

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO

**INTERVENÇÃO NUTRICIONAL E ESTRESSE OXIDATIVO AO LONGO DO  
TREINAMENTO EM TRIATLETAS**

**TESE DE DOUTORADO**

**CLÁUDIA DORNELLES SCHNEIDER**

Orientador: ALVARO REISCHAK DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO

**INTERVENÇÃO NUTRICIONAL E ESTRESSE OXIDATIVO AO LONGO DO  
TREINAMENTO EM TRIATLETAS**

**CLÁUDIA DORNELLES SCHNEIDER**

Orientador: ALVARO REISCHAK DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências do Movimento Humano da Escola de  
Educação Física da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como requisito parcial para  
obtenção de grau de doutor

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2007.

**CATALOGAÇÃO NA FONTE**

S359i Schneider, Cláudia Dornelles  
Intervenção nutricional e estresse oxidativo ao longo do treinamento em triatletas. - Porto Alegre: Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.  
128 f.: tab., il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Educação Física. Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Triatlo. 2. Dieta. 3. Estresse oxidativo. 4. Vitaminas. I. Título. II. Oliveira, Alvaro Reischak, orientador.

CDU: 796.012:612

*“ Sucesso é a capacidade de vencer barreiras  
que nem sabíamos que existiam.  
Desafiadora é aquela pessoa que insiste  
em ir em busca do sucesso. “*

O. A. Bertolletti

## AGRADECIMENTOS

É importante agradecer a todos que me ajudaram neste trabalho, e me acompanharam nessa jornada das mais variadas formas.

Em primeiro lugar agradeço ao meu mestre e orientador, Alvaro, que legitimamente busca o conhecimento e ajuda muitas pessoas nessa caminhada. Eu fui privilegiada por fazer parte desse time.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela excelente qualidade de ensino e pesquisa. E especialmente à Escola de Educação Física e seu Pós-graduação.

Naturalmente, se não fossem os atletas que literalmente doaram seu sangue para o meu trabalho, nada disso teria acontecido. Muito obrigada a todos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos professores desta universidade que dividiram seus conhecimentos e ensinamentos.

À Juliana Nunes, uma pessoa muito especial que se tornou uma amiga querida nesta caminhada.

À Geórgia Becker, minha bolsista super dedicada e competente, que conseguiu ser mais detalhista e perfeccionista que eu.

Ao Ricardo Rocha e ao Márcio Silveira que me ajudaram muito na longa e quase interminável tarefa de análise do sangue. À Roberta Mendes e Maurício que estavam sempre pelo laboratório para ajudar na execução das técnicas de estresse oxidativo.

Em especial, ao sempre disponível e querido Giovani Cunha e ao Bruno Folmer que ajudaram nos testes máximos.

Ao Orlando Laitano e ao Jocelito Martins, que sempre que precisei estavam dispostos a coletar o sangue dos atletas, em especial ao Jocelito que vinha de longe e de madrugada.

À Bruna Ziglioli e Mariana Escobar que participaram da etapa “nutricional” inicial.

À Jaque, Ludi, Pati e Maris, minhas queridas e grandes amigas, que irei sempre agradecer por tê-las conhecido nessa “caminhada científica”.

À Dra. Patrícia Pranke, pela grande ajuda na interpretação dos parâmetros hematológicos, sempre disponível e competente.

Aos professores Adriane, José Cláudio e Paulo Ivo por cederem seus laboratórios, equipamentos e reagentes para que esse trabalho pudesse acontecer. Com certeza nada disso teria sido possível sem essa fundamental contribuição.

Às empresas Uniagro e Sucos Petry, que gentilmente apoiaram o estudo fornecendo os alimentos que os atletas consumiram no período da dieta rica em antioxidantes.

Ao Laboratório Weinmann, na pessoa do Dr. Júlio Diehl, pelo apoio na análise dos parâmetros hematológicos.

Aos muito queridos Flávio e Jerri, que sempre me ajudaram na parte estatística, na identificação dos limiares, no formato da tese, etc.

A tantos colegas e amigos queridos que conheci nestes anos de convívio na ESEF, dentre tantos, Cíntia Freitas, Cláudia Candotti e Márcio Oliveira, vocês são ótimos!

Aos excelentes, atenciosos e queridos funcionários da ESEF, tanto da secretaria do pós-graduação: Rosane, Ana e André; quanto do LAPEX: Luciano, Dani, Alex, Márcia, Carla e Luiz.

Aos que esqueci de citar, mas sabem que são especiais e importantes, obrigada!

À Beth, que sempre e incansavelmente me acompanhou, segurando as pontas no consultório, em todas as etapas da pesquisa, no apoio emocional, enfim, minha grande e querida amiga e irmã de coração.

À minha família e meus queridos amigos que quase não me viram nesse período, e quando viram tinham de agüentar as reclamações. Realmente para agüentar tanto mau humor e problema, só sendo família e muito amigo. Meus muito queridos, mais presentes no dia-a-dia Silvia, Luciana, Beth e Otávio, amo vocês, e obrigada por existirem!

E finalmente, agradeço a meus maravilhosos pais Corina e Arthur, que acredito terem cumprido excepcionalmente bem sua tarefa na terra. Foram exemplos para nós seus filhos e para todos que tiveram o prazer de conhecê-los.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1. OBJETIVOS.....	14
1.1.1. <i>Objetivo Geral.....</i>	<i>14</i>
1.1.2. <i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>14</i>
1.2. HIPÓTESES .....	14
1.3. DEFINIÇÃO OPERACIONAL DE TERMOS.....	15
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
2.1. RADICAIS LIVRES E EXERCÍCIO (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).....	17
2.2. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E ESTRESSE OXIDATIVO .....	23
2.3. TRIATLO <i>IRONMAN</i> .....	24
2.4. ASPECTOS NUTRICIONAIS.....	25
2.4.1. <i>Nutrição no esporte .....</i>	<i>26</i>
2.4.2. <i>Nutrição e proteção antioxidante .....</i>	<i>28</i>
<b>3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....</b>	<b>30</b>
3.1. DELINEAMENTO.....	30
3.2. POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	30
3.3. INSTRUMENTOS DE MEDIDA .....	30
<i>Coleta de dados.....</i>	<i>31</i>
<i>Balanças.....</i>	<i>31</i>
<i>Compasso de dobras cutâneas.....</i>	<i>31</i>
<i>Fita antropométrica.....</i>	<i>31</i>
<i>Estadiômetro .....</i>	<i>31</i>
<i>Software de nutrição.....</i>	<i>31</i>

<i>Monitor de frequência cardíaca</i> .....	32
<i>Espirômetro (analisador de gases)</i> .....	32
<i>Ergômetros</i> .....	32
<i>Centrífuga refrigerada</i> .....	32
<i>Geladeira</i> .....	32
<i>Ultra freezer</i> .....	32
<i>Contador beta</i> .....	33
<i>Espectrofotômetros</i> .....	33
3.4. SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL .....	33
<i>Critérios de inclusão</i> .....	34
<i>Intervenção nutricional</i> .....	34
<i>Planejamento</i> .....	35
<i>Registro alimentar e de exercício</i> .....	37
<i>Cálculo da dieta</i> .....	38
<i>Composição corporal</i> .....	39
<i>Procedimentos para os testes de exercício</i> .....	39
<i>Testes nos ergômetros</i> .....	39
<i>Teste máximo</i> .....	40
<i>Coleta de sangue</i> .....	41
3.5. DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS DE ANÁLISE SANGÜÍNEA .....	41
<i>Parâmetros hematológicos</i> .....	42
<i>Oxidação de proteínas – Método das carbonilas</i> .....	42
<i>Quantificação de proteínas</i> .....	44
<i>Superóxido dismutase eritrocitária</i> .....	44
<i>Catalase</i> .....	45
<i>Glutathione peroxidase</i> .....	46
<i>TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</i> .....	47
<i>Quimiluminescência</i> .....	48
<i>Capacidade antioxidante total</i> .....	48
<i>Ácido úrico</i> .....	49
<i>Compostos fenólicos</i> .....	50
<i>Sulfidril</i> .....	50



<i>Creatina quinase total</i> .....	51
3.6. RECURSOS HUMANOS .....	51
3.7. TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	52
3.8. ASPECTOS ÉTICOS.....	53
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
4.1. CARACTERÍSTICAS DO GRUPO.....	54
4.2. ESTUDO 1: EXERCÍCIO AGUDO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	56
4.3. ESTUDO 2: DIETA RICA EM ANTIOXIDANTES vs SUPLEMENTAÇÃO.....	70
4.4. ESTUDO 3: SUPLEMENTAÇÃO ANTIOXIDANTE.....	88
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>103</b>
<b>6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....</b>	<b>104</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>112</b>
ANEXO I – FICHA DE COLETA DE DADOS .....	112
ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	113
ANEXO III – PAR-Q: QUESTIONÁRIO SOBRE PRONTIDÃO PARA A ATIVIDADE FÍSICA ...	114
ANEXO IV – REGISTRO ALIMENTAR .....	115
ANEXO V – ORIENTAÇÕES PARA OS TESTES.....	117
ANEXO VI – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	118
ANEXO VII – VALORES INDIVIDUAIS DOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS ....	119
ANEXO VIII – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS AO LONGO DO ESTUDO...	124
ANEXO IX – SUBMISSÃO DE ARTIGO – ESTUDO 1 .....	128
ANEXO X –ANÁLISE ESTATÍSTICA DO EFEITO <i>CARRYOVER</i> .....	129
ANEXO XI – SUBMISSÃO DE ARTIGO - ESTUDO 2.....	130

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AI – *Adequate Intake* ou Ingestão Adequada  
AO – Antioxidante (s)  
CAT – Catalase  
CEEEO – Centro de Estudos em Estresse Oxidativo  
CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média  
CK – Enzima Creatina Quinase  
DRI – *Dietary Reference Intake*  
EO – Estresse Oxidativo  
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio  
GPx – Glutathione Peroxidase  
GR – Glutathione Redutase  
GSH – Glutathione reduzida  
GSSG – Dissulfeto de glutathione ou Glutathione oxidada  
HCM - Hemoglobina Corpuscular Média  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio  
ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
IDR – Ingestão Dietética de Referência  
LAPEX – Laboratório de Pesquisa do Exercício  
LEAO – Laboratório de Espécies Ativas de Oxigênio  
LPO – Lipoperoxidação  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - Radical superóxido  
OH<sup>•</sup> - Radical hidroxil  
P<sub>ET</sub>CO<sub>2</sub> - pressão parcial de gás carbônico ao final da expiração  
P<sub>ET</sub>O<sub>2</sub> - pressão parcial de oxigênio ao final da expiração  
QL – Quimiluminescência  
RDA – *Recommended Dietary Allowance*  
RDW - Amplitude de distribuição dos eritrócitos  
RER – Razão de troca respiratória  
RL – Radicais Livres  
SOD – Superóxido dismutase

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRAP – Capacidade antioxidante total

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UL – *Upper Limit* ou Limite de Ingestão Máxima Tolerável

VCM – Volume Corpuscular Médio

$\dot{V}CO_2$  – Produção de gás carbônico

$\dot{V}E$  – Ventilação

$\dot{V}O_2$  – Consumo de oxigênio

$\dot{V}O_{2\text{máx}}$  – Consumo máximo de oxigênio

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Planejamento experimental em agosto de 2005.

