para medidas repetidas. Sendo o valor do F significativo, será utilizado o teste post-hoc de Tuckey. O teste de Kruskal-Wallis será utilizado se a distribuição não for paramétrica. O nível de significância aceito será de 5% e os escores serão apresentados como médias  $\pm$  desvios-padrão.



## 5 REFERÊNCIAS

- ALMAR, M.; VILLA, J.G.; CUEVAS, M.J.; RODRIGUEZ-MARROYO, J.A.; AVILA, C.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of oxidative damage in road cycling. **Free Radical Research**, v.36, n.3, p.247-53, 2002.
- AGUILAR-SILVA, R.H.; CINTRA, B.B.; MILANI, S.; MORAES, T.P.; TSUJI, H. Estado antioxidante do sangue como indicador da eficiência do treinamento em nadadores. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.10, n. 3, p. 07-11, 2002.
- BLOOMER, R.J.; GOLFARB, A.H; WIDEMAN, L.; MCKENZIE, M.J.; CONSITT, L.A. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. **Journal of Strength Conditioning Research**, v.19, n.2, p.276-285, 2005.
- BLOOMER, R.J.; GOLFARB, A.H; MCKENZIE, M.J. Oxidative stress response to aerobic exercise: comparison of antioxidant supplements. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.38, n.6, p.1098-1105, 2006.
- CARREIRO, D.M. **Entendendo a importância do processo alimentar**. 1º Ed. São Paulo: Referência Ltda, 2006. 319 p.
- CECARINI, V.; GEE, J.; FIORETTI, E.; AMICI, M.; ANGELETTI, M.; ELEUTERI, A.M.; KELLER, J.N. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1773, p.93-104, 2007.
- DE ANGELIS, R.C. Compostos bioativos e antioxidantes nos alimentos. **Nutrição em Pauta**, n. 65, p. 6-11, 2004.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica [da] Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan./Jun. 2004.
- EVANS, W.J. Vitamin E, vitamin C and exercise. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.72 (suppl), p.647-52, 2000.
- FARIA, A.; OLIVEIRA, J.; NEVES, P.; GAMEIRO, P.; SANTOS-BUELGA, C.; FREITAS, V.; MATEUS, N. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, p.6896-6902, 2005.
- FONSECA, A.B.P.B.L.; PASCHOAL, V. Prática de atividade física e a formação de radicais livres. **Revista Nutrição, Saúde & Performance: Anuário de Nutrição Esportiva**, p.45-47, 2004.
- FOSCHINI, D.; PRESTES, J.; CHARRO, M.A. Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v.9, n.1, p.101-106, 2007.

FRISARD, M.; RAVUSSIN, E. Energy metabolism and oxidative stress: impact on the metabolic syndrome and the aging process. **Endocrine**, v.29, n.1, p.27-32, 2006.

GLANER, M.F.; LIMA, W.A.; JOVITA, L.C.C. Ausência de desgaste agudo da musculatura em atletas amadores de triathlon. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v.11, n.1, p.37-42, 2009.

GOLDFARB, A.H. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.24, p.249-66, 1999.

GOMEZ-CABRERA, M.C.; GIMENO, A.; LLORET, A.; MIÑANA, J.B.; MÁRQUEZ, R.; VIÑA, J. Deporte de alta competición y dano oxidativo : papel de los nutrientes antioxidantes. **Antioxidante y Calidad de Vida**, 2000. Disponível em: <http://www.antioxidantes.com.ar/Home2.htm>. Acesso em 23 out 2008.

Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet*, v.344, n.8924, p.721-724, 1994.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. Free radicals in biology and medicine. 4° ed. New York: Oxford University Press, 2007. 851p.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p. 481-504, 2000.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, p. 2928–2935, 2005.

HOFFMANN, A.; ANTUNES, L.E.C. Grande potencial. *Revista Cultivar Frutas e Hortaliças*. 27° edição, ago/set, 2004. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=685>. Acesso em: 12 jun. 2009.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v.30, n.4, p.433-446, 2001.

JI, L.L. Antioxidants and stress oxidative in exercise. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.222, p.283-292, 1999.

KATO, Y.; MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; SHIMOMURA, Y.; OCHI, H.; MORI, Y.; OSAWA, T. Preparation of a monoclonal antibody to N(epsilon)-(hexanonyl) lysine: application to the evaluation of protective effects of flavonoid supplementation against exercise-induced oxidative stress in rat skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.274, n.2, p.389-393, 2000.

KATSUBE, N.; IWASHITA, K.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the Anthocyanins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.68 – 75, 2003.

KÖNIG, D.; WAGNER, K.H.; ELMADFA, I.; BERG, A. Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress. **Exercise Immunology Review**, v.7, p.108-33, 2001.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição [da] Pontifícia Universidade Católica de Campinas**, v.16, n.4, p. 433-441, Out./Dez. 2003.

LILA, M.A. Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.5, p.306-313, 2004.

MINATO, K.; MIYAKE, Y.; FUKUMOTO, S.; YAMAMOTO, K.; KATO, Y.; SHIMOMURA, Y.; OSAWA, T. Lemon flavonoid, eritrocin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. **Life Sciences**, v.72, n.14, p.1609-1616, 2003.

MORRILLAS-RUIZ, J.; ZAFRILLA, P.; ALMAR, M.; CUEVAS, M.J.; LÓPEZ, F.J.; ABÉLLAN, P.; VILLEGAS, J.A.; GONZÁLES-GALLEGO, J. The effects of an antioxidant-supplemented beverage on exercise-induced oxidative stress: results from a placebo-controlled Double-blind study in cyclists. **European Journal of Applied Physiology**, v. 95, p.543-549, 2005.

MOYER, R. A.; HUMMER, K.E.; FINN, C.E.; FREI, B.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p. 519-525, 2002.

PASCHOAL, V.; NAVES, A.; FONSECA, A.B.P.B. L. **Nutrição Clínica Funcional: do princípio a prática clínica**. São Paulo: Valéria Paschoal Editora Ltda, 2007. 319p.

PANZA, V.P.; WAZLAVIK, E.; SILVA, E.L. Fitoquímicos antioxidantes no esporte. **Revista Nutrição, Saúde & Performance: Anuário de Nutrição Esportiva Funcional**, p.25-29, 2007.

PASCHOAL, V.C.P. Radicais livres e exercícios físicos. **Journal of Biomolecular Medicine and Free Radicals**, v. 4, n.1, p.20-26, 1998.

PAYNE, T.J. Formulating with blueberries for health. **AACC Cereal Foods World**, v.50, n.5, p.262, 2005.

PHILLIPS, T.; CHILDS, A.C.; DREON, D.M.; PHINNEY, S.; LEEUWENBURGH, C. A dietary supplement attenuates IL-6 and CRP after eccentric exercise in untrained males. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.35, n.12, p.2032-2037, 2003.

PILACZYNSKA-SZCZESNIAK, L.; SKARPANSKA-STEINBORN, A.; DESKUR, E.; BASTA, P.; HOROSZKIEWICZ-HASSAN, M. The influence of choco berry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental

rowing ergometer exercise. **International of Journal Sport Nutritional and Exercise Metabolism**, v.14, p.48-58, 2005.

RAMOS, C.L.; POU, S.; BRITIGAN, B.E.; COHEN, M.S.; ROSEN, G.M. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.12, p.8307-8312, 1992.

RODRIGUES, H.G., DINIZ, Y.S., FAINE, L.A., ALMEIDA, J.A., FERNANDES, A.A.H., NOVELLI, E.L.B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração de colesterol HDL. **Revista de Nutrição [da] Pontifícia Universidade Católica de Campinas**, v. 13, s.3, p. 315-320, 2003.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; CAO, G.; OU, B.; PRIOR, R.L. Anthocyanin and Proanthocyanidin Content in Selected White and Red Wines. Oxygen Radical Absorbance Capacity Comparison with Nontraditional Wines Obtained from Highbush Blueberry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.4889-4896, 2003.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v.80, p.1094 –1117, 2000.

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, p.308-313, 2004.

SCHRAMM, D.D.; GERMAN, J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, n.10, p. 560-566, 1998.

SELLAPPAN, S., AKOH, C.C., KREWER, G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.2432-2438, 2002.

SILVA, L.A.; ROCHA, L.G.C.; SCHEFFER, D.; SOARES, F.S.; PINHO, C.A.; POLIZELLI, A.B.; SILVEIRA, P.C.L.; PINHO, R.A. Resposta de duas sessões de natação sobre parâmetros de estresse oxidativo em nadadores. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v.11, n.2, p.160-165, 2009.

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 e Desempenho Humano**, v.8, n.2, p.102-109, 2006.

SOUZA, T.P.; OLIVEIRA, P.R de; PEREIRA, B. Exercício físico e estresse oxidativo. Efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n.1, 2005.

TAKANAMI, Y.; IWANE, H.; KAWAI, Y.; SHIMOMITSU, T. Vitamin E supplementation and endurance exercise. Are there benefits? **Sports Medicine**, v.29, p.73-83, 2000.

TELESI, M.; MACHADO, F.A. A influência do exercício físico e dos sistemas antioxidantes na formação de radicais livres no organismo humano. **SaBios – Revista de Saúde e Biologia [da] Faculdade Integrado de Campo Mourão**, v. 3, n.1 p.40-49, 2008.

United States Department of Health and Human Services. Physical Activity and Health: A Report of The Surgeon General Atlanta, GA. U.S. **Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion**, The President's Council on Physical Fitness and Sports. 1996.

VOLEK, J.S.; KRAEMER, W.J.; RUBIN, M.R.; RUBIN, M.R.; GÓMEZ, A.L.; RATAMESS, N.A.; GAYNOR, P. L-Carnitine L-Tartrate supplementation favorably affects markers of recovery from exercise stress. **American Journal Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v.282, p.