Tabela 2 – Planejamento experimental em setembro de 2005.

Tabela 3 – Planejamento experimental em outubro de 2005.

Tabela 4 – Planejamento experimental em dezembro de 2005.

Tabela 5 – Características gerais da amostra.

Tabela 6 – Quantificação da carga de treino na natação, ciclismo e corrida do atleta 12.

Tabela 7 – Associação entre a enzima creatina quinase e parâmetros de estresse oxidativo.

Tabela 8 – Valores dos deltas para os parâmetros de estresse oxidativo após cada intervenção dietética.

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Valores de referência dos parâmetros hematológicos

Quadro 2 – Fator atividade

## RESUMO

Existem diversas pesquisas na área de radicais livres, exercício e nutrientes antioxidantes, visto que a prática de exercícios extenuantes e/ou de longa duração podem causar estresse oxidativo. A maioria destas pesquisas tem testado protocolos de suplementação com nutrientes antioxidantes, nas mais diversas doses e combinações. Entretanto, existe uma lacuna no que se refere a protocolos de intervenção pela dieta alimentar. Sendo assim, o objetivo desta tese foi observar se havia diferença entre fornecer uma combinação de vitaminas antioxidantes via dietética ou suplementar, sobre os parâmetros de estresse oxidativo em triatletas participantes de *Ironman*. Participaram deste estudo longitudinal, prospectivo, 13 triatletas do sexo masculino, com idade de  $32,1 \pm 5,4$  anos,  $\dot{V}O_{2\text{máx}}$  na esteira  $58,6 \pm 6,9$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, treinando inicialmente  $15,5 \pm 3,4$  h.sem<sup>-1</sup>. Foram mensurados no sangue, tanto antes quanto após as intervenções nutricionais, diversos parâmetros de estresse oxidativo. As intervenções nutricionais contaram com um aporte de vitaminas A, C e E dentro das recomendações americanas de Ingestão Dietética Recomendada (DRI). Tanto a dieta quanto a suplementação continham duas vezes a recomendação diária para as vitaminas A e E, e cinco vezes a recomendação diária para vitamina C. Pudemos observar que os marcadores de estresse oxidativo reagiram de forma diferente conforme o parâmetro de dano medido e a intervenção nutricional realizada. Após a dieta rica em antioxidantes, houve um aumento nos níveis de sulfidril, da capacidade antioxidante total (TRAP) e uma redução do dano a proteínas (carbonil). Isto foi provavelmente devido ao fato de outros nutrientes antioxidantes, como os flavonóides, presentes nos alimentos ingeridos, promoverem uma maior proteção comparado às vitaminas antioxidantes isoladas na forma de suplementação. Por outro lado, houve um aumento do dano a lipídeos (TBARS), o que não ocorreu após a suplementação antioxidante. Provavelmente um maior consumo de ácidos graxos poliinsaturados, levando a uma menor razão vitamina E: ácidos graxos poliinsaturados, durante a dieta rica em antioxidantes foi o responsável por este maior dano aos lipídeos de membrana. Não observamos relação entre a enzima marcadora de dano muscular creatina quinase e os parâmetros de estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** triatlo, dieta, vitaminas antioxidantes, suplementação, estresse oxidativo.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente pela relação entre radicais livres, exercício e nutrientes antioxidantes. Da mesma forma, parece haver um maior número de indivíduos envolvidos com a prática de exercícios de muito longa duração, os chamados esportes de ultra-resistência. Estudos têm mostrado que exercícios extenuantes e/ou de longa duração, bem como o grau de exaustão do atleta, podem causar estresse oxidativo (KANTER *et al.* 1986; CHILD *et al.* 1998; HEUNKS *et al.* 1999), uma vez que o exercício aumenta o consumo de oxigênio e causa um distúrbio na homeostase pró e antioxidante intracelular (JI, 1999). Em contrapartida, o papel dos nutrientes antioxidantes vem sendo estudado, seja via dietética (STRAIN *et al.*, 2000) ou suplementar (BALAKRISHNAN 1998; MARZATICO *et al.*, 1997; TAULER *et al.*, 2002; MASTALOUDIS *et al.*, 2004a,b), com os objetivos de otimizar o potencial antioxidante e melhorar a capacidade de resistência aeróbia nos atletas, embora existam ainda controvérsias sobre a necessidade ou não de uma suplementação alimentar (JENKINS, 2000).

Diversos autores têm discutido a proteção induzida pelo treinamento. Os radicais livres produzidos pelo exercício podem ser o estímulo inicial para a biogênese mitocondrial em uma situação de treinamento crônico (DAVIES *et al.*, 1982), e a magnitude da melhora do sistema de defesa antioxidante parece depender das cargas de treinamento (MARGARITIS *et al.*, 1997), sendo que tais adaptações seriam tecido-específicas, sugerindo um mecanismo regulatório complexo (LEEWENBURGH *et al.*, 1997). O treinamento físico previne parcialmente a formação de radicais livres no exercício exaustivo (VIÑA *et al.*, 2000) e pode aumentar as defesas antioxidantes (POWERS *et al.*, 1999). Por outro lado, conforme Ashton *et al.*, (1998), a melhora do sistema de defesa antioxidante enzimático que ocorre com o treinamento físico pode não ser suficiente para suprimir o estresse oxidativo induzido pelo exercício, e especulam se uma suplementação antioxidante seria necessária para indivíduos saudáveis submetidos a exercício físico regular. Uma sugestão interessante seria estimular o consumo de alimentos ricos em antioxidantes (MARZATICO *et al.*, 1997), devido ao risco de uma lacuna destes nutrientes, dado o conteúdo deficiente na dieta da população (ASHTON *et al.*, 1998), já que

existe uma relação entre o consumo de frutas e vegetais e as concentrações sanguíneas de antioxidantes (STRAIN *et al.*, 2000).

De uma maneira geral as pesquisas em estresse oxidativo e exercícios de muito longa duração são escassas.

## **1.1. OBJETIVOS**

### **1.1.1. Objetivo Geral**

Acompanhar a evolução dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo, em triatletas submetidos a três intervenções dietéticas ao longo do período de treinamento para uma competição de *Ironman*.

### **1.1.2. Objetivos Específicos**

- ❖ Comparar o efeito de 14 dias de três intervenções dietéticas sobre o estresse oxidativo em triatletas durante o treinamento para uma competição de *Ironman*.
- ❖ Observar o efeito em médio prazo da suplementação antioxidante sobre o estresse oxidativo em triatletas.
- ❖ Relacionar os níveis da enzima creatina quinase total com os parâmetros de estresse oxidativo.
- ❖ Verificar alterações nos parâmetros hematológicos do eritrograma, ferritina e reticulócitos ao longo do período de treinamento para uma competição de *Ironman*.

## **1.2. HIPÓTESES**

Com base na literatura, levantam-se as seguintes hipóteses:

H1 – Os marcadores de dano oxidativo devem estar reduzidos tanto no grupo que recebeu a dieta rica em antioxidantes quanto no grupo que recebeu a suplementação de antioxidantes.

H2 – Os parâmetros bioquímicos antioxidantes devem estar aumentados no grupo com dieta rica em antioxidantes e no grupo com suplemento de antioxidantes.

H3 – A concentração sanguínea da enzima creatina quinase aumenta conforme evoluem os meses de treinamento, e está positivamente correlacionada aos parâmetros bioquímicos de dano oxidativo.

### **1.3. DEFINIÇÃO OPERACIONAL DE TERMOS**

- Indivíduos treinados = indivíduos saudáveis, que pratiquem regularmente triatlo há pelo menos um ano.
- Exercício de longa duração ou prolongado = acima de duas horas de exercícios isolados (natação, ciclismo, corrida) ou combinados (duas ou mais modalidades anteriormente citadas).
- Parâmetros bioquímicos oxidativos = correspondem às variáveis de resposta quimiluminescência (QL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e carbonilas.
- Parâmetros bioquímicos antioxidantes não enzimáticos = correspondem às variáveis de resposta capacidade antioxidante total (TRAP), ácido úrico, sulfidril e compostos fenólicos.
- Parâmetros bioquímicos antioxidantes enzimáticos = correspondem às variáveis de resposta superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.
- Enzima creatina quinase: enzima marcadora de dano muscular.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

A revisão de literatura está subdividida nos itens:

2.1. Radicais livres e exercício (artigo de revisão);

2.2. Parâmetros hematológicos e estresse oxidativo;

2.3. Triatlo *Ironman*;

2.4. Aspectos nutricionais.



## 2.1. RADICAIS LIVRES E EXERCÍCIO (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004)

### ARTIGO DE REVISÃO



## Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico\*

Cláudia Dornelles Schneider e Alvaro Reischak de Oliveira

### RESUMO

O interesse acerca dos mecanismos de geração e adaptação de radicais livres de oxigênio (RLO) ao exercício aumentou significativamente a partir da demonstração de sua relação com o consumo de oxigênio. Os RLO são formados pela redução incompleta do oxigênio, gerando espécies que apresentam alta reatividade para outras biomoléculas, principalmente lipídios e proteínas das membranas celulares e, até mesmo, o DNA. As injúrias provocadas por estresse oxidativo apresentam efeitos cumulativos e estão relacionadas a uma série de doenças, como o câncer, a aterosclerose e o diabetes. O exercício físico agudo, em função do incremento do consumo de oxigênio, promove o aumento da formação de RLO. No entanto, o treinamento físico é capaz de gerar adaptações capazes de mitigar os efeitos deletérios provocados pelos RLO. Estas adaptações estão relacionadas a uma série de sistemas, dos quais os mais importantes são os sistemas enzimáticos, compostos pela superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase, e o não enzimático, composto por ceruloplasmina, hormônios sexuais, coenzima Q, ácido úrico, proteínas de choque térmico e outros. Tais adaptações, apesar das controvérsias sobre os mecanismos envolvidos, promovem maior resistência tecidual a desafios oxidativos, como aqueles proporcionados pelo exercício de alta intensidade e longa duração. As técnicas de avaliação de estresse oxidativo, na maioria das vezes, não são capazes de detectar injúria em exercícios de curta duração. Dessa forma, esforços estão sendo feitos para o estudo de esforços físicos realizados por longos períodos de tempo ou efetuados até a exaustão. Novos marcadores de lesão por ação dos RLO estão sendo descobertos e novas técnicas para sua determinação estão sendo criadas. O objetivo deste trabalho é discutir os mecanismos da formação dos RLO e das adaptações ao estresse oxidativo crônico provocado pelo treinamento físico.