## 6 ANEXOS

## ANEXO A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

---

Pesquisador responsável: PRISCILA CARDOSO MEIRELLES  
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – ESCOLA SUPERIOR DE EDUCAÇÃO FÍSICA  
Endereço: Rua Luís de Camões, 625 – CEP: 96055-630 - Pelotas/RS  
Telefone: (53) 3273-2752

---

Concordo em participar do estudo “Efeitos da suplementação com suco de mirtilo e exercício físico em marcadores de estresse oxidativo em indivíduos treinados”. Estou ciente de que estou sendo convidado a participar voluntariamente do mesmo.

**PROCEDIMENTOS:** Fui informado de que o objetivo geral será “verificar parâmetros biológicos do estresse oxidativo e perfil lipídico em indivíduos treinados submetidos a exercício aeróbio prolongado com e sem o uso de suplementação de suco de mirtilo”, cujos resultados serão mantidos em sigilo e somente serão usadas para fins de pesquisa.

**RISCOS E POSSÍVEIS REAÇÕES:** Fui informado que os riscos são mínimos em relação a prática do exercício físico e coleta sanguínea.

**BENEFÍCIOS:** O benefício de participar da pesquisa relaciona-se ao fato que os resultados serão incorporados ao conhecimento científico.

**PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:** Como já me foi dito, minha participação neste estudo será voluntária e poderei interrompê-la a qualquer momento.

**DESPESAS:** Eu não terei que pagar por nenhum dos procedimentos, nem receberei compensações financeiras.

**CONFIDENCIALIDADE:** Estou ciente que a minha identidade permanecerá confidencial durante todas as etapas do estudo.

**CONSENTIMENTO:** Recebi claras explicações sobre o estudo, todas registradas neste formulário de consentimento. Os investigadores do estudo responderam e responderão, em qualquer etapa do estudo, a todas as minhas perguntas, até a minha completa satisfação. Portanto, estou de acordo em participar do estudo. Este Formulário de Consentimento Pré-Informado será assinado por mim e arquivado na instituição responsável pela pesquisa.

Nome do participante/representante legal: \_\_\_\_\_ Identidade: \_\_\_\_\_

ASSINATURA: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR:** Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para perguntas e as respondi em sua totalidade. O participante compreendeu minha explicação e aceitou, sem imposições, assinar este consentimento. Tenho como compromisso utilizar os dados e o material coletado para a publicação de relatórios e artigos científicos referentes a essa pesquisa. Se o participante tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da ESEF/UFPel – Rua Luís de Camões, 625 – CEP: 96055-630 - Pelotas/RS; Telefone:(53)3273-2752.

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL \_\_\_\_\_

**RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO DA DISSERTAÇÃO  
APRESENTADA AO CURSO DE MESTRADO DA ESCOLA  
SUPERIOR DE EDUCAÇÃO FÍSICA, NA LINHA DE ATIVIDADE  
FÍSICA, NUTRIÇÃO E SAÚDE, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PELOTAS – RS**

**Março, 2011**

## 1. Introdução

Este trabalho foi desenvolvido para cumprir com as exigências do Programa de Pós-Graduação da Escola Superior de Educação Física (ESEF) da Universidade de Pelotas – RS, a nível de Mestrado, na linha de Atividade Física, Nutrição e Saúde. Para que isso fosse possível, algumas etapas foram desenvolvidas, estando descritas, a seguir.

## 2. Procedimentos para a realização da pesquisa

### 2.1 Elaboração e qualificação do projeto

O projeto de pesquisa foi elaborado especialmente para concorrer a vaga no curso de mestrado em Educação Física da ESEF/UFPEL, no ano de 2009, sendo revisado e discutido de forma individual, com o orientador e nas aulas de Prática de Pesquisa, onde havia a contribuição dos colegas e professores regentes.

Após o fechamento do projeto, o mesmo foi encaminhado ao Comitê de Ética da Escola Superior de Educação Física da UFPEL, sendo aceito sob o protocolo n°112/2010.

## 3. Desenvolvimento e coleta dos dados

### 3.1 Escolha da amostra e esporte estudados

A preferência por um esporte de longa duração e de componente preferencialmente aeróbio deu-se pelo fato de estudos anteriores mostrarem fortemente a ligação desse tipo de esporte com o objetivo do estudo. No primeiro momento, os sujeitos escolhidos foram corredores da ASCORP – Associação de Corredores de Rua de Pelotas. Devido a impossibilidades de alguns corredores, deu-se preferência a um grupo de ciclistas treinados que participam de competições regionais e estaduais, moradores das cidades de Pelotas e Rio Grande/RS.

Foram realizadas duas reuniões para apresentação do projeto e captação de interessados na participação. Assim, selecionou-se 23 indivíduos aptos a fazerem parte do estudo.

As exigências para participação foram ser do sexo masculino, com idade entre 18 e 36 anos, não estar consumindo nenhum suplemento antioxidante nos 6 meses anteriores ao estudo, estar treinando a pelo menos 12 meses e apresentar estimativa de consumo máximo de oxigênio igual ou superior a 60 mL/Kg.min. Houve duas perdas durante o estudo devido a lesões musculares, tendo uma amostra final de 21 indivíduos.

### 3.2 Seleção dos participantes da coleta e análise dos dados

A coleta de dados foi feita em dois momentos e cada um deles consistia de: realização do teste de esforço máximo, coleta sanguínea e centrifugação e armazenagem do sangue.

Para isso, contou-se com estudantes de Educação Física no acompanhamento do teste de esforço máximo, uma técnica em enfermagem que realizou todas as coletas sanguíneas e estudantes de Nutrição e Bioquímica para realizar a centrifugação e armazenamento do sangue coletado.

### 3.3 Avaliações

#### 3.3.1 Testes

Os testes de esforço máximo, coletas sanguíneas e centrifugação do sangue foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Exercício (LabFex) da ESEF/UFPEL. O estudo consistiu de dois momentos de teste e coletas sanguíneas, sendo:

- Teste 1 – antes do início da suplementação com mirtilo ou placebo: nos dias 20, 21, 27 e 28 de agosto de 2010.

Os indivíduos chegaram ao laboratório e foram orientados sobre o teste e coletas sanguíneas. Em seguida, foi passado o termo de consentimento livre e esclarecido para ser lido e, se concordado, assinado para poder participar do estudo. Logo a seguir, eles foram pesados e a coleta de sangue inicial (pré teste) foi feita. A frequência cardíaca de repouso foi verificada e anotada, assim como a cada

estágio de aumento de carga no teste. Após o término do teste, outra coleta sanguínea foi realizada (pós teste).

O sangue coletado foi levado imediatamente para a área do laboratório habilitada para centrifugação e armazenagem. Os procedimentos foram idênticos a todos os participantes. Os sujeitos saíam do laboratório com a suplementação de mirtilo ou placebo em mãos, para os três primeiros dias.

- Teste 2 – depois de quatro semanas da suplementação com mirtilo ou placebo: nos dias 17, 18, 23 e 24 de setembro de 2011.

No segundo teste, os indivíduos chegaram ao laboratório e logo já foram pesados e a coleta de sangue inicial (pré teste) foi feita. A frequência cardíaca de repouso foi verificada e anotada, assim como a cada estágio de aumento de carga no teste. Após o término do teste, outra coleta sanguínea foi realizada (pós teste).

O sangue coletado foi levado imediatamente para a área do laboratório habilitada para centrifugação e armazenagem. Os procedimentos foram idênticos a todos os participantes.

Os eritrócitos e plasma separados na centrifugação foram armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , no departamento de Biotecnologia da UFPEL.

### 3.3.2 Alimentação

Nos dias dos testes os sujeitos foram instruídos a realizarem a mesma refeição pré-teste, que consistia de:

#### **2h antes do teste**

- Leite – 1 copo 400ml com chocolate em pó
- Pão 4 fatias ou pão francês 2 unidades com margarina, alface e tomate.
- Banana 1 unidade

**OBS.:** o leite não é bem tolerado por alguns atletas antes do exercício. Ele pode ser substituído por iogurte ou café.

Durante os 30 dias de realização do estudo os indivíduos preencheram um recordatório alimentar autodescritivo para conhecimento da dieta habitual.

#### 4. Suplementação de mirtilo

##### 4.1 Estoque e armazenagem da fruta

A fruta foi estocada em freezer a -18°C usado exclusivamente para este fim.

##### 4.2 Preparação da suplementação e placebo

A preparação do suplemento de mirtilo e do placebo foi realizada no Laboratório de Fisiologia do Exercício (LabFex) da ESEF/UFPEL. Elas eram preparadas duas vezes/semana, a cada três ou quatro dias.

Suplementação de mirtilo: 50g de fruta inteira + 110 ml de água mineral + 10g de suco artificial de uva. Placebo: 150ml de água mineral + 15g de suco artificial de uva.

##### 4.3 Entrega da suplementação de mirtilo e placebo

As entregas eram feitas de três a quatro dias na Escola Superior de Educação Física.

#### 5. Análises bioquímicas

As análises bioquímicas das coletas sanguíneas foram realizadas nos seguintes locais, durante os meses de outubro a dezembro de 2011:

- Laboratório de Fisiologia do Exercício (LabFex) da ESEF/UFPEL;
- Laboratório de Análises de Metabólitos – Serviço de Genética HCPA/UFRGS.

#### 6. Digitação e análise dos dados

A digitação dos dados foi realizada no programa Excel, sendo analisados através do uso do programa STATA, versão 10.0. Os testes estatísticos foram escolhidos de acordo com os dados disponíveis.

## 7. Divulgação dos resultados

### 7.1 Divulgação para os participantes no estudo

Será organizada uma palestra para divulgação dos resultados aos participantes do estudo.

### 7.2 Divulgação para a imprensa local e regional

Os resultados serão divulgados em jornal local e no site da Universidade Federal de Pelotas.