### RESUMEN

#### **Radicales libres de oxígeno y ejercicio: mecanismos de formación y adaptación al entrenamiento**

*El interés a cerca de los mecanismos de generación y adaptación de radicales libres de oxígeno (RLO) al ejercicio aumentó significativamente a partir de la demostración de su relación con el consumo de oxígeno. Los RLO son formados por la reducción incompleta de del oxígeno, generando especies que presentan una alta reactividad para otras biomoléculas, principalmente lípidos y proteínas de las membranas celulares y, así mismo, el DNA. Las*

**Palavras-chave:** Exercício. Radicais livre de oxigênio. Estresse oxidativo. Antioxidantes. Treinamento.

**Palabras-clave:** Ejercicio. Radicales libres de oxígeno. Estrés oxidativo. Antioxidantes. Entrenamiento.

*injurias provocadas por el estrés oxidativo presentan efectos acumulativos y están relacionados a una serie de enfermedades, como el cáncer, la arteriosclerosis o la diabetes. El ejercicio físico agudo, en función del incremento del consumo de oxígeno promueve un aumento en la formación de los RLO. No en tanto, el entrenamiento físico es capaz de generar adaptaciones capaces de mitigar los efectos deletéreos provocados por los RLO. Estas adaptaciones están relacionadas a una serie de sistemas de los cuales los mas importantes son los sistemas enzimáticos, compuestos por la peróxido dismutasa, catalasa y glutatona peroxidada y los sistemas no enzimáticos compuestos por ceruloplasmina, hormonas sexuales, la coenzima Q, ácido úrico, proteínas de choque térmico, y otros. Tales adaptaciones, a pesar de las controversias sobre los mecanismos comprendidos, promueven una mayor resistencia tisular a los desafíos oxidativos, como son aquellos proporcionados por el ejercicio físico de alta intensidad y de larga duración. Las técnicas de evaluación del estrés oxidativo, la mayoría de las veces, no son capaces de detectar injurias en ejercicios de corta duración. De esta forma, los esfuerzos están siendo realizados por largos periodos de tiempo o realizados hasta la extenuación. Nuevos marcadores de lesión por acción de los RLO están siendo descubiertos y nuevas técnicas para su determinación están siendo creadas. El objetivo de este trabajo es discutir los mecanismos de formación de los RLO y de adaptación al estrés oxidativo crónico provocado por el entrenamiento físico.*

### INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de oxigênio, assim como a ativação de vias metabólicas específicas durante ou após o exercício, resulta na formação de radicais livres de oxigênio, substâncias conhecidas simplesmente como radicais livres<sup>(1-3)</sup>. Estas moléculas estão aumentadas nos exercícios de alta intensidade<sup>(4,5)</sup> e extenuantes<sup>(6)</sup> e foram relacionadas a um grande número de doenças como enfiseema pulmonar, doenças inflamatórias, aterosclerose, câncer e envelhecimento, a partir da década de 80<sup>(7,8)</sup>. Por outro lado, sabe-se que a atividade física é uma conhecida forma de estresse e a exposição crônica a ela, chamada treinamento físico, é capaz de disparar adaptações em resposta a uma maior produção destes radicais livres. Neste sentido os estudos mais recentes estabelecem o papel da atividade física na prevenção e controle de diversas doenças, como câncer de cólon, e possivelmente câncer de mama e de próstata<sup>(9)</sup>, diabetes e hipertensão<sup>(10)</sup>, dislipidemias e aterosclerose<sup>(11)</sup>, entre outras. Este artigo proporciona uma revisão acerca dos mecanismos de geração dos radicais livres através do exercício, bem como os processos adaptativos e respectivas conseqüências induzidas pelo treinamento físico.

\* Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, Grupo de Estudos em Bioquímica e Fisiologia do Exercício, Laboratório de Pesquisa do Exercício – Escola de Educação Física, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Recebido em 21/3/04. 2ª versão recebida em 22/5/04. Aceito em 25/5/04.

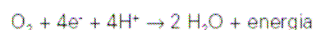
**Endereço para correspondência:** Rua Felizardo, 750 – 90690-200 – Porto Alegre, RS. E-mail: claudiadschneider@ig.com.br/aroliveira@esef.ufrgs.br

## RADICAIS LIVRES

Os radicais livres de oxigênio (RLO) são produzidos naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos e, muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico (como exemplo, os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruir bactérias e outros elementos estranhos); na desintoxicação de drogas; e na produção do fator relaxante derivado do endotélio, o óxido nítrico, extremamente importante nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos<sup>12</sup>.

Conforme Halliwell<sup>13</sup>, o oxigênio (O<sub>2</sub>) que respiramos é metabolizado em nosso organismo da seguinte maneira: aproximadamente 85 a 90% são utilizados pela mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons, e os 10 a 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e também por reações químicas de oxidação diretas. Na parte terminal da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidase (reação 1) remove um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo c, oxidando-as, e adiciona os quatro elétrons ao O<sub>2</sub> para formar água (em torno de 95 a 98% dos 85 a 90% citados acima). Os 2 a 5% restantes são reduzidos univalentemente em metabólitos denominados espécies reativas de oxigênio.

Reação 1 – redução tetravalente do oxigênio



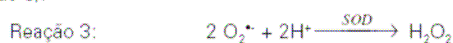
## FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Em razão da sua configuração eletrônica, o oxigênio tem forte tendência a receber um elétron de cada vez. A conversão univalente do oxigênio à água processa-se da seguinte maneira:

(a) A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera a formação do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (reação 2).



(b) O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), através do processo chamado dismutação<sup>13</sup>. Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e que acelera a reação a 10<sup>4</sup> vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico (reação 3).

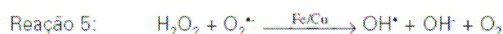


(c) Quando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxil (OH<sup>•</sup>), que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e assim influenciar enzimas, membranas ou ácidos nucléicos<sup>16</sup>.

O radical hidroxil pode ser formado quando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reage com íons ferro ou cobre (reação 4). A reação é conhecida como Reação de Fenton.



Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e superóxido, conduzindo à produção de radical hidroxil (reação 5), a chamada Reação de Haber-Weiss.



Os radicais superóxido e hidroxil têm elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa e são, portanto, chamados radicais livres. O peróxido de hidrogênio não é um radical livre; no entanto, representa um metabólito de oxigênio parcialmente reduzido. Outras espécies reativas de interesse são os oxigênio singletes, que são formas de oxigênio spin-alteradas. Esses metabólitos deriva-

dos do oxigênio, considerados em conjunto, são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO), em função da sua aumentada reatividade para as biomoléculas<sup>14</sup>, e em geral alteram o tamanho e a forma dos compostos com os quais eles interagem.

Além disso, o radical superóxido pode reagir diretamente com o óxido nítrico (NO), um radical livre centrado no nitrogênio, gerando peroxinitrito. Este pode levar à formação de um oxidante com características do radical hidroxil (reação 6).



Cada ERO tem suas próprias características, mostrando diferentes reatividades e tempos de meia-vida<sup>13,15</sup>.

## ESTRESSE OXIDATIVO

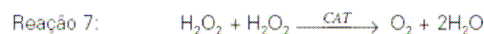
O termo estresse oxidativo é utilizado em circunstâncias nas quais o "desafio" por radicais livres resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos. Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo (EO) quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas prooxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes<sup>15</sup>. Um dos principais mecanismos de lesão é a lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular. Além disso, o EO pode gerar danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e, portanto, tecidual.

## DEFESA ANTIOXIDANTE

Como as ERO são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores. Cabe salientar que a composição das defesas antioxidantes difere de tecido a tecido, de tipo de célula a tipo de célula e possivelmente de célula do mesmo tipo, em um dado tecido<sup>11</sup>.

O sistema de defesa antioxidante está dividido em enzimático e não enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx).

A catalase desempenha importante papel na eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, promovendo a sua catálise até água.



A GPx também funciona como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a glutatona reduzida (GSH) à glutatona oxidada (GSSG), removendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e formando água (reação 8)<sup>17</sup>.



Dessa forma, tanto a CAT quanto a GPx evitam o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja produção de radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa<sup>11,31</sup>.

O perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx) é importante para a manutenção da integridade celular.

Já o sistema não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano como bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, e outros, ingeridos através da dieta regular ou via suplementação como ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (precursor de vitamina A) e grupos fenóis de plantas (flavonóides).

Em estudos desenvolvidos em nosso laboratório<sup>18,19</sup>, utilizando corações isolados de ratos, em um modelo de perfusão coronariana (Langendorff), demonstramos que tanto a vitamina A quanto o Trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E) agiram reduzindo os níveis de lipoperoxidação e os efeitos inotrópico, cronotrópico e lusitrópico negativos induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Isto se deve à capaci-

de *quencher* de oxigênio singlete de ambas as vitaminas. Um *quencher* é uma molécula que capta a energia de excitação do oxigênio singlete para si, levando-o ao estado fundamental e tornando-se excitada<sup>11</sup>.

### MECANISMOS DE FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Durante a atividade muscular, a demanda energética pode superar em 35 vezes a demanda de repouso<sup>20</sup>. Dessa forma, durante a sua realização ocorre um grande aumento no consumo de oxigênio, na sua maior parte em decorrência do aumento de trabalho muscular. Pelo fato de as ERO serem produzidas através do metabolismo intermediário, o exercício provoca aumento da sua produção. Como exemplo, imaginemos um homem adulto de 70kg, que em repouso utiliza 3,5mL O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> ou 352,8L.d<sup>-1</sup> ou 14,7mol.d<sup>-1</sup>. Se 1% gera O<sub>2</sub><sup>\*</sup>, isto significa 0,147mol.d<sup>-1</sup> ou 53,66mol.ano<sup>-1</sup> ou  $\approx$  1,7 kg.ano<sup>-1</sup> (de O<sub>2</sub><sup>\*</sup>). Já durante o esforço físico, com o aumento do consumo de O<sub>2</sub>, isto pode aumentar de 10 a 15 vezes<sup>11</sup>.