ARTIGO

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE SUCO DE MIRTILO E EXERCÍCIO FÍSICO  
EM MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS TREINADOS**

Será encaminhado para a Revista Brasileira de Medicina do Esporte

(As normas para a publicação encontram-se após o artigo)

**Efeitos da suplementação de suco de mirtilo e exercício físico em marcadores  
de estresse oxidativo em indivíduos treinados**

**The effects of blueberry juice supplementation and physical exercise on  
markers of oxidative stress in trained individuals**

Priscila Cardoso Meirelles<sup>1</sup>, Airton José Rombaldi<sup>1,3</sup>, Alethéa Gatto Barschak<sup>2</sup>

**Título corrido:** Suplemento de mirtilo e estresse oxidativo de atletas

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Educação Física - Universidade Federal de Pelotas

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Universidade Federal de Pelotas.

<sup>3</sup> Grupo de Estudos em Epidemiologia da Atividade Física - Universidade Federal de Pelotas

Correspondência: Priscila Cardoso Meirelles

Endereço: Rua Luis de Camões, 635, Pelotas - RS

CEP: 96055-630

Telefone: (53) 3273.2752

E-mail: [meirellesnutri@gmail.com](mailto:meirellesnutri@gmail.com)

Número de palavras no resumo: 237

Número de palavras no texto: 3419

Número de referências: 37

Número de tabelas: 3

## RESUMO

A quantidade fisiológica de antioxidantes em um indivíduo pode não ser suficiente para prevenir o excesso de espécies reativas induzido pelo exercício físico e a presença de antioxidantes adicionais pode ser necessária para reduzir o dano oxidativo e muscular. O objetivo do nosso estudo foi verificar marcadores do estresse oxidativo em indivíduos treinados em exercício aeróbico prolongado com e sem o uso de suplementação de suco de mirtilo, fruta rica em antioxidantes. Vinte e um sujeitos, do sexo masculino, com idades entre 18 e 36 anos, ciclistas amadores treinados, foram submetidos a teste de esforço máximo e coletas sanguíneas antes e depois de trinta dias de suplementação com mirtilo (n=11) ou placebo (n=10). Para avaliar o dano oxidativo foram determinadas as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o conteúdo de carbonilas, bem como as enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Como marcadores de dano muscular foram avaliadas as enzimas creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH). Ainda, foram verificadas as concentrações séricas de colesterol total (CT) e as atividades da aspartato aminotransferase (AST/TGO) e alanina aminotransferase (ALT/TGP). Foram encontradas diferenças significativas nos valores da GPx ( $p=0,01$ ), CAT ( $p=0,03$ ) e CT ( $p=0,03$ ). A CK apresentou significância limítrofe ( $p=0,05$ ). TBARS, carbonilas, LDH, AST/TGO e ALT/TGP não mostraram diferença significativa em nenhum dos momentos avaliados. Concluímos que a suplementação de mirtilo pode ter auxiliado na proteção antioxidante do organismo de indivíduos treinados pelo aumento da capacidade antioxidante.

**Palavras-chave:** antioxidantes, lipoperoxidação, atletas

## ABSTRACT

The regular antioxidant reserve may not be sufficient to counterbalance the production of reactive species during exercise and additional antioxidants may be needed to reduce muscle and oxidative damage. The aim of this study was to investigate some markers of oxidative stress in trained individuals during prolonged aerobic exercise with and without blueberry (an antioxidant-rich fruit) juice supplementation. Twenty-one male trained cyclists, aged between 18 and 36 years, underwent a maximal exercise test and blood sampling before and after thirty days of supplementation with blueberry (n=11) or placebo (n=10). The markers of oxidative damage evaluated were thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and carbonyl, activity of antioxidant enzymes catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), markers of muscle damage creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH), and serum concentrations of cholesterol (TC), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT / SGPT). There were significant differences in the values of GPx ( $p=0.01$ ), CAT ( $p=0.03$ ) and CT ( $p=0.03$ ). CK difference was borderline ( $p=0.05$ ). TBARS, carbonyl, LDH, AST / SGOT and ALT/SGPT did not presented significant differences in any of the evaluations. We conclude that blueberry supplementation may have aided in the antioxidant protection of the body of trained subjects by the increased antioxidant capacity.

**Key-words:** antioxidants, lipid peroxidation, athletes

## INTRODUÇÃO

A nutrição é um dos fatores mais importantes para um bom rendimento no exercício físico. O esforço intenso e o consumo energético do treinamento e da competição desportiva impõem exigências incomuns na dieta do atleta. Sabe-se que os benefícios do exercício desaparecem com o esgotamento e a falta de treinamento. O exercício extenuante causa dano muscular e induz a elevação de enzimas citosólicas no plasma sanguíneo, tais como creatinaquinase (CK), aminotransferases e lactato desidrogenase (LDH), bem como promove a formação de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) que causam dano tecidual<sup>(1)</sup>. Essas espécies, além de contribuir para danos tissulares e celulares, podem prejudicar o desempenho do atleta<sup>(2)</sup>.

Mais atenção tem sido dada à atividade de antioxidantes naturais presentes em frutas e vegetais, porque esses componentes podem reduzir potencialmente o nível de estresse oxidativo nas células<sup>(3)</sup>, na medida em que as frutas, além dos nutrientes essenciais, fibras e uma série de micronutrientes, como os minerais e vitaminas, fornecem diversos componentes metabólicos secundários de natureza fenólica, denominados polifenóis<sup>(4)</sup>.

Os fenóis, especialmente os flavonoides<sup>(5)</sup> e as antocianinas<sup>(5, 6)</sup>, mostram uma grande capacidade para capturar radicais livres, atribuindo-se a eles um efeito benéfico ao organismo<sup>(7, 8)</sup>. Entre as plantas frutíferas, o grupo das pequenas frutas abrange várias espécies, dentre elas, as culturas do morango, framboesa, mirtilo e amora preta. Os frutos de mirtilo, também conhecido como *blueberry* ou *arándano*, são classificados como as frutas frescas mais ricas em antioxidantes já estudadas, tendo um conteúdo elevado de polifenóis tanto na casca quanto na polpa<sup>(9)</sup>. Sua riqueza em pigmentos antocianos, substâncias de alto poder antioxidante e

preventiva de doenças degenerativas, seu sabor único e sua cor inconfundível são fatores que atraem diretamente o consumidor<sup>(10)</sup>. As antocianinas são um grupo de pigmentos vegetais hidrossolúveis, amplamente distribuídos no reino vegetal. Seu espectro de cor vai do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons de púrpura<sup>(11)</sup>. A combinação das 11 antocianinas presentes no mirtilo responde por 56,3% do valor total da capacidade antioxidante<sup>(12)</sup>.

Considerando que há escassez de estudos que relacionem o uso de suplementos antioxidantes de frutas *in natura* com exercício físico e indivíduos treinados, o objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos da suplementação de suco de mirtilo e exercício físico em marcadores de estresse oxidativo em indivíduos treinados.

## MÉTODOS

Foi realizado um ensaio clínico randomizado e duplo cego. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Escola Superior de Educação Física da Universidade Federal de Pelotas, com o protocolo nº112/2010 e seguiu as normas específicas das pesquisas com humanos do Conselho Nacional de Saúde (196/96)<sup>(13)</sup>, onde todos os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram selecionados 23 indivíduos, de forma intencional, do sexo masculino, ciclistas, com idades entre 18 e 36 anos, que treinavam regularmente há, pelo menos, 12 meses, quatro vezes por semana, que apresentavam estimativa de consumo máximo de oxigênio acima de 60 mL/Kg.min e que não estivessem consumindo suplementos nutricionais antioxidantes por seis meses antes da realização do estudo. A alimentação dos sujeitos foi controlada através de um diário alimentar autodescritivo durante as quatro semanas do estudo. Durante o período do estudo ocorreram duas perdas devido a lesões musculares, sendo que 21 indivíduos fizeram parte da amostra final.

No primeiro dia, com os indivíduos “limpos” da suplementação ou placebo, foram coletadas as medidas de peso e altura e aplicado o teste em bicicleta ergométrica (marca ErgoFit), de modo a estimar o consumo máximo de oxigênio individual através de protocolo progressivo máximo e a coleta de sangue inicial (antes do teste de esforço máximo) e coleta de sangue final (depois do teste de esforço máximo). Foram coletados cinco mililitros de sangue por punção endovenosa em cada coleta, sendo divididos em dois tubos contendo EDTA. Logo após, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3000 X g, sendo o plasma e os eritrócitos separados. Os eritrócitos foram lavados três vezes com o dobro do

volume de NaCl 0,9%, centrifugando-se por cinco minutos a 3000 X g, após cada lavagem. Os eritrócitos obtidos foram diluídos na proporção de 1:10 (100uL de eritrócitos + 900 uL de água), congelados e armazenados em freezer – 80°C, assim como o plasma. Após a coleta final, os sujeitos foram divididos em dois grupos, sendo o grupo que recebeu placebo (n=10) e outro grupo que recebeu suplementação de mirtilo (n=11). Os sujeitos consumiram a solução placebo ou suplementação de mirtilo diariamente, no mesmo horário e na quantidade de 150mL/dia, por um período de quatro semanas. Foram oferecidos placebo e suplementação de mirtilo para três ou quatro dias, com a recomendação de armazenar em geladeira, sendo repostos no final destes. Após as quatro semanas, foi realizado o segundo teste de consumo máximo de oxigênio e as coletas sanguíneas no laboratório, com todos os procedimentos sendo identicamente iguais ao primeiro dia de teste.

A suplementação de mirtilo foi analisada no Laboratório de Cromatografia, departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPEL, para avaliar a capacidade antioxidante da suplementação oferecida e possíveis perdas do potencial antioxidante no decorrer dos quatro dias no qual o suco ficava armazenado. Foram feitas análises de antocianinas, fenois totais e atividade antioxidante do suco e da fruta na qual foi feita a suplementação.

A determinação da atividade da catalase (CAT)<sup>(14)</sup> foi determinada baseada na decomposição da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os eritrócitos lavados foram descongelados e centrifugados a 4.500 rpm por dez minutos. Utilizou-se o sobrenadante e diluiu-se 100x a amostra, sendo 10ul da amostra + 990ul de água. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Shimadzu - espectrofotômetro UV1800) acompanhada a 240nm,

à temperatura de 37°C, sendo zerado com 600µl do meio (50 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 + 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ) e 600µl do tampão fosfato de potássio 10mM pH 7,0, por 80 segundos em intervalos de dez segundos. Os resultados foram expressos em unidades de atividade para a catalase (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de proteína).

Para determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)<sup>(15)</sup> que tem como princípio que espécies reativas reagem com lipídeos de membrana e causam peroxidação com a consequente formação de malondialdeído, 100µl de plasma foram misturados com 50µl de SDS 8,1%, 375µl de ácido acético 20%, 375µl TBA 0,8% e 135µl de água. Esta mistura foi incubada a 100°C por uma hora. Após, foi centrifugada a 3000 rpm por dez minutos. O malondialdeído aquecido em presença de ácido tiobarbitúrico forma um composto corado que foi medido em espectrofotômetro (Biospectro SP-22) em 535nm. Os resultados foram expressos em nmol TBA/mg proteína.

O conteúdo de carbonilas foi avaliadoa espectrofotometricamente (Molecular Devices - SpectraMax M2) no plasma segundo Reznick e Packer<sup>(16)</sup>. Cem microlitros de plasma foram tratados com 1 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM dissolvidos em HCl 2,5 M ou com 1 mL de HCl 2,5 M (branco) e deixados no escuro por 90 minutos. As amostras foram, então, precipitadas com 500 µL de TCA a 20% e centrifugadas por cinco minutos a 8000 g. O sobrenadante foi lavado com 1 mL de etanol:acetato de etila (1:1, V/V) e dissolvido em 200 µL de guanidina 6 M preparada em tampão fosfato 20 mM pH 2,3. A diferença entre as amostras tratadas com DNPH e as amostras tratadas com HCl (branco) foi usada para calcular o conteúdo

de carbonil, a 370 nm. Os resultados foram calculados como nmol de grupos carbonil/mg de proteína.

A determinação da atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx) foi realizada a partir do Kit Ransel, Reino Unido e os resultados lidos em espectrofotômetro (Molecular Devices - SpectraMax M2). Também, foram determinadas as medidas das enzimas creatina quinase (CK) (Kit CK-Nac liquiform, Labtest Diagnóstica), lactato desidrogenase (LDH) (Kit Desidrogenase láctica, Labtest Diagnóstica), transaminase pirúvica (TGP/ASL) (Kit Transaminase pirúvica, Labtest Diagnóstica), transaminase oxaloacética (TGO/AST) (Kit Transaminase oxaloacética, Labtest Diagnóstica) e o colesterol total (CT) (Kit Colesterol liquiform, Labtest Diagnóstica). Foi utilizado espectrofotômetro da marca Biospectro SP-22 para leitura de todas as análises feitas com kit Labtest Diagnóstica.

O pacote estatístico STATA 10.0 foi utilizado para análise dos dados. Inicialmente foi testada a normalidade dos escores. Quando a distribuição foi normal, foi utilizado o teste “t”. Quando a distribuição não seguiu a curva normal, utilizou-se o teste não-paramétrico equivalente. O nível de significância aceito foi de 5% e os escores estão expressos como médias  $\pm$  desvios-padrão.

## RESULTADOS

As principais características da amostra podem ser visualizadas na tabela 1. A amostra estudada mostrou ser homogênea, não tendo variação significativa nas medidas de peso e altura nos dois grupos. Além disso, as medidas de  $VO_2$ max e frequência cardíaca de repouso também não mostraram nenhuma diferença significativa. A dieta dos participantes teve como média do valor energético total  $2817,37 \pm 264,91$  calorias diárias, sendo  $17,66 \pm 2,08\%$  de proteínas,  $28,08 \pm 11,90\%$  de lipídeos e  $54,26 \pm 12,60\%$  de carboidratos. Na tabela 2 são apresentadas as análises de antocianinas, fenois totais e atividade antioxidante do suco e da fruta mirtilo com o qual foi feita a suplementação. O mirtilo utilizado no estudo mostrou possuir capacidade antioxidante significativa, de acordo com estudos realizados para avaliar o potencial antioxidante da fruta<sup>(6, 12)</sup>.

A tabela 3 apresenta as médias e desvios-padrão das variáveis estudadas antes e depois das quatro semanas de suplementação com mirtilo e placebo. Houve diferença significativa entre os grupos, antes e depois da suplementação, no grupo suplementado com mirtilo, em relação às enzimas antioxidantes GPx ( $p=0,01$ ; antes da suplementação =  $8,69 \pm 2,44$  U/mg proteína; depois da suplementação =  $14,07 \pm 5,73$  U/mg proteína), e CAT ( $p=0,03$ ; antes da suplementação =  $2,28 \pm 2,36 \cdot 10^{-15}$  U/mg/proteína; depois da suplementação =  $2,39 \pm 2,48 \cdot 10^{-15}$  U/mg/proteína).

Ainda na tabela 3 se pode observar que os níveis de colesterol total também mostraram diferença significativa entre os grupos ( $p=0,03$ ), mostrando um aumento no grupo suplementado (antes suplementação =  $220,19 \pm 146,02$  mg/dl; depois suplementação =  $253,30 \pm 106,43$  mg/dl) e uma redução no grupo placebo (antes suplementação =  $277,82 \pm 121,64$  mg/dl; depois suplementação =  $183,65 \pm 63,11$  mg/dl). A análise da CK indicou diferença limítrofe ( $p=0,05$ ) e as

análises do TBARS, carbonilas, TGO, TGP e LDH não apresentaram diferença significativa.

## DISCUSSÃO

Os pontos fortes do nosso estudo estão relacionados com o fato de ser um ensaio clínico randomizado e duplo cego, testando uma fonte nutricional para uso esportivo. Os pontos fracos são o pequeno tamanho de amostra, que implica na perda de poder estatístico, além do não controle da dieta dos sujeitos durante o período do estudo.

Tem sido mostrado que exercícios físicos de longa duração e alta intensidade, com uma alta contribuição de metabolismo aeróbio, colaboram para um aumento na produção de ERO<sup>(17, 18, 19)</sup>. O equilíbrio entre as exigências fisiológicas do exercício e a disponibilidade de fatores nutricionais é essencial para a homeostase dos sistemas corporais responsáveis pela manutenção da saúde e do desempenho físico<sup>(20)</sup>. A quantidade fisiológica de antioxidantes em um indivíduo pode não ser suficiente para prevenir o excesso de espécies reativas induzido pelo exercício físico e a presença de antioxidantes adicionais pode ser necessária para reduzir o dano oxidativo, dano muscular e processo inflamatório<sup>(21)</sup>.

Neste estudo fizemos a opção pela suplementação com mirtilo (cultivares Powderblue e Bluegen, grupo rabiteye), também conhecido como *blueberry*, por ser uma das variedades de frutas que possui maior capacidade antioxidante<sup>(6, 12)</sup> e por ser uma alternativa, relacionada a estresse oxidativo, pouco explorada no âmbito esportivo quando comparada às vitaminas C e E, por exemplo. Alguns estudos já comprovaram o efeito de outras frutas e vegetais na redução do estresse oxidativo em indivíduos treinados<sup>(18, 22, 23)</sup>.

As enzimas antioxidantes GPx e CAT fazem parte do sistema de defesa antioxidante enzimático do organismo, que tem como principal função inibir ou reduzir os danos causados às células pelas espécies reativas<sup>(24)</sup>. O nosso estudo

mostrou uma diferença significativa ( $p=0,01$ ) na atividade da enzima GPx após o exercício, comparando antes e depois da suplementação, mostrando um aumento maior da enzima no grupo mirtilo. Alguns estudos avaliam a relação entre a glutathiona reduzida e a glutathiona oxidada (GSH/GSSG), como uma forma de corroborar a atividade da GPx relacionada à proteção contra o estresse oxidativo. Rebelatto *et al.*<sup>(25)</sup> estudaram um grupo de idosos que praticavam exercício físico leve, onde metade utilizou um suplemento antioxidante e a outra metade placebo, mostrando uma redução significativamente diferente ( $p<0,001$ ) na relação GSH/GSSG no grupo placebo, sendo onde a atividade da GPx foi maior. Panza *et al.*<sup>(26)</sup> utilizaram o chá verde como suplementação antioxidante por 7 dias em indivíduos treinados do sexo masculino mostrando um aumento da enzima glutathiona redutase (GR). A GR é essencial para o processo antioxidante, pois ela regenera a GSH necessária para que a GPx atue e elimine os radicais livres, sendo uma enzima complementar da outra. Esse estudo confirma os nossos resultados, mas somente poderíamos ter certeza se a atividade da GR fosse determinada. Fatouros *et al.*<sup>(27)</sup> estudaram o comportamento da enzima GPx em jogadores de futebol antes, um minuto, 24 e 48 horas após uma partida de futebol e mostrou diferença significativa na GPx ( $p<0,05$ ) um minuto após o fim do jogo, comparado ao grupo controle, concordando com os nossos achados, apesar de não ter usado nenhum tipo de intervenção relacionado à suplementação antioxidante. Outros estudos<sup>(18, 28)</sup> contrariam nossos achados, mostrando uma redução na enzima GPx após o exercício no mesmo período de tempo do nosso estudo consumindo suplemento antioxidante. Este resultado pode ser relacionado ao tipo de antioxidante utilizado, pois o aumento em algum antioxidante solúvel pode combater os radicais livres e dessa forma não é necessário que as enzimas aumentem a sua atividade.