Segundo Viña *et al.*<sup>121</sup>, o grau de estresse oxidativo e de dano muscular não depende da intensidade absoluta do exercício, mas do grau de exaustão da pessoa que realiza o exercício. Além disso, conhecer os mecanismos de formação de RL com o exercício é importante para prevenir o estresse oxidativo e o dano associados com a atividade física exaustiva. Os mecanismos de formação são os seguintes:

(1) Interrupções temporárias das bombas de ATP dependentes de cálcio (Ca<sup>++</sup>) levam ao aumento das concentrações intracelulares de cálcio, o que durante o exercício pode ativar a via da xantina oxidase. Concentrações aumentadas de cálcio intramuscular durante períodos de exercício de alta intensidade podem ativar as proteases dependentes de cálcio, as quais convertem a xantina desidrogenase em xantina oxidase. A xantina oxidase usa o oxigênio molecular ao invés do NAD<sup>+</sup> como aceitante de elétrons e assim gera o radical superóxido;

(2) Períodos de exercício intenso podem aumentar o estresse oxidativo devido à hipóxia e reoxigenação temporárias, que ocorrem no músculo exercitado em função das contrações e relaxamentos estabelecidos ciclicamente. Durante a contração, a compressão vascular estabelece um quadro de isquemia e, portanto, de hipóxia. No relaxamento, ocorre a reperfusão e, conseqüentemente, a reoxigenação. Sob condições de hipóxia, os equivalentes reduzidos podem se acumular dentro da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, resultando em um fenômeno conhecido como estresse redutivo (*reductive stress*). Na reoxigenação, uma explosão (*burst*) de reduções monoelétrônicas pode converter o oxigênio molecular em radicais superóxido;

(3) A ativação de leucócitos pode estimular a produção de radicais livres para melhorar os mecanismos de defesa do hospedeiro em resposta ao dano muscular induzido pelo exercício. Em particular, os neutrófilos podem reduzir o oxigênio molecular a radical superóxido via NADPH oxidase, a qual está inativa nas células em repouso. Processos similares têm sido observados em monócitos e eosinófilos;

(4) O aumento das concentrações de Ca<sup>++</sup> pode ativar a enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, a qual libera o ácido araquidônico a partir dos fosfolípidos. A ciclooxigenase reage com o ácido araquidônico para gerar o radical hidroxil;

(5) Condições hipóxicas também têm sido mostradas no aumento da atividade da óxido nítrico sintase (NOS), levando à formação de radicais do óxido nítrico. Estes radicais podem exercer um efeito pró-oxidante fraco por eles próprios ou se combinar com o superóxido para formar um oxidante mais potente, o peroxinitrito<sup>22</sup>, como já demonstrado (reação 6).

Sendo assim, durante o metabolismo aeróbio, a possibilidade de ocorrer lesão oxidativa nos tecidos vai depender de um preciso equilíbrio entre a geração de radicais de oxigênio e a eficácia dos mecanismos antioxidantes.

### EXERCÍCIO FÍSICO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

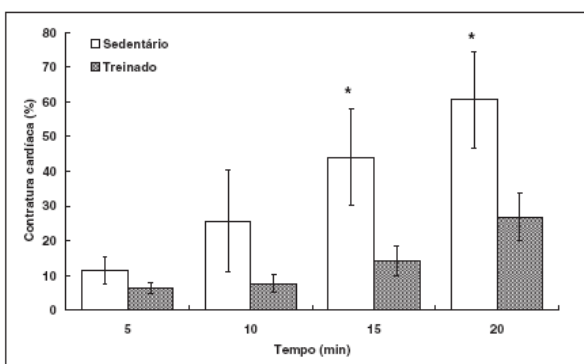
Diversos estudos da década de 80 apresentaram resultados nos quais repetidas cargas de exercício levavam a dano ou envelhecimento acelerado do músculo em indivíduos ou cobaias que se exercitavam regularmente. Entretanto Heath *et al.*<sup>123</sup>, depois de acompanhar atletas durante muitos anos, verificaram que seu potencial metabólico e sua capacidade funcional muscular não eram prejudicados. Além disso, Gutteridge *et al.*<sup>124</sup> apontaram como possibilidade de mecanismo protetor o fato de terem encontrado incremento nos níveis de ferro e cobre no suor de atletas após o exercício, especulando que a excreção de tais metais no suor diminuiria a extensão do dano oxidativo mediado por tais metais. A partir destes estudos levantou-se a possibilidade de que o exercício regular pudesse promover um aumento adaptativo dos mecanismos de defesa do músculo esquelético capaz de proteger contra as lesões produzidas pelas ERO.

Em 1982, Davies *et al.*<sup>125</sup> propuseram que a formação de radicais livres induzida por exercício pudesse ser o estímulo inicial para a biogênese mitocondrial em uma situação de treinamento crônico. Nesta linha de trabalho, Ji<sup>126</sup> demonstrou que em músculo esquelético uma carga isolada de trabalho exaustivo produzia um aumento de LPO e que a atividade das enzimas antioxidantes glutatona redutase, GPx, SOD e CAT estava significativamente aumentada. Da mesma forma, Alessio<sup>127</sup> mostrou aumento de LPO em fibras musculares lentas e rápidas, de ratos submetidos a cargas de exercício, indicando aumento de estresse oxidativo induzido pela atividade física. Esse estresse era melhor tolerado por ratos treinados, sugerindo uma adaptação dos sistemas antioxidantes.

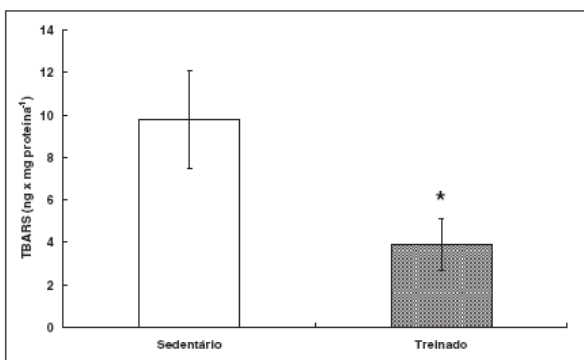
Ao estudar humanos, Nies *et al.*<sup>128</sup> demonstraram a ocorrência de dano ao DNA nos leucócitos circulantes após exercício exaustivo em esteira. Pela primeira vez isto foi mostrado em indivíduos treinados, mas, como a extensão do dano foi pequena, os autores sugerem que a adaptação ao treinamento de resistência aeróbia pode reduzir os efeitos do EO, como o dano ao DNA. No mesmo ano, os resultados do trabalho de Mills *et al.*<sup>129</sup>, com cavalos de corrida, mostraram que o exercício pode induzir mudanças nos parâmetros bioquímicos que são indicativos de estresse oxidativo, e que estes são exacerbados na presença de altas temperaturas e umidade. Em interessante trabalho, envolvendo um modelo de sobrecarga de treinamento, Palazzetti *et al.*<sup>130</sup> estudaram triatletas submetidos a um incremento de carga de trabalho da ordem de 21% na natação, 51% no ciclismo e 44% na corrida, por quatro semanas. O simples fato de o atleta ser submetido à sobrecarga de treinamento já provocava elevação significativa de adrenalina urinária e atividade da CK plasmática em repouso. No entanto, as maiores diferenças apareciam ao avaliar os efeitos de um duatlo (corrida e ciclismo) simulado. Os atletas em condições de sobrecarga de treinamento apresentavam maiores índices de lipoperoxidação, avaliada pelo nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), CK-MB e mioglobina plasmáticos, marcadores de lesão muscular, além de queda da relação GSH:GSSG, indicando claramente que esta sobrecarga compromete os mecanismos de defesa antioxidantes relacionados à resposta induzida por exercício.

Foi proposto por Margaritis *et al.*<sup>131</sup> que a magnitude da melhora do sistema de defesa antioxidante depende das cargas de treinamento. Os mesmos autores demonstraram ainda que quanto mais alto o VO<sub>2máx</sub>, em triatletas, mais alta a atividade da enzima antioxidante GPx nos eritrócitos, protegendo o organismo do dano à membrana celular. Leeuwenburgh *et al.*<sup>132</sup> acrescentam que o estresse oxidativo induzido pelo exercício pode disparar adaptações em resposta ao treinamento e que tais adaptações seriam tecido-específicas, sugerindo um mecanismo regulatório complexo. Além disso, Leaf *et al.*<sup>133</sup> sugerem que em indivíduos saudáveis o exercício físico induz a peroxidação lipídica transitoriamente e que existe remoção dos produtos da LPO durante a fase de recuperação. O trabalho de Venditti e Di Meo<sup>134</sup> com ratos adultos submetidos a

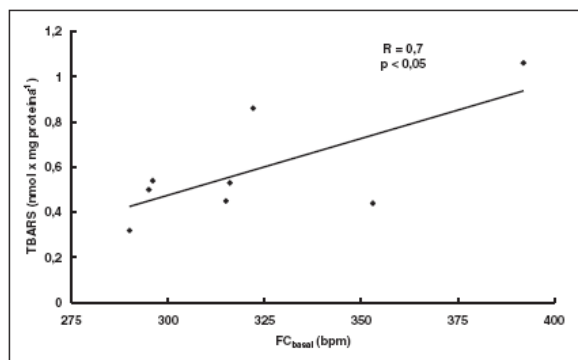
um programa de treinamento regular com duração de um ano comprovou a hipótese de que tal treinamento prolonga a capacidade de resistência aeróbia e aumenta as defesas antioxidantes, limitando assim o dano tecidual causado por RL. Da mesma forma, em nosso laboratório, demonstramos que o treinamento aeróbio, realizado através de corrida em esteira, em ratos, aumenta a capacidade de manejar um desafio por perfusão com  $H_2O_2$ , provocando menor contratura e menor formação de TBA-RS<sup>(35)</sup> (figuras 1 e 2). Na mesma linha de investigação, 11 semanas de treinamento aeróbio em ratos idosos, além de provocar bradicardia e aumento do índice glicose/insulina (um marcador da resistência à insulina), estavam associadas a uma resposta reduzida ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio. Neste estudo, demonstramos uma correlação positiva entre a FC basal e os níveis de TBA-RS (figura 3), ou seja, quanto maior a FC basal, maiores eram os níveis de lesão radicalar<sup>(36)</sup>. Estes efeitos podem ser parcialmente explicados pela maior atividade da SOD encontrada em outro estudo de nosso grupo<sup>(37)</sup>, em que ratos de apenas 21 dias foram submetidos a treinamento a 50% do  $VO_{2máx}$ , por quatro semanas. Não foi encontrado qualquer aumento de TBA-RS ou QL nos corações destes animais, o que sugere que adaptações compensatórias no sistema antioxidante tecidual tenham ocorrido. Neste sentido, Ramires e Ji<sup>(38)</sup> demonstraram que o treinamento físico associado à suplementação de glutatona protege o coração de ratos contra a lesão oxidativa e depressão da função cardíaca provocados por isquemia e reperfusão *in vivo*. O mecanismo para esta adaptação foi a elevação do conteúdo miocárdico de glutatona e da capacidade antioxidante, através do incremento das atividades de SOD, GPx, GSH redutase, e  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase miocárdicas.