Também, nos dois estudos, o esporte praticado foi o remo, diferenciando do esporte praticado por nossos sujeitos.

A análise da CAT revelou uma diferença significativa ( $p=0,03$ ) no pré exercício, comparando o antes e depois da suplementação entre os grupos, mostrando um aumento no grupo mirtilo. De acordo com os resultados, a contribuição da suplementação de mirtilo, rica em compostos antioxidantes, na ativação ou atuação da enzima pode ser uma das explicações para o aumento da GPx e CAT em nosso estudo. Um estudo<sup>(19)</sup> mostra o aumento da CAT após exercício físico, mas sem nenhuma intervenção com suplementos. Em nosso estudo, houve um aumento da CAT após o exercício antes da intervenção, mas não significativo. Outro estudo<sup>(29)</sup> avaliou o comportamento da enzima CAT em jovens do sexo masculino, que praticaram 20 minutos de exercício em bicicleta ergométrica, durante três dias, em intensidades diferentes a cada dia (60, 70 e 80% da frequência cardíaca máxima), mostrando uma diferença significativa na redução da enzima, comparando o pré e pós exercício. Isto pode ser devido a uma alta produção de espécies reativas durante o exercício que excedeu a capacidade de detoxificação da enzima e, também, por não ter sido usado nenhum componente antioxidante exógeno. Considerando a intervenção com suplementos, encontramos um estudo<sup>(30)</sup> que avaliou a CAT em neutrófilos após suplementação com *Limonete* (*Lippia citriodora*) por 21 dias. Quinze jovens praticantes de corrida foram divididos em dois grupos, um consumiu o extrato de *Limonete* ( $n=8$ ) e outro grupo consumiu placebo ( $n=7$ ). Foram feitas coletas sanguíneas antes e depois dos 21 dias de suplementação e durante este período eles praticavam de 14,5-16,5 km de corrida, três vezes por semana. A CAT mostrou um aumento significante de 67% no grupo placebo e de 32% no grupo suplementado.

Em nosso estudo, os achados relacionados à peroxidação lipídica vão ao encontro a Morrillas-Ruiz *et al.*<sup>(17)</sup> e Murphy *et al.*<sup>(31)</sup>, onde não foi encontrada diferença significativa nas concentrações séricas de TBARS induzidas pelo exercício, utilizando uma suplementação antioxidante durante um período de tempo. No entanto, houve quem tenha relatado resultados discordantes dos nossos. Nesse sentido, Lamprech *et al.*<sup>(32)</sup> estudando ciclistas do sexo masculino e utilizando por duas semanas um suplemento antioxidante e após um período de “limpeza” observaram aumento nas concentrações de malondialdeído (MDA), um produto utilizado para apontar oxidação lipídica, após o exercício exaustivo. O aumento no TBARS também é demonstrado em praticantes de exercício moderado, como mostraram Rebelatto *et al.*<sup>(25)</sup> em um estudo com idosas, exercício físico e suplemento antioxidante. Por outro lado, redução desse parâmetro é demonstrada no estudo de Pilaczynska *et al.*<sup>(18)</sup> com atletas de remo, onde houve redução do TBARS após 4 semanas de suplementação com chokeberry, após 1 min e 24h depois do exercício físico. Nos estudos com exercício físico e peroxidação lipídica sem o uso de suplementação antioxidante, os relatos são de aumento do TBARS<sup>(19,33)</sup>. As razões pelas quais podem levar a esses resultados discordantes em relação ao nosso estudo é o fato de o tipo de exercício e intensidade ser diferentes, o período de suplementação dos atletas ser menor, além de alguns deles não utilizarem nenhuma intervenção com suplemento antioxidante.

As carbonilas, marcadores de oxidação proteica, também não demonstraram nenhuma diferença significativa em nenhum dos momentos analisados. No estudo de Pinho *et al.*<sup>(19)</sup>, além do TBARS, também foi mostrada diferença significativa nas carbonilas, comparando as medidas de antes e depois de uma corrida de Ironman, notando-se um aumento da variável (pré prova  $0,15 \pm 0,60$  nmol/mg proteína; pós

prova  $0,67 \pm 0,12$  nmol/mg proteína), sem a utilização de suplementos antioxidante. Já Bloomer *et al.*<sup>(23)</sup>, após utilização de dois tratamentos antioxidantes e um placebo, relacionado a exercício físico, encontraram diferença significativa nas carbonilas, mostrando uma redução nesse marcador nos dois tratamentos antioxidantes. Os achados ainda são muito contraditórios, podendo considerar que o aumento das enzimas antioxidantes e nenhum dano oxidativo significativo pode estar relacionado ao efeito adaptativo do organismo após sessões de exercício<sup>(19)</sup>, além da concentração de antioxidantes da fruta mirtilo utilizada no nosso estudo.

Os métodos utilizados para análise dos danos causados ao músculo induzidos pelo exercício físico, podem ser efetuados através de medidas das enzimas CK e LDH. Em nosso estudo não encontramos diferença significativa na medida da LDH em nenhum dos momentos avaliados. Já em relação a CK, foi encontrada uma significância limítrofe ( $p=0,05$ ) quando comparado o pré e pós exercício no grupo placebo, antes de iniciada a suplementação. Estudo<sup>(32)</sup> feito com nadadores mostrou um aumento significativo ( $p<0,05$ ) da CK logo após uma sessão de natação de 60 minutos ( $1143,8 \pm 242,2$  U/L) quando comparado a pré prova ( $111,2 \pm 33,2$  U/L). Outro estudo<sup>(34)</sup> também teve uma diferença significativa no aumento da CK após uma prova de Ironman, quando comparado a pré ( $112,2 \pm 34,9$  U/L) com a pós competição ( $458,2 \pm 204,9$  U/L). Phillips *et al.*<sup>(35)</sup> estudaram o comportamento da CK e LDH em exercício excêntrico e com a intervenção de um suplemento rico em flavonoides comparado a um placebo, mostrando um aumento significativo ( $p<0,001$ ) da CK e LDH três dias depois do início das sessões de exercício, se comparado ao período de base (sete dias antes do início das sessões), mas não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos placebo e suplementado. O aumento da LDH também foi mostrado em outro estudo<sup>(36)</sup> com

exercício excêntrico durante sete dias, mostrando uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a medida antes do início das sessões de exercício e o quarto dia.

Em relação ao colesterol total foi encontrado em nosso estudo uma diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,03$ ) no pré exercício, comparando o antes e o depois da suplementação com mirtilo, mostrando um aumento no colesterol total do grupo suplementado e uma redução no grupo placebo. Um estudo<sup>(25)</sup> realizado com 68 mulheres idosas vai contra os nossos achados. Os sujeitos praticavam atividade física três vezes por semana, sendo 55 minutos cada sessão. O comportamento do colesterol total quando consumido um suplemento antioxidante comercial comparado a grupo controle, não mostrou diferença significante entre os grupos, além de mostrar uma redução do colesterol total no grupo suplementado (antes suplementação =  $224 \pm 4$  mg/dl; depois suplementação =  $213 \pm 7$  mg/dl). Essa diferença entre os resultados dos dois estudos pode ser devido as diferentes idades e sexo dos indivíduos e, também, os sujeitos do nosso estudo eram indivíduos treinados que praticavam exercício físico intenso, quando comparado a atividade física leve das idosas.

As enzimas AST/TGO e ALT/TGP são enzimas intracelulares de aminotransferência presentes em grandes quantidades nos hepatócitos. Após uma lesão ou destruição das células hepáticas, são liberadas na circulação<sup>(37)</sup>. Em nosso estudo não foi achada nenhuma diferença significativa nas duas enzimas em nenhum dos momentos avaliados. Poucos estudos relacionam exercício físico, suplementação antioxidante e enzimas hepáticas. O estudo de Phillips *et al.*<sup>(35)</sup> corrobora com os nossos achados, não mostrando diferença significativa nas medidas das enzimas AST/TGO e ALT/TGP, onde foi estudada a prática de

exercício excêntrico e o uso de uma suplementação antioxidante comparada a um grupo placebo.

Desta maneira, concluímos que o consumo de suplementação de suco de mirtilo em ciclistas treinados limitou o estresse oxidativo gerado pelo exercício físico, provavelmente, pelo aumento da capacidade antioxidante endógena e pelos marcadores de peroxidação lipídica e protéica mostrarem-se inalterados.

## REFERÊNCIAS

1. Gomez-Cabrera MC, Gimeno A, Lloret A, Miñana JB, Márquez R, Viña J. Deporte de alta competición y dano oxidativo : papel de los nutrientes antioxidantes. Antioxidante y Calidad de Vida, 2000. Disponível em: <http://www.antioxidantes.com.ar/Home2.htm>. Acesso em 23 out 2008.
2. Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. Revista de Nutrição da Pontifícia Universidade Católica de Campinas. 2003;16:433-41, Out./Dez. 2003.
3. Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2005;53:2928–35.
4. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 2000;55:481-504.
5. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry 2002;13:572-4.
6. Moyer RA, Hummer KE, Finn CE, Frei B, Wrolstad RE. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2002;50:519-25.
7. Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by tree distincts mechanisms. Free Radical Biology and Medicine 2001;30:433-46.
8. Katsube N, Iwashita K, Tsushida T, Yamaki K, Kobori M. Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the Anthocyanins. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2003;51:68 – 75.

9. Payne TJ. Formulating with blueberries for health. *AACC Cereal Foods World* 2005;50:262.
10. Hoffmann A, Antunes LEC. Grande potencial. *Revista Cultivar Frutas e Hortaliças*. 2004; 27 nd. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=685>. Acesso em: 12 jun. 2009.
11. Degáspari CH, Waszczyntyj N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica [da] Universidade Federal do Paraná* 2004;5:33-40.
12. Sellappan S, Akoh CC, Krewer G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 2002;50:2432-8.
13. Resolução 196 de 10 de outubro de 1996. Brasília: Conselho Nacional de Saúde. Ministério da Saúde, 1996.
14. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 1984;105:121-6.
15. Buege JA, August SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 1978;52: 302-10.
16. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymology* 1994;233:357-63.
17. Morrillas-Ruiz J, Zafrilla P, Almar M, Cuevas MJ, López FJ, et al. The effects of an antioxidant-supplemented beverage on exercise-induced oxidative stress: results from a placebo-controlled Double-blind study in cyclists. *European Journal of Applied Physiology* 2005;95:543-9.
18. Pilaczynska-Szczesniak L, Skarpanska-Steinborn A, Deskur E, Basta P, Horoszkiewicz-Hassan M. The influence of choco berry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental rowing ergometer

exercise. International of Journal Sport Nutritional and Exercise Metabolism 2005;14:48-58.

19. Pinho RA, Silva LA, Pinho CA, Scheffer DL, Souza CT, Benetti M, et al. Oxidative stress and inflammatory parameters after an ironman race. Clinical Journal of Sports and Medicine 2010;20:306-11.

20. Volek JS, Kraemer WJ, Rubin MR, Gómez AL, Ratamess NA, Gaynor P. L-Carnitine L-Tartrate supplementation favorably affects markers of recovery from exercise stress. American Journal Physiology- Endocrinology and Metabolism 2002;282:474-82.

21. König D, Wagner KH, Elmadfa I, Berg A. Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress. Exercise Immunology Review 2001;7:108-33.

22. Mcanulty SR, Mcanulty LS, Nieman DC, Dumke CL, Morrow JD, Utter AC, et al. Consumption of blueberry polyphenols reduces exercise induced oxidative stress compared to vitamin C. Nutrition Research 2004;24:209–21.

23. Bloomer RJ, Golfarb AH, Mckenzie MJ. Oxidative stress response to aerobic exercise: comparison of antioxidant supplements. Medicine and Science in Sports and Exercise 2006;38:1098-1105.

24. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. 4 nd. ed. Oxford University Press: New York, 2007.

25. Rebelatto JR, Jimenez R, Delgado MA, Muguierza B, Munoz ME, Galan AI, et al. Antioxidantes, Atividade Física e Estresse Oxidativo em Mulheres Idosas. Revista Brasileira de Medicina do Esporte 2008;14:8-11.

26. Panza VSP, Wazlavik E, Schutz GR, Comin L, Hecht KC, Silva EL. Fitoquímicos antioxidantes no esporte. Consumption of Green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. *Nutrition* 2008;433-42.
27. Fatouros IG, Chatzinikolaou A, Douroudos II. Time-course of changes in oxidative stress and antioxidant status responses following a soccer game. *Journal of Strength and Conditioning Research* 2004;24:3278-86.
28. Teixeira VH, Valente HF, Casal SI, Marques M, Moreira PA. Antioxidants do not prevent postexercise peroxidation and may delay muscle recovery. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2009;41:1752-60.
29. Castro MAC, Cavalcanti Neto FF, Lima LMC, Silva FM, Oliveira RJ, Zanesco A. Production of free radicals and catalase activity during acute exercise training in young men. *Biology of Sport* 2009;26:113-8.
30. Funes L, Quintanar L.C, Calero MC, Ferrer MD, Drobnic F, Pons A, et al. Effect of lemon verbena supplementation on muscular damage markers, proinflammatory cytokines release and neutrophils' oxidative stress in chronic exercise. *European Journal of Applied Physiology* 2010.
31. Murphy KJ, Chronopoulos IS, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, et al. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *The American Journal Clinical Nutrition* 2003;77:1466-73.
32. Lamprecht M, Hofmann P, Greiberger JF, Schwabegger G. Increased lipid peroxidation in trained men after 2 weeks of antioxidant supplementation. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 2009;19:385-99.
33. Silva LA, Rocha LGC, Scheffer D, Soares FS, Pinho CA, Polizelli AB, et al. Resposta de duas sessões de natação sobre parâmetros de estresse oxidativo em

nadadores. Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano 2009;11:160-5.

34. Glaner MF, Lima WA, Jovita LCC. Ausência de desgaste agudo da musculatura em atletas amadores de triathlon. Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano 2009;11:37-42.

35. Phillips T, Childs AC, Dreon DM, Phinney S, Leeuwenburgh C. A dietary supplement attenuates IL-6 and CRP after eccentric exercise in untrained males. Medicine and Science in Sports and Exercise 2003;35:2032-7.

36. Chen TC, Hsieh SS. Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation. Medicine & Science in Sports & Exercise 2001;33:1732-8.

37. Bennett JC, Andreoli TE, Plum F, Carpenter CCJ. Cecil: Medicina Interna Básica 4 edição. ed Guanabara koogan S.A: Rio de Janeiro, 1998.

Tabela 1 – Características gerais dos grupos estudados (média ± desvio padrão).

	Grupo placebo (n=10)	Grupo mirtilo (n=11)
Idade (anos)	29,40 ± 6,34	29,27 ± 5,46
Peso antes 30 dias (Kg)	72,60 ± 6,29	71,58 ± 5,62
Peso depois 30 dias (Kg)	72,25 ± 6,34	71,52 ± 6,31
Estatura (m)	1,70 ± 0,04	1,74 ± 0,06
VO <sub>2</sub> max antes 30 dias (mL/Kg.min)	66,50 ± 6,16	66,50 ± 8,28
VO <sub>2</sub> max depois 30 dias (mL/Kg.min)	68,80 ± 7,47	66,78 ± 8,80
FC repouso antes 30 dias (bpm)	89,80 ± 13,15	84,81 ± 16,50
FC repouso depois 30 dias (bpm)	95,70 ± 12,78	89,63 ± 19,40

VO<sub>2</sub>max - Consumo máximo de oxigênio; FC - frequência cardíaca

Tabela 2 – Capacidade antioxidante da suplementação de mirtilo e fruta in natura (média)

Mirtilo	Antocianinas mg cianidina 3- glicose/100g	Fenois totais mg/100g	Atividade antioxidante mg eq. Trolox/100g
Fruta in natura	152,65	164,60	94,36
Suco 1º dia	23,91	49,90	25,60
Suco 4º dia	26,36	62,49	31,26

Tabela 3 – Média e desvio padrão das enzimas antioxidantes, marcadores de oxidação, dano muscular, enzimas hepáticas e colesterol total (média ± desvios padrão)

	Antes da suplementação				Depois da suplementação				p
	Placebo (n=10)		Suplemento (n=11)		Placebo (n=10)		Suplemento (n=11)		
	Pré exercício	Pós exercício	Pré exercício	Pós exercício	Pré exercício	Pós exercício	Pré exercício	Pós exercício	
GPx	10,24±1,25	10,12±1,74*	9,69±0,63	8,69±2,44*	9,92±1,40	10,94±2,50*	10,73±0,81	14,07±5,73*	0,01
CAT	2,42±2,54 <sup>#</sup>	3,19±3,27	2,28±2,36 <sup>#</sup>	1,57±0,29	2,40±2,51 <sup>#</sup>	2,43±2,68	2,39±2,48 <sup>#</sup>	2,50±2,46	0,03
TBARS	855,93±1240,36	744,53±1064,91	374,23±310,48	322,86±220,15	434,31±314,66	396,49±413,76	366,43±247,73	1332,18±3349,99	>0,05
Carbonilas	1031,76±1511,80	943,61±1060,64	430,73±281,29	454,53±234,17	567,51±510,78	536,55±343,73	422,11±184,07	430,45±355,38	>0,05
CK	458,10±835,95 <sup>0</sup>	551,11±1029,44 <sup>0</sup>	250,81±160,24	233,00±121,33	308,10±315,59	345,60±354,44	219,33±138,20	244,36±152,09	0,05
LDH	410,90±227,72	522,11±333,01	349,81±136,64	489,30±325,46	325,7±93,37	392,60±104,35	267,6±66,16	340,45±82,52	>0,05
AST/TGO	105,62±55,99	123,94±65,34	84,17±11,69	102,81±14,28	94,20±30,28	115,14±41,35	77,57±13,63	99,10±16,74	>0,05
ALT/TGP	28,66±23,72	30,05±28,51	19,75±11,87	30,52±11,72	21,66±12,30	30,82±17,02	11,39±7,64	25,01±8,15	>0,05
CT	277,82±121,64 <sup>&amp;</sup>	244,08±81,41	220,19±146,02 <sup>&amp;</sup>	274,40±170,72	183,65±63,11 <sup>&amp;</sup>	286,24±157,95	253,30±106,43 <sup>&amp;</sup>	256,91±217,22	0,03

Unidades de medida: GPx (U/mg proteína), CAT ( $\cdot 10^{-15}$  U/mg proteína), TBARS (nmol/mg proteína), Carbonilas (nmol/mg proteína), CK (U/L), LDH (U/L), AST/TGO (U/ml), ALT/TGP (U/ml), CT (mg/dl)

\* = diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no pós exercício depois da suplementação em relação ao pós exercício antes da suplementação, entre os grupos – teste de Mann-Whitney.

<sup>#</sup> = diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no pré exercício depois da suplementação em relação ao pré exercício antes da suplementação, entre os grupos – teste de Mann-Whitney.

<sup>0</sup> = diferença significativa limítrofe ( $p = 0,05$ ) no pós exercício em relação ao pré exercício antes da suplementação, entre os grupos – teste de Mann-Whitney.

<sup>&</sup> = diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no pré exercício depois da suplementação em relação ao pré exercício antes da suplementação, entre os grupos – teste “t”.

**REVISTA BRASILEIRA DE MEDICINA DO ESPORTE -  
- NORMAS EDITORIAIS -**



A Revista Brasileira de Medicina do Esporte (RBME) é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Exercício e do Esporte (SBME), com publicação bimestral. A missão da RBME é disseminar a produção científica nas áreas de ciências do exercício e do esporte, através da publicação de resultados de pesquisas originais e de outras formas de documentos que contribuam para o conhecimento fundamental e aplicado em atividade física, exercício e esporte no âmbito das ciências biológicas e da medicina.