**Fig. 1** – Contratura cardíaca (%) em diferentes tempos de perfusão coronariana com  $H_2O_2$  (256mmolar.L<sup>-1</sup>), em ratos sedentários e treinados



**Fig. 2** – TBARS em homogeneizado cardíaco após 20 minutos de perfusão coronariana com  $H_2O_2$  (256mmolar.L<sup>-1</sup>), em ratos sedentários e treinados



**Fig. 3** – Correlação entre a FC de repouso e os níveis de lipoperoxidação, avaliados por TBA-RS, em ratos idosos sedentários e treinados fisicamente

Ainda utilizando o modelo animal, Smolka *et al.*<sup>(39)</sup> analisaram o efeito de dois protocolos diferentes de treinamento sobre a expressão de HSP72 (*Heat shock protein* – 72 KDa), uma proteína de estresse com a função de manter e reparar a conformação protéica. Esta proteína está implicada na proteção das células contra diferentes tipos de insultos. Alguns destes insultos, como o estresse oxidativo, estresse térmico e baixo pH resultante do acúmulo de lactato são gerados durante o exercício. Além das adaptações já bastante bem descritas, de incremento da atividade de citrato sintase, catalase e GSH redutase musculares após o treinamento, um achado original deste estudo foi a demonstração de que a indução de HSP72 provocada por uma carga isolada de exercício ocorre somente no grupo mantido sedentário, sugerindo que esta age como um mecanismo protetor complementar ao estresse oxidativo induzido por exercício. Além disso, o grupo de animais submetidos a um protocolo de alta intensidade e curta duração apresentou maior suscetibilidade ao desafio proporcionado pelo exercício agudo que o grupo treinado através de protocolo contínuo. No estudo de Child *et al.*<sup>(40)</sup>, indivíduos treinados foram submetidos a uma prova de meia maratona simulada; observou-se, através da medida da capacidade antioxidante total e do ácido úrico, uma maior habilidade *scavenger* (capacidade de neutralizar os radicais livres formando compostos menos reativos) sobre os RL do soro. Mas mesmo assim o exercício induziu aumento das concentrações de malondialdeído, sugerindo que tais respostas foram insuficientes para prevenir a LPO induzida pelo exercício.

Powers *et al.*<sup>(41)</sup> afirmam que o treinamento habitual de alta intensidade que é necessário para o nível de competição de elite é capaz de aumentar as defesas antioxidantes. Nesta linha de pesquisa, Halliwell<sup>(1)</sup> refere que atletas têm altas concentrações de ceruloplasmina no plasma. A ceruloplasmina é uma  $\alpha$ -globulina que está envolvida no transporte e na regulação do cobre, podendo reduzir diretamente o oxigênio sem intermediários conhecidos, e portanto participante no sistema de defesa antioxidante extracelular.

Em 2000, o estudo de Selamoglu *et al.*<sup>(42)</sup> apresentou diferenças adaptativas entre os exercícios aeróbios e anaeróbios. A atividade da enzima GPx em eritrócitos estava aumentada nos corredores de longa distância comparados com levantadores de peso. Na mesma linha de trabalho, Inal *et al.*<sup>(43)</sup>, analisando o metabolismo anaeróbio em exercício agudo de natação, observaram que a produção de RL foi maior do que a capacidade antioxidante. Por outro lado, Subudhi *et al.*<sup>(22)</sup>, avaliando esquiadores alpinos de elite após treinamento intenso, não observaram mudança nos marcadores de estresse oxidativo, supondo então que estes atletas tiveram uma adaptação positiva em seus mecanismos antioxidantes com o treinamento.

Recentemente, em nosso laboratório, Schneider<sup>44</sup>, Schneider *et al.*<sup>45</sup> e Oliveira *et al.*<sup>46</sup> encontraram uma maior atividade eritrocitária da enzima GPx em triatletas treinados comparados a indivíduos não treinados (figura 4) e uma capacidade antioxidante total plasmática (TRAP) aumentada após o exercício em esteira rolante em ambos os grupos (figura 5). A maior atividade da GPx está de acordo com diversos estudos que mostram adaptação do sistema de defesa enzimático<sup>32,41,47-49</sup>. O aumento no TRAP também foi observado no estudo de Child *et al.*<sup>38</sup> e deve ter ocorrido graças a uma maior liberação de substâncias antioxidantes, entre elas o ácido úrico, como ocorreu no trabalho de Mastaloudis *et al.*<sup>49</sup>.

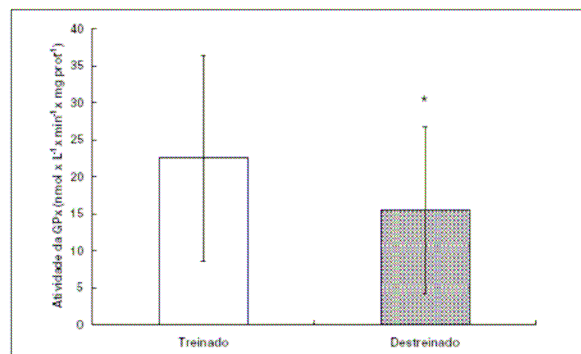


Fig. 4 – Atividade da GPx em eritrócitos de indivíduos treinados (triatletas) e destreinados

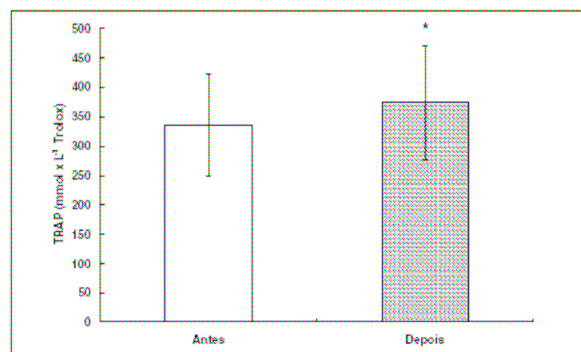


Fig. 5 – Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP) de indivíduos treinados (triatletas) e destreinados, após 40 minutos de exercício

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme o exposto acima, observamos que 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. Talvez alguns trabalhos não sejam capazes de demonstrar um desequilíbrio nos sistemas pró e antioxidantes em razão do curto tempo de exposição ao exercício. Além disso, podemos observar protocolos de exercício diversos, em geral baseados em um percentual do consumo máximo de oxigênio, ou seja, não relativizando a carga de trabalho aos sujeitos do estudo, bem como diferentes técnicas de detecção do estresse oxidativo.

O processo adaptativo do treinamento físico é capaz de proteger os indivíduos treinados na maioria das situações de exposição ao exercício. Uma falha em detectar qualquer mudança na lipoperoxidação ou outro alvo de dano pode sugerir que algumas mudan-

ças compensatórias no sistema antioxidante podem ter ocorrido. Os resultados apontam uma *up-regulation* em relação às enzimas GPx e SOD em músculo esquelético e eritrócitos, mas em relação à enzima catalase os resultados são conflitantes. É interessante notar que diversos trabalhos que avaliam o sistema de defesa antioxidante humano analisam o sistema da glutathione, a GPx e SOD, a capacidade antioxidante total, mas não incluem a atividade da enzima catalase em seus estudos.

Além disso, a ativação de HSPs em exercício agudo e crônico participa do processo de proteção antioxidante. Este mecanismo tem merecido atenção maior nos últimos anos.

Finalmente, como alternativas de estudo podemos apontar no sentido da utilização de protocolos que contemplem exercícios de longa duração e/ou extenuantes aliados a uma dieta rica em nutrientes antioxidantes ou à suplementação de vitaminas e co-fatores de enzimas sobre o estresse oxidativo induzido pelo exercício, bem como o estudo da expressão gênica das enzimas antioxidantes, oxidação de proteínas e DNA, a partir de técnicas mais sensíveis.

*Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.*

## REFERÊNCIAS

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford, 1999.
- Haunks LMA, Viña J, Van Herwaarden CLA, Folgering HTM, Gimeno A, Dekhuijzen PNR. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol* 1999;277:R1697-704.
- Rowlands DS, Downey B. Physiology of triathlon. In: Garrett WE Jr, Kirkendall DT, editors. Exercise and sport science. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000;921-2.
- Lovlim R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, Belcastro AN. Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *Eur J Appl Physiol* 1987;56:312-6.
- Ebelling CB, Clarkson PM. Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med* 1989;7:207-34.
- Jenkins RR. Free radical chemistry relationship to exercise. *Sports Med* 1988;5:156-70.
- Meneguini R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje* 1987;5:28.
- Southom PA, Powis G. Free radicals in medicine II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 1988b;63:390-408.
- Marret LD, Theis B, Ashbury FD. Workshop report: physical activity and cancer prevention. *Chronic Dis Can* 2000;21:143-9.
- Albright A, Franz M, Hornsby G, Kriska A, Marrero D, Ullrich I, et al. American college of sports medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32:1345-60.
- Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, III. *Arq Bras Cardiol* 2001;77(Supl 3):1-48.
- Moncada S, Higgs A. Nitric oxide: role in human disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001. Disponível em [www.els.net](http://www.els.net) em 20 dez 2001.
- Pal Yu B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-62.
- Fischer AB. Intracellular production of oxygen-derived free radicals. Proceedings of a Brook Lodge Symposium, Augusta, Apr. 1987;27-29:99-104.
- Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand* 1980;492:153-68.
- Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl* 1986;25:1058-71.
- Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Guarnieri C, Calderara M, Albertini A, Visioli O. Oxygen-mediated myocardial damage during ischemia and reperfusion: role of the cellular defenses against oxygen toxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17:937-45.
- Bello-Klein A, Oliveira AR, Brunetto AF, Irigoyen MC, Llesuy S, Belló AA. Effect of vitamin A on cardiac contracture induced by hydrogen peroxide. *Med Sci Res* 1994;22:411-13.
- Bello-Klein A, Oliveira AR, Miranda MFS, Irigoyen MC, Homem-de-Bittencourt Jr PI, Llesuy S, et al. Effect of trolox C on cardiac contracture induced by hydrogen peroxide. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:1337-42.
- Åstrand PO, Rodhal K, Dahl HA, Strömme SB. Textbook of work physiology. Physiological basis of exercise. 4<sup>th</sup> ed. Champaign: Human Kinetics, 2003.