Serão considerados para publicação artigos originais, artigos de opinião, artigos de revisão, relatos de experiência, relatos de casos ou cartas ao editor, sobre assuntos relacionados com as áreas de Medicina e Ciências do Exercício e do Esporte. Ser membro da SBME não representa um pré-requisito para publicação na RBME, nem influencia a decisão do Conselho Editorial. Serão aceitos artigos escritos na língua portuguesa e, a critério do Conselho Editorial, autores e grupos estrangeiros poderão publicar artigos escritos em inglês. Todos os artigos serão publicados na íntegra, sendo responsabilidade da RBME a produção das versões estrangeiras.

A RBME adota as regras de preparação de manuscritos da Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36-47), cuja última atualização, realizada em 2010, está disponível na internet (<http://www.icmje.org>).

## **DUPLA SUBMISSÃO**

Os artigos submetidos à RBME serão considerados para publicação somente com a condição de que não tenham sido publicados ou não estejam em processo de avaliação para publicação em outro periódico, seja na sua versão integral ou em parte. A RBME não considerará para publicação artigos cujos dados tenham sido disponibilizados na internet para acesso público. Se houver no artigo submetido algum material em figuras ou tabelas já publicado em outro local, a submissão do artigo deverá ser acompanhada de cópia do material original e da permissão por escrito para reprodução do material.

## **CONFLITO DE INTERESSE**

Os autores deverão explicitar, através de formulário próprio (Divulgação de potencial conflito de interesses), qualquer potencial conflito de interesse relacionado ao artigo submetido, conforme determinação da Agência Nacional de Vigilância

Sanitária (RDC 102/ 2000) e do Conselho Federal de Medicina (Resolução nº 1.595/2000). Esta exigência visa informar os editores, revisores e leitores sobre relações profissionais e/ou financeiras (como patrocínios e participação societária) com agentes financeiros relacionados aos produtos farmacêuticos ou equipamentos envolvidos no trabalho, os quais podem teoricamente influenciar as interpretações e conclusões do mesmo. A existência ou não de conflito de interesse declarado estarão ao final de todos os artigos publicados.

## **BIOÉTICA DE EXPERIMENTOS COM SERES HUMANOS**

A realização de experimentos envolvendo seres humanos deve seguir a resolução específica do Conselho Nacional de Saúde (nº 196/96) disponível na internet (<http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso196de96.doc>), incluindo a assinatura de um termo de consentimento informado e a proteção da privacidade dos voluntários.

## **BIOÉTICA DE EXPERIMENTOS COM ANIMAIS**

A realização de experimentos envolvendo animais deve seguir resoluções específicas (Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e Decreto nº 24.645 de 10 de julho de 1934).

## **ENSAIOS CLÍNICOS**

Os artigos contendo resultados de ensaios clínicos deverão disponibilizar todas as informações necessárias à sua adequada avaliação, conforme previamente estabelecido. Os autores deverão referir-se ao "CONSORT" ([www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org)).

## **REVISÃO PELOS PARES**

Todos os artigos submetidos serão avaliados, por revisores com experiência e competência profissional na respectiva área do trabalho e que emitirão parecer fundamentado, os quais serão utilizados pelos Editores para decidir sobre a aceitação do mesmo. Os critérios de avaliação dos artigos incluem: originalidade, contribuição para corpo de conhecimento da área, adequação metodológica, clareza e atualidade. Considerando o crescente número de submissões à RBME, artigos serão também avaliados quanto à sua relevância no que tange à contribuição para o conhecimento específico na área. Assim, artigos com adequação metodológica e resultados condizentes poderão não ser aceitos para publicação quando julgados como de baixa relevância pelos Editores. Tal decisão de recusa não estará sujeita a recurso ou contestação por parte dos autores. Os artigos aceitos para publicação poderão sofrer revisões editoriais para facilitar sua clareza e entendimento sem alterar seu conteúdo.

## **CORREÇÃO DE PROVAS GRÁFICAS**

Logo que prontas, as provas gráficas (layout) em formato eletrônico serão enviadas, por e-mail, para o autor responsável pelo artigo. Os autores deverão devolver, também por e-mail, a prova gráfica (layout) com as devidas correções em,

no máximo, 48 horas após o seu recebimento. O envio e o retorno das provas gráficas por correio eletrônico visa agilizar o processo de revisão e posterior publicação das mesmas.

## **DIREITOS AUTORAIS**

Todas as declarações publicadas nos artigos são de inteira responsabilidade dos autores. Entretanto, todo material publicado torna-se propriedade da SBME, que passa a reservar os direitos autorais. Portanto, nenhum material publicado na RBME poderá ser reproduzido sem a permissão por escrito da SBME. Todos os autores de artigos submetidos à RBME deverão assinar um Termo de Transferência de Direitos Autorais (a seguir), que entrará em vigor a partir da data de aceite do trabalho. O autor responsável pelo artigo receberá, sem custos, a separata eletrônica da publicação (em formato PDF).

## **ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA**

Revista Brasileira de Medicina do Esporte – SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA DO EXERCÍCIO E DO ESPORTE – Avenida Brigadeiro Luis Antônio, 278 – 6º andar – 01318-901 – São Paulo, SP – Tel./fax: (11) 3106 7544 / Fax: (11) 3106 8611 – E-mail: sbme@medicinadoesporte.org.br

## **Forma e preparação de manuscritos**

O artigo submetido deve ser digitado em espaço duplo, fonte arial 12, papel tamanho A4 ou ofício, com margens de 2,5cm, sem numerar linhas ou parágrafos, e numerando as páginas no canto superior direito. Gráficos e tabelas devem ser apresentados no final do artigo em páginas separadas, assim como as legendas das figuras. As figuras devem ser incluídas em arquivos individuais. No corpo do texto deve-se informar os locais para inserção dos gráficos, tabelas ou figuras. Os manuscritos que não estiverem de acordo com as instruções a seguir em relação ao estilo e formato serão devolvidos sem revisão pelo Conselho Editorial.

## **FORMATO DOS ARQUIVOS**

- Para o texto, usar editor de texto do tipo Microsoft Word para Windows ou equivalente

- Não enviar arquivos em formato PDF
- As figuras deverão estar nos formatos jpg ou tif. Deverão estar incluídas no arquivo Word, mas também devem ser enviadas separadamente (anexadas durante a submissão do artigo como documento suplementar).

## **ARTIGO ORIGINAL**

Um artigo original deve conter no máximo 30 (trinta) referências e 20 (vinte) páginas incluindo referências, figuras e tabelas, e ser estruturado com os seguintes itens, cada um começando por uma página diferente:

**Página título:** deve conter (1) o título do artigo, que deve ser objetivo, mas informativo; (2) nomes completos dos autores; áreas de formação dos autores; instituição(ões) de origem, com cidade, estado e país, se fora do Brasil; (3) nome do autor correspondente, com endereço completo e e-mail. A titulação dos autores não deve ser incluída.

**Resumo:** deve conter (1) o resumo em português, com não mais do que 300 palavras, estruturado de forma a conter: introdução e objetivo, métodos, resultados e conclusão; (2) três a cinco palavras-chave, que não constem no título do artigo. Usar obrigatoriamente termos do *Medical Subject Headings, do Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>); (3) o resumo em inglês (abstract), representando a versão do resumo para a língua inglesa; (4) três a cinco palavras-chave em inglês (keywords).

**Introdução:** deve conter (1) justificativa objetiva para o estudo, com referências pertinentes ao assunto, sem realizar uma revisão extensa; (2) objetivo do artigo.

**Métodos:** deve conter (1) descrição clara da amostra utilizada; (2) termo de consentimento para estudos experimentais envolvendo humanos; (3) identificação dos métodos, aparelhos (fabricantes e endereço entre parênteses) e procedimentos utilizados de modo suficientemente detalhado, de forma a permitir a reprodução dos resultados pelos leitores; (4) descrição breve e referências de métodos publicados, mas não amplamente conhecidos; (5) descrição de métodos novos ou modificados; (6) quando pertinente, incluir a análise estatística utilizada, bem como os programas utilizados. No texto, números menores que 10 são escritos por extenso, enquanto que números de 10 em diante são expressos em algarismos arábicos.

**Resultados:** deve conter (1) apresentação dos resultados em sequência lógica, em forma de texto, tabelas e ilustrações; evitar repetição excessiva de dados em tabelas ou ilustrações e no texto; (2) enfatizar somente observações importantes.

**Discussão:** deve conter (1) ênfase nos aspectos originais e importantes do estudo, evitando repetir em detalhes dados já apresentados na Introdução e nos Resultados; (2) relevância e limitações dos achados, confrontando com os dados da literatura, incluindo implicações para futuros estudos; (3) ligação das conclusões com os objetivos do estudo; (4) conclusões que podem ser tiradas a partir do estudo; recomendações podem ser incluídas, quando relevantes.

**Agradecimentos:** deve conter (1) contribuições que justificam agradecimentos, mas não autoria; (2) fontes de financiamento e apoio de uma forma geral. Referências: as referências bibliográficas devem ser numeradas na sequência em que aparecem no texto, em formato sobrescrito entre parênteses. As referências citadas somente em legendas de tabelas ou figuras devem ser numeradas de acordo com uma sequência estabelecida pela primeira menção da tabela ou da figura no texto.

O estilo das referências bibliográficas deve seguir as regras do *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts*

submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36-47; <http://www.icmje.org>). Alguns exemplos mais comuns são mostrados abaixo. Para os casos não mostrados aqui, consultar a referência acima. Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o *Index Medicus (List of Journals Indexed: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>)*. Se o periódico não constar dessa lista, deve-se utilizar a abreviatura sugerida pelo próprio periódico. Deve-se evitar utilizar "comunicações pessoais" ou "observações não publicadas" como referências. Um resumo apresentado deve ser utilizado somente se for a única fonte de informação.

### **Exemplos:**

- 1) Artigo padrão em periódico (deve-se listar todos os autores; se o número ultrapassar seis, colocar os seis primeiros, seguidos por et al): You CH, Lee KY, Chey RY, Mrnguy R. Electrocardiographic study of patients with unexplained nausea, bloating and vomiting. *Gastroenterology* 1980;79:311-4. Goate AM, Haynes AR, Owen MJ, Farrall M, James LA, Lai LY, et al. Predisposing locus for Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet* 1989;1:352-5.
- 2) Autor institucional: The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977;2:742-4.
- 3) Livro com autor(es) responsáveis por todo o conteúdo: Colson JH, Armour WJ. *Sports injuries and their treatment*. 2 nd rev. ed. London: S. Paul, 1986.
- 4) Livro com editor(es) como autor(es): Diener HC, Wilkinson M, editors. *Drug-induced headache*. New York: Springer-Verlag, 1988.
- 5) Capítulo de livro: Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974;457-72.

### **TABELAS**

As tabelas devem ser elaboradas em espaço 1,5, devendo ser planejadas para ter como largura uma (8,7cm) ou duas colunas (18cm). Cada tabela deve possuir um título sucinto; itens explicativos devem estar ao pé da tabela. A tabela deve conter médias e medidas de dispersão (DP, EPM etc.), não devendo conter casas decimais irrelevantes. As abreviaturas devem estar de acordo com as utilizadas no texto e nas figuras. Os códigos de identificação de itens da tabela devem estar listados na ordem de surgimento no sentido horizontal e devem ser identificados pelos símbolos padrão.

### **FIGURAS**

Serão aceitas fotos ou figuras em preto-e-branco. Figuras coloridas poderão ser publicadas quando forem essenciais para o conteúdo científico do artigo. Nestes casos, os custos serão arcados pelos autores. Para detalhes sobre ilustrações coloridas, solicitamos contactar diretamente a Atha Editora ([atharbme@uol.com.br](mailto:atharbme@uol.com.br)). Figuras coloridas poderão ser incluídas na versão eletrônica do artigo sem custo

adicional para os autores. Os desenhos das figuras devem ser consistentes e tão simples quanto possível. Não utilizar tons de cinza. Todas as linhas devem ser sólidas. Para gráficos de barra, por exemplo, utilizar barras brancas, pretas, com linhas diagonais nas duas direções, linhas em xadrez, linhas horizontais e verticais. A RBME desestimula fortemente o envio de fotografias de equipamentos e animais. As figuras devem ser impressas com bom contraste e largura de uma coluna (8,7cm) no total. Utilizar fontes de no mínimo 10 pontos para letras, números e símbolos, com espaçamento e alinhamento adequados. Quando a figura representar uma radiografia ou fotografia sugerimos incluir a escala de tamanho quando pertinente.

## **ARTIGOS DE REVISÃO**

Os artigos de revisão são habitualmente encomendados pelo Editor a autores com experiência comprovada na área. Artigos de revisão deverão abordar temas específicos com o objetivo de atualizar os menos familiarizados com assuntos, tópicos ou questões específicas nas áreas de Medicina e Ciências do Exercício e do Esporte. O Conselho Editorial avaliará a qualidade do artigo, a relevância do tema escolhido e o comprovado destaque dos autores na área específica abordada. A inadequação de qualquer um dos itens acima acarretará na recusa do artigo pelos editores, sem que o mesmo seja enviado para o processo de revisão pelos pares. O artigo de revisão deve ter, no máximo, 30 (trinta) páginas e 100 (cem) referências.

## **REVISÃO SISTEMÁTICA**

A RBME encoraja os autores a submeterem artigos de revisão sistemática da literatura nas áreas de Medicina e Ciências do Exercício e do Esporte. O Conselho Editorial avaliará a qualidade do artigo, a relevância do tema escolhido, o procedimento de busca e os critérios para inclusão dos artigos. A inadequação de qualquer um dos itens acima acarretará na recusa do artigo pelos editores, sem que o mesmo seja enviado para o processo de revisão pelos pares. O artigo de revisão sistemática deve ter, no máximo, 30 (trinta) páginas e 100 (cem) referências.

## **META-ANÁLISE**

A RBME encoraja os autores a submeterem artigos de análise meta-analítica nas áreas de Medicina e Ciências do Exercício e do Esporte. O Conselho Editorial avaliará a qualidade do artigo, a relevância do tema escolhido, o procedimento de busca de artigos, os critérios para inclusão dos artigos e o tratamento estatístico utilizado. A inadequação de qualquer um dos itens acima acarretará na recusa do artigo pelos editores, sem que o mesmo seja enviado para o processo de revisão pelos pares. O artigo de meta-análise deve ter, no máximo, 30 (trinta) páginas e 100 (cem) referências.

## **ARTIGOS DE OPINIÃO**

Serão encomendados pelo Conselho Editorial a indivíduos de notório saber nas áreas de Medicina do Exercício e do Esporte e das Ciências do Esporte, que emitirão sua opinião pessoal sobre assuntos de particular interesse. O artigo de opinião deve ter, no máximo, 20 (vinte) páginas e 20 (vinte) referências.

## **RELATOS DE EXPERIÊNCIA**

A RBME estimula profissionais que possuam uma experiência relevante em algum aspecto especial, original ou inovador em Medicina do Exercício e do Esporte ou das Ciências do Esporte a partilhá-la, sob a forma de um Relato de Experiência. A inadequação de qualquer um dos itens acima acarretará na recusa do artigo pelos editores, sem que o mesmo seja enviado para o processo de revisão pelos pares. O relato de experiência deve ter, no máximo, 15 (quinze) páginas e 15 (quinze) referências.

## **RELATO DE CASO**

A RBME pode aceitar artigos de relato de caso, descrevendo casos clínicos específicos que tragam informações relevantes e ilustrativas sobre diagnóstico ou tratamento de um caso particular que seja raro na Medicina do Exercício e do Esporte. Os artigos devem ser objetivos e precisos, contendo os seguintes itens: 1) Um Resumo e um Abstract contendo as implicações clínicas; 2) Uma Introdução com comentários sobre o problema clínico que será abordado, utilizando o caso como exemplo. É importante documentar a concordância do paciente em utilizar os seus dados clínicos; 3) Um Relato objetivo contendo a história, o exame físico e os achados de exames complementares, bem como o tratamento e o acompanhamento; 4) Uma Discussão explicando em detalhes as implicações clínicas do caso em questão, e confrontando com dados da literatura, incluindo casos semelhantes relatados na literatura; 5) Referências bibliográficas. O relato de caso deve ter, no máximo, 20 (vinte) páginas e 30 (trinta) referências.

## **CARTA AO EDITOR**

Cartas endereçadas ao Editor-Chefe da RBME serão consideradas para publicação se promoverem discussão intelectual sobre um determinado artigo recentemente publicado. As cartas devem conter um título informativo e seguir as instruções acima para publicação. As cartas devem ter não mais do que 500 palavras. Se aceita, uma cópia será enviada ao autor do artigo original que suscitou a discussão, com um convite para submeter uma réplica que será publicada junto com a carta.

## **LIVROS PARA REVISÃO**

A RBME estimula as editoras a submeterem livros para apreciação pelo Conselho Editorial. Devem ser enviadas duas cópias do livro ao Editor-Chefe (vide o endereço acima), as quais não serão devolvidas. O envio dos livros não garante a sua apreciação. Contudo, os livros recebidos e não apreciados serão listados no último número de cada ano da Revista. Os livros selecionados para apreciação serão encaminhados para revisores com experiência e competência profissional na respectiva área do livro, cujos pareceres deverão ser emitidos em até três meses e poderão ser adaptados pelos Editores da Revista, sem qualquer interferência das editoras dos livros apreciados. O resultado da apreciação será publicado na Revista juntamente com as informações editoriais do livro.

## Envio de manuscritos

Todos os artigos deverão ser submetidos diretamente no site <http://submission.scielo.br/index.php/rbme>. Na submissão eletrônica do artigo, os autores deverão anexar como Documento Suplementar:

- Termo de Divulgação de Potencial Conflito de Interesses

Termo de Transferência de Direitos Autorais (a seguir) Não serão aceitas submissões por e-mail, correios ou quaisquer outras vias que não a submissão eletrônica no site supramencionado.

## **DIVULGAÇÃO PARA A IMPRENSA**

### **Suco de mirtilo combate estresse oxidativo causado pelo exercício físico**

Em estudo realizado na Escola Superior de Educação Física (ESEF) da UFPEL, pela Nutricionista Priscila Cardoso Meirelles, mestranda do curso de pós-graduação em Educação Física, Airton José Rombaldi e Alethéa Gatto Barschak, docentes da instituição, verificou-se os efeitos do suco de mirtilo em marcadores de estresse oxidativo em atletas amadores.

O estudo realizado em 2010 contou com a participação de 21 ciclistas, do sexo masculino, com idades entre 18 e 36 anos. Eles foram submetidos a teste de esforço máximo e coletas sanguíneas antes e depois de quatro semanas de uso da suplementação. Metade do grupo consumiu 150 mL/dia de um suco feito da fruta mirtilo e a outra metade 150 mL/dia de uma solução com suco artificial. Os frutos de mirtilo, também conhecido como *blueberry*, são classificados como uma das frutas frescas mais ricas em antioxidantes já estudadas, tendo um conteúdo elevado de polifenóis tanto na casca quanto na polpa.

De acordo com os resultados encontrados, o mirtilo tem a capacidade de proteger o organismo de atletas amadores contra a formação excessiva de radicais livres geradas pelo exercício físico, reduzindo o estresse oxidativo no organismo, prevenindo danos nas células e lesões musculares.