21. Viña J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Miñana JB, Pallardó FV, et al. Free radical in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 2000;50:271-7.
22. Subudhi AW, Davis SL, Kipp RW, Askew EW. Antioxidant status and oxidative stress in elite alpine ski racers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2001;11:32-41.
23. Heath GW, Hagberg JM, Ehsani AA, Holloszy JO. A physiological comparison of young and older endurance athletes. *J Appl Physiol* 1981;51:634-40.
24. Gutteridge JMC, Rowley DA, Halliwell B, Cooper DF, Heeley DM. Cooper and iron complexes catalytic for oxygen radical reactions in sweat from human athletes. *Clin Chim Acta* 1985;145:267-73.
25. Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;107:1198-205.
26. Ji LL, Fu R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol* 1992;72:549-54.
27. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993;25:218-24.
28. Nies AM, Hartmann A, Grunert-Fuchs M, Poch B, Speit G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med* 1996;17:397-403.
29. Mills PC, Smith NC, Casas I, Harris P, Harris RC, Marlin DJ. Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *Eur J Appl Physiol* 1996;74:60-6.
30. Palazzetti S, Richard M-J, Favier A, Margaritis I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol* 2003;28:588-604.
31. Margaritis I, Tessier F, M-J Richard, Marconnet P. No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int J Sports Med* 1997;18:186-90.
32. Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M, Ji LL. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol* 1997;272:R363-9.
33. Leaf DA, Kleinman MT, Hamilton M, Barstow TJ. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med Sci Sports Exerc* 1997;29:1036-9.
34. Venditti P, Di Meo S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int J Sports Med* 1997;18:497-502.
35. Belló AA, Belló-Klein A, Oliveira AR, Brunetto AF, Irigoyen MC, Bauermann LF, et al. Hydrogen peroxide as a tool for studying oxidative stress in the heart. *J Braz Assoc Adv Sci* 1996;48:28-36.
36. De Angelis KLD, Oliveira AR, Werner A, Bock P, Bello-Klein A, Fernandes TG, et al. Exercise training in aging: hemodynamic, metabolic, and oxidative stress evaluations. *Hypertension* 1997;30:767-71.
37. Belló-Klein A, Lagranha CJ, Bock P, Barp J, Araujo ASR, Llesuy S, et al. Submaximal exercise training in postnatal rats: hemodynamic and oxidative stress changes. *Exp Clin Cardiol* 2000;5:149-53.
38. Ramirez PR, Ji LL. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol* 2001;281:H679-88.
39. Smolka MB, Zoppi CC, Alves AA, Silveira LR, Marangoni S, Pereira-Da-Silva L, et al. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am J Physiol* 2000;279:R1539-45.
40. Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL, Donnelly AE. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc* 1998;30:1603-7.
41. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31:987-97.
42. Selamoglu S, Turgay F, Kayatekin BM, Günenc S, Yslegen C. Aerobic and anaerobic training effects on the antioxidant enzymes of the blood. *Acta Physiol Hung* 2000;87:267-73.
43. Inal M, Akyüz F, Turgut A, Getsfrid WM. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33:564-7.
44. Schneider CD. Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos submetidos a diferentes intensidades de exercício em esteira rolante [Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em ciências do movimento humano]. Porto Alegre: Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.
45. Schneider CD, Barp J, Ribeiro JL, Belló-Klein A, Oliveira AR. Oxidative stress after three different intensities of running. *Can J Appl Physiol* 2004 (submitted).
46. Oliveira AR, Schneider CD, Ribeiro JL, Derez LF, Barp J, Belló-Klein A. Oxidative stress after three different intensities of running. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35:S367.
47. Tessier F, Margaritis I, Richard M-J, Moynot C, Marconnet P. Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. *Med Sci Sports Exerc* 1995;27:390-6.
48. Hellestein Y, Apple F, Sjodin B. Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1996;81:1484-7.
49. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 2001;31:911-22.

## 2.2. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E ESTRESSE OXIDATIVO

Existem estudos sobre parâmetros hem atológicos relacionados ao exercício. Alterações nos parâmetros hematológicos após exercício de longa duração podem estar relacionados ao dano no atleta (WU *et al.*, 2004), assim como observações que o estresse mecânico pode causar destruição dos eritrócitos, levando à anemia esportiva (ROBINSON *et al.*, 2006).

Alguns artigos sobre estresse oxidativo e exercício têm medido os parâmetros hematológicos como o número de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW), ferritina e reticulócitos, antes e depois de sessões de exercícios.

A resposta do exercício nos parâmetros como número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina foi analisada no estudo de Tauler *et al.*, (2005), em uma prova de ciclismo de montanha de 170 km. Após o exercício a distribuição dos eritrócitos estava mais homogênea do que antes, o que poderia indicar uma população de eritrócitos mais jovens. Episódios contínuos de exercício prolongado e intenso podem produzir uma maior taxa de *turnover* dos eritrócitos devido ao rápido envelhecimento dos eritrócitos e conseqüente eliminação dos eritrócitos velhos. E isto estaria ligado a uma maior ou menor atividade das enzimas antioxidantes.

Sentürk *et al.*, (2005) também avaliaram os eritrócitos de indivíduos sedentários e atletas após exercício exaustivo em bicicleta, tanto antes quanto após um período de dois meses de suplementação com as vitaminas A, C e E. Os autores mostraram que uma simples sessão de exercício intenso foi capaz de aumentar os parâmetros de estresse oxidativo e induzir deterioração da função e estrutura dos eritrócitos em sedentários, o que foi prevenido por dois meses de suplementação AO. Contudo esse comportamento não se repetiu nos indivíduos que eram treinados. Este estudo também mostrou que a diferença entre os eritrócitos sedentários e treinados pode ser parcialmente dependente da jovem população de eritrócitos presente nos indivíduos treinados, os quais são mais resistentes ao estresse oxidativo. Em conclusão, o exercício afeta as propriedades dos eritrócitos e pode levar à hemólise por um mecanismo oxidativo em sedentários, mas não em treinados. O estresse oxidativo pode ser um importante fator responsável pela destruição dos eritrócitos

observada após treinamento vigoroso, agudo em sedentários e/ou em início do período de treinamento.

Os valores de referência para os parâmetros hematológicos são apresentados no quadro 1.

Quadro 1 – Valores de referência dos parâmetros hematológicos em homens adultos

<b>Parâmetro</b>	<b>Referência *</b>
Eritrócitos ( $10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	4,5 – 6,1
Hemoglobina ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	13,3 – 16,7
Hematócrito (%)	39,0 – 50,0
VCM (fL)	82,0 – 98,0
HCM (pg)	27,3 – 32,6
CHCM ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	31,6 – 34,9
RDW (%)	11,6 – 13,9
Reticulócitos (%)	1,00- 2,00
Ferritina ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	30,0 – 300,0

Nota: VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração hemoglobínica corpuscular média; RDW: amplitude de distribuição dos eritrócitos. \* Valores de referência do Laboratório Weinmann, Porto Alegre, RS.

Visto que existe pouca bibliografia sobre os parâmetros hematológicos e o estresse oxidativo em repouso, em atletas ao longo de um período de treinamento, nossa intenção foi observar se haveria alguma mudança com importância fisiológica nos parâmetros hematológicos acima citados.

### **2.3. TRIATLO IRONMAN**

O triatlo é um esporte composto por três modalidades aeróbias sequenciais e contínuas que combina natação, ciclismo e corrida. O *Ironman* triatlo compreende 3,8 km de natação, 180 km de ciclismo e 42,195 km de corrida. A média de tempo total para os 10 primeiros finalistas masculinos do *Ironman* do Havaí 2005 foi de 8h 23min. Existem variações no tempo para completar a prova devido a mudanças ambientais e de terreno



entre os locais dos eventos. Neste tipo de competição o atleta se alimenta principalmente durante a etapa do ciclismo (ROWLANDS, 2000).

Pode-se caracterizar o triatleta de longa distância em relação ao consumo máximo de oxigênio (valores para triatletas de sub-elite no cicloergômetro entre 60,5 e 64,3 mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, na esteira rolante entre 63,7 e 69,9 mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), e ao percentual de gordura (entre 6 a 11 %, considerando o modelo de dois compartimentos: massa gorda e massa livre de gordura) (ROWLANDS, 2000).

Triatletas em treinamento para *Ironman* despendem com o treinamento em média 18.000 kcal semanais. Além disso, fornecem um modelo único para estudar os efeitos do estresse induzido pelo exercício e os efeitos do treinamento prolongado nos processos fisiológicos.

#### 2.4. ASPECTOS NUTRICIONAIS

Vários métodos podem ser usados para avaliar o consumo alimentar dos indivíduos. Sua validade e reprodutibilidade dependem da habilidade do investigador e da cooperação do investigado. Não existe um método de avaliação dietética ideal. Independente do método escolhido ele possui vantagens e desvantagens.

No método prospectivo de registro alimentar estimado, o indivíduo registra no momento do consumo, todo o alimento e bebida ingeridos num período que varia de um dia a uma semana. Costuma-se utilizar o registro de três dias, incluindo um dia do final de semana. As quantidades ingeridas são estimadas em medidas caseiras pelo indivíduo e depois convertidas em gramas pelo pesquisador. Vantagens: não depende da memória, proporciona maior acurácia e precisão quantitativa dos alimentos, identifica tipos de alimentos e preparações consumidos e horários das refeições. Desvantagens: pode interferir no padrão alimentar, requer tempo, exige que o indivíduo saiba ler e escrever, a subestimação é comum, exige alto nível de motivação e colaboração, apresenta dificuldade para estimar a quantidade ingerida.

Conforme Braakhuis *et al.* (2003), a variabilidade entre diferentes investigadores na estimação dos dados de ingestão alimentar em atletas de elite, se dá de forma diferente conforme o nutriente avaliado, sendo o colesterol e as vitaminas C e A as que apresentam a maior variabilidade, e menor variabilidade em energia, carboidratos e magnésio.

Como limitações podemos citar as tabelas e *softwares* de composição de alimentos como potenciais fontes de erro. As principais fontes de dados disponíveis na literatura nacional são incompletas em termos de nutrientes (sobretudo micronutrientes). As fontes de dados internacionais, provavelmente, não são verdadeiras para o teor de nutrientes consumidos no Brasil graças à variabilidade resultante de fatores ambientais, ao preparo e processamento dos alimentos (CUPARI, 2002).

Apesar de tudo isso, o registro alimentar ainda é o método mais usado atualmente para avaliar a ingestão alimentar de grupos ou indivíduos (ZALCMAN *et al.*, 2007).

#### **2.4.1. Nutrição no esporte**

Uma alimentação adequada constitui, em primeiro lugar, uma condição prévia para poder efetuar um esforço de certa intensidade e/ou duração. Em segundo lugar, tratará de equilibrar a perda hidroeletrolítica e energética durante o exercício, mediante o aporte exógeno de nutrientes logo no início e ao longo do mesmo, contribuindo para preservar o glicogênio muscular em esforços contínuos e prolongados. Em terceiro lugar, uma alimentação adequada assegura uma reposição rápida e eficiente dos substratos energéticos depletados durante o exercício e potencializa os processos anabólicos. É preciso levar em consideração o tipo, intensidade e frequência do exercício, bem como as características próprias do atleta de massa corporal e estatura, com o objetivo de estimar a quantidade apropriada de energia (Kcal) e nutrientes (carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas, sais minerais e água) que permitam ao desportista treinar em ótimas condições, obter os melhores resultados nas competições e facilitar uma pronta e eficaz recuperação após o esforço. O esportista deve submeter-se a um regime dietético adequado ao incremento de gasto que sofre (GONZÁLEZ-GROSS *et al.*, 2001; TARNOPOLSKY, 2004; ZARYSKI & SMITH, 2005).

Estudos clássicos estabeleceram que uma dieta rica em carboidratos melhora o desempenho, por manter as reservas de glicogênio. Alguns atletas são capazes de alcançar as recomendações nutricionais (VOGT *et al.*, 2005). Mas muitos atletas preferem comer dietas moderadas em carboidratos, em torno de 43 a 55% do valor energético diário (ROWLANDS, 2000).

O tempo de exercício necessário para completar o *Ironman* pode variar de 8 a 17 horas, o que cria desafios fisiológicos únicos, tais como a homeostase de líquidos e o balanço energético (LAURSEN & RHODES, 1999). O gasto calórico para este evento pode variar de 8.500 a 11.500 kcal (KREIDER, 1991).

As Diretrizes da Sociedade Brasileira de Medicina Esportiva (SOCIEDADE..., 2003) propõe as seguintes recomendações diárias: (a) energia entre 37 a 41 kcal.kg<sup>-1</sup> de peso corporal podendo chegar até 50 kcal.kg<sup>-1</sup> de peso corporal para atividades de longa duração ou treinos intensos; (b) carboidratos até 10g.kg<sup>-1</sup> de peso corporal para adequada recuperação do glicogênio muscular; (c) proteínas entre 1,2 e 1,6g.kg<sup>-1</sup> de peso corporal; e (d) lipídeos em torno de 1g.kg<sup>-1</sup> de peso corporal, distribuídos na proporção de 1:1:1 entre saturados:monoinsaturados:poliinsaturados.

No início do ano de 2000, um comitê da *Food and Nutrition Board* da *United States National Academy of Sciences* publicou a atualização das clássicas *Recommended Dietary Allowance* (RDA) com novas denominações e qualidade de informações, as agora denominadas *Dietary Reference Intake* (DRI) ou Ingestão Dietética de Referência (FOOD..., 1997; FOOD..., 1998; FOOD..., 2000; FOOD..., 2001; FOOD..., 2002).

Neste novo conceito incluem-se além das recomendações diárias para cada nutriente, o Limite de Ingestão Máxima Tolerável (UL), ou seja, o mais alto nível de ingestão de um nutriente que não causará efeitos adversos à saúde da maioria das pessoas. Um valor de UL não pode ser entendido como recomendação permissível de ingestão dietética. Ainda não foram estabelecidos os efeitos benéficos para indivíduos saudáveis que consomem nutrientes acima da RDA (AMAYA-FARFAN *et al.*, 2001).

As DRI são valores numéricos estimados de consumo de nutrientes para uso no planejamento e avaliação de dietas para pessoas aparentemente saudáveis, englobando RDA, ingesta adequada (AI) e limite de ingestão máxima tolerável.

A RDA para um nutriente deve ser empregada para orientar a ingestão dietética média de indivíduos saudáveis, e pretende ser parâmetro para a avaliação de dietas de indivíduos, ou para o planejamento dietético destes.

A AI (*Adequate Intake* ou Ingesta Adequada) é um valor de consumo recomendável, baseado em levantamentos, determinações ou aproximações de dados experimentais, ou ainda, de estimativas de ingestão de nutrientes para grupos de pessoas sadias, e que se considera adequado. É usada quando a RDA não pode ser determinada.

Requerimento dos antioxidantes (AMAYA-FARFAN *et al.*, 2001):

Vitamina C: devido ao seu alto poder redutor, o ácido ascórbico proporciona proteção contra a oxidação no meio aquoso da célula. A RDA para homens foi estipulada em 90 mg.d<sup>-1</sup>. Nessas doses ainda haverá baixa excreção de metabólitos urinários, indicando que a dosagem não é excessiva. A UL é de 2.000 mg.d<sup>-1</sup>.

Vitamina E: a principal função do alfa-tocoferol é interromper as reações em cadeia da lipoperoxidação. A recomendação é de 15 mg.d<sup>-1</sup> e a UL de 1.000 mg.d<sup>-1</sup>.

Beta-caroteno e outros carotenóides pró-vitamínicos A: por não se considerar suficientes os dados consignados na literatura, não se emitiram DRI ou AI para beta-caroteno, beta-criptoxantina e alfa-caroteno, mesmo na sua atividade pró-vitamínica. Da mesma forma não foram emitidos valores para UL devido à divergência dos estudos na literatura. Futuramente, talvez se chegue a um UL próximo dos 10 mg.d<sup>-1</sup>. A cautela da comissão aparentemente se justifica pela forma variável com que vários carotenóides agem; por exemplo, a característica do beta-caroteno de agir como antioxidante quando em baixas concentrações, e como pró-oxidante, quando em altas concentrações.

Vitamina A: a RDA para homens acima de 19 anos é de 900 µg.d<sup>-1</sup> de retinol ou 3.000 UI.d<sup>-1</sup> e a UL 3.000 µg.d<sup>-1</sup> de retinol ou 10.000 UI.d<sup>-1</sup>.

Selênio: funciona associado às seleno-proteínas, muitas das quais são enzimas que protegem contra a oxidação descontrolada no organismo. A recomendação de 55 µg.d<sup>-1</sup> foi baseada na evidência de que é a ingestão de selênio que promove atividade máxima para a enzima glutathiona peroxidase. A UL é de 400 µg.d<sup>-1</sup>.

#### **2.4.2. Nutrição e proteção antioxidante**

A melhora do sistema de defesa antioxidante enzimático que ocorre com o treinamento físico pode não ser suficiente para suprimir o estresse oxidativo induzido pelo exercício, e especula-se se uma suplementação antioxidante seria necessária para indivíduos saudáveis submetidos a exercício físico regular (ASHTON *et al.*, 1998). Uma sugestão interessante seria estimular o consumo de alimentos ricos em antioxidantes (MARZATICO *et al.*, 1997), já que existe uma relação entre o consumo de frutas e vegetais e as concentrações sanguíneas de antioxidantes (STRAIN *et al.*, 2000).

Antioxidante alimentar é toda substância na dieta capaz de reduzir significativamente os efeitos adversos produzidos por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e que possuam função normal no organismo (AMAYA-FARFAN *et al.*, 2001).

Mastaloudis *et al.*, (2004a) observaram um menor dano oxidativo ao DNA, em um grupo de mulheres corredoras que foram suplementadas ao longo de seis semanas com 1000 mg de vitamina C e 300 UI de alfa-tocoferol em comparação ao grupo placebo, após uma ultramaratona de 50 km.

A suplementação antioxidante pode ser feita via dietética ou suplementar. A fibra da dieta pode ser parcialmente responsável pela baixa biodisponibilidade de carotenóides via dietética comparada a suplementos purificados. Foi observada uma redução na biodisponibilidade de beta-caroteno, licopeno e luteína ingeridos sob forma de suplemento misto causada pela presença de diferentes fibras dietéticas (RIEDL *et al.*, 1999).

Alguns estudos usando suplementação de antioxidantes, em especial as vitaminas antioxidantes, têm mostrado um efeito pró-oxidante em atletas participando de exercícios de longa duração (NIEMAN *et al* 2004; McANULTY *et al* 2005). Em geral, as doses das vitaminas usadas de forma suplementar são muito maiores que as possíveis de serem consumidas através da alimentação.

Outro aspecto importante é que dietas desequilibradas e inadequadas podem expor o atleta a um maior risco de deficiências no sistema de defesa antioxidante.

Os estudos com atletas de ultra-resistência têm focado na investigação da intensidade do exercício e sua relação com o desempenho; predominância de combustível, necessidade energética e estresse térmico durante a prova; assim como avaliação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos de frequência cardíaca, consumo de oxigênio, concentração de lactato, quociente respiratório, atividade de enzimas do metabolismo energético, entre outros (LAURSEN & JENKINS, 2002a; LAURSEN *et al*, 2002b; LAURSEN *et al* 2000; KREIDER *et al* 1988a; O'TOOLE, 1989).

Tendo em vista a escassez de estudos longitudinais em populações de atletas, relacionando o estresse oxidativo induzido pelo exercício de ultra-resistência, em especial com controle nutricional a partir da dieta, os autores do presente projeto desenvolveram a metodologia descrita a seguir para a coleta de informações sócio-demográficas, de campo e laboratoriais, em uma amostra de triatletas em treinamento para uma competição de *Ironman*.

### **3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

#### **3.1. Delineamento**

Estudo longitudinal, prospectivo, cruzado.

No delineamento cruzado (*crossover*) metade dos participantes é alocada aleatoriamente para iniciar o estudo no período-controle e então mudar para o tratamento ativo; a outra metade faz o contrário. Essa abordagem permite análises inter e intragrupos. Adotou-se este desenho, em função de suas vantagens por minimizar o potencial de confundimento, pois cada participante serve como seu próprio controle, e aumentar o poder estatístico do ensaio, de forma que seja necessário um menor número de participantes.

#### **3.2. População e Amostra**

A população em estudo foi composta por triatletas do sexo masculino, com mais de 18 anos de idade e em treinamento para uma competição de *Ironman*.

A amostragem foi do tipo não probabilística (intencional).

No *Ironman* realizado na cidade de Florianópolis em 29 de maio de 2005 participaram 24 atletas gaúchos do gênero masculino. Destes, 17 residiam em Porto Alegre e o restante distribuídos nas cidades de Viamão, São Leopoldo, Caxias do Sul e Santa Maria (dados obtidos no *site* oficial da Federação Gaúcha de Triatlo: [www.fgtri.org.br](http://www.fgtri.org.br)).

Fizeram parte deste estudo 13 triatletas, 12 residentes em Porto Alegre, e um participante residente em São Leopoldo. Não houve cálculo amostral em função do número reduzido de atletas praticantes de Ironman. Além disso, alguns indivíduos que praticam o esporte referem desconforto à idéia de coletar sangue.

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa do Exercício (LAPEX) da Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) na cidade de Porto Alegre.

#### **3.3. Instrumentos de Medida**

Para este projeto foram utilizados os seguintes instrumentos:

### **Coleta de dados**

Identificação (nome completo), data de nascimento (dia/mês/ano), telefone (residencial, comercial e celular), endereço eletrônico, doenças (qualquer doença prévia ou atual do atleta), uso de medicamentos e/ou suplementos alimentares (prévio e atual), tabagismo (fez uso de cigarros ou semelhantes no último ano), dados antropométricos (massa corporal, estatura, medidas de dobras cutâneas: tríceps, subescapular, abdominal, coxa, suprailíaca, peitoral e axilar) (Anexo I).

### **Balanças**

1 – Para determinação da massa corporal foi utilizada uma balança eletrônica, modelo PS - 180 da marca Urano, RS/Brasil, com carga máxima de 180 Kg e precisão de 100g.

2 – Para equilibrar os tubos de sangue antes de colocar na centrífuga refrigerada, foi utilizada uma balança de equilíbrio.

### **Compasso de dobras cutâneas**

Para medição das dobras cutâneas, foi utilizado o compasso *slim guide* com precisão de 1mm. No projeto piloto foi utilizado o compasso Lange.

### **Fita antropométrica**

Para auxiliar na localização das medidas de dobras cutâneas foi utilizada uma fita antropométrica de metal de 2m de comprimento, marca Lufkin, com precisão de 1mm.

### **Estadiômetro**

Para medir a estatura foi utilizado um estadiômetro constituído por escala métrica, na qual desliza um cursor que mede a estatura do indivíduo na posição de pé. A escala é fixa a uma base apoiada no solo, com precisão de 1mm.

### **Software de nutrição**

Foi utilizado o Programa de Apoio à Nutrição NutWin versão 1.5 (2002), do Departamento de Informática em Saúde da Universidade Federal de São Paulo. As tabelas de alimentos utilizadas no programa são do departamento de agricultura dos EUA. Além

disso, foram incluídos dados da Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras (PINHEIRO, 2005), da Tabela de Composição de Alimentos (PHILIPPI, 2002) e adição de alimentos regionais a partir da informação nutricional contida no rótulo do alimento.

#### **Monitor de frequência cardíaca**

Durante os testes de laboratório os sujeitos utilizaram o monitor de frequência cardíaca marca Polar, modelo S610.

#### **Espirômetro (analisador de gases)**

Foi utilizado um analisador de gases modelo MGC CPX/D da *Medical Graphics Corporation* (St. Paul, EUA).

#### **Ergômetros**

Os testes foram realizados em: (a) esteira rolante marca *Quinton Instruments*, Seattle, USA; (b) cicloergômetro *CardiO<sub>2</sub>*.

#### **Centrífuga refrigerada**

Uma centrífuga de mesa refrigerada modelo PK 120-R, marca *ALC International SRL*, Milão, Itália, foi utilizada para separar o plasma e glóbulos vermelhos (elementos figurados), e para lavagem dos glóbulos para posterior preparo e armazenamento.

#### **Geladeira**

Para refrigerar as amostras sanguíneas antes do transporte, foi utilizada uma geladeira *Cônsul Praticce 410 Biplex*.

#### **Ultra freezer**

Para acondicionar as amostras sanguíneas até o momento da análise foi utilizado o ultra freezer *Nuaire*.



### **Contador beta**

O contador LKB *Wallac Rack Beta Liquid Scintillation Counter* – 1209; LKB *Producter AB*, Bromma, Suécia, foi utilizado para a medida da quimiluminescência e da capacidade antioxidante total. O circuito de coincidência desconectado, utilizando o canal de trítio.

### **Espectrofotômetros**

O espectrofotômetro *UV-Visible Spectrophotometer* – Cary 1E, foi utilizado para a mensuração das carbonilas e da atividade das enzimas antioxidantes.

O espectrofotômetro *Spectronic 20 Genesis Spectrophotometer*, *Spectronic Instruments*, foi utilizado para a mensuração do ácido úrico, TBARS, compostos fenólicos, grupamentos sulfidril e creatina quinase.

Estes instrumentos encontram-se nos laboratórios de fisiologia e bioquímica do Laboratório de Pesquisa do Exercício (LAPEX) da Escola de Educação Física, do Laboratório de Espécies Ativas de Oxigênio (LEAO) e do Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (CEEEO) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), todos pertencentes à UFRGS.

## **3.4. Seqüência Experimental**

As fontes de dados foram coletadas com cada um dos participantes. Todos os dados foram coletados unicamente para fins deste projeto de pesquisa e serão relatados somente em conjunto. A participação foi voluntária. Os procedimentos de sigilo e proteção de dados serão discutidos no item 3.8. Aspectos Éticos, abaixo.

Todos os indivíduos que aceitaram participar foram informados do objetivo do estudo, dos riscos, benefícios e eventuais desconfortos e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo II).

Na entrevista inicial, foi aplicado o PAR-Q, questionário sobre prontidão para atividade física (anexo III), com o objetivo de excluir indivíduos que tivessem condição imprópria de participar do estudo.

### **Critérios de inclusão**

Ser atleta de triatlo há pelo menos 1 ano, ou seja, estar em treinamento visando uma competição de longa duração, o *Ironman*, e participando de competições nas mais diversas distâncias (short, olímpico, ou *Ironman*).

Não ser fumante e não estar utilizando medicação analgésica ou antiinflamatória durante o período do estudo.

Não estar utilizando suplementos de vitaminas, minerais ou outros com o objetivo de melhorar o desempenho, ou ainda produtos herbais. Caso o participante confirmasse o uso de suplemento foi sugerido que o mesmo descontinuasse o uso por um mês antes do início e durante o período do estudo. Conforme Mastaloudis *et al.* (2001), um mês é tempo suficiente para que os antioxidantes voltem aos níveis basais (*washout*).

Todos os atletas realizaram um eletrocardiograma em repouso e fizeram uma avaliação com o médico cardiologista de nosso laboratório (LAPEX).

### **Intervenção nutricional**

Os atletas foram divididos em dois grupos: controle e intervenção. A entrada dos indivíduos nos diferentes grupos se deu por ordem de chegada no estudo.

Os atletas do estudo receberam uma dieta individualizada, orientada por nutricionista esportiva, observando as necessidades de energia e macronutrientes, frente ao desafio dos crescentes volumes de treino, que contemplasse os nutrientes antioxidantes como vitamina C, vitamina E e vitamina A, conforme proposto por Marzatico *et al.*, (1997).

O grupo controle recebeu uma dieta contendo 100% da recomendação para as vitaminas A e E, e 200% para a vitamina C. o grupo intervenção recebeu uma dieta contendo quantidades de antioxidantes entre a RDA e o limite de ingestão máxima tolerável (UL), ou seja, 200 % das vitaminas A e E, e 500% da vitamina C, todos dentro das recomendações de Ingestão Dietética de Referência (FOOD..., 1997; FOOD..., 1998; FOOD..., 2000; FOOD..., 2001; FOOD..., 2002).

Cada grupo realizou a dieta indicada por duas semanas consecutivas. Após esse período os atletas passaram por um mês de intervalo, considerado período de *washout*. Durante o intervalo foi dito aos atletas que retomassem a sua alimentação convencional.

Após o *washout* os grupos foram cruzados e realizaram a outra dieta por duas semanas consecutivas. Sempre ocorreu coleta sanguínea antes e após as intervenções dietéticas.

Com o objetivo de aumentar a aderência dos atletas à dieta sugerida para cada grupo (controle e intervenção) foi utilizada a técnica de Entrevista Motivacional (MILLER, 2001). O uso da entrevista motivacional aumenta a probabilidade de que uma pessoa se envolva e que possa aderir a uma proposta de mudança. Para tanto, em cada um dos dois períodos de 14 dias de dieta, uma pessoa da equipe com treinamento específico nesta técnica fez contato telefônico com cada atleta a cada quatro dias até que se completassem os 14 dias de dieta.

Após este período um novo *washout* de um mês foi realizado. Todos os atletas receberam uma última intervenção com suplemento de antioxidantes obtidos em farmácia de manipulação. Após duas semanas de suplementação uma nova amostra de sangue foi coletada e os atletas continuaram ingerindo o suplemento até completar oito semanas, onde a última coleta sanguínea foi realizada.

### Planejamento

Ao longo de todo o mês de agosto foi realizado um *washout* inicial com todos os atletas. Também foram realizados os testes iniciais de eletrocardiograma, potência aeróbia máxima ( $\dot{V}O_{2máx}$ ) em esteira e cicloergômetro, antropometria, inquérito alimentar e de exercício. Todo o planejamento pode ser visualizado nas tabelas 1 a 4.

Tabela 1 – Planejamento experimental em agosto de 2005.

D	S	T	Q	Q	S	S
7	8	9	10	11	12	13 ECG e antropom.
14	15 $\dot{V}O_{2máx}$	16 $\dot{V}O_{2máx}$	17 $\dot{V}O_{2máx}$	18 $\dot{V}O_{2máx}$	19 $\dot{V}O_{2máx}$	20
21	22 $\dot{V}O_{2máx}$	23 $\dot{V}O_{2máx}$	24 $\dot{V}O_{2máx}$	25 $\dot{V}O_{2máx}$	26 $\dot{V}O_{2máx}$	27
28	29	30 <b>Sangue</b>	31 <b>Dieta</b>			

Tabela 2 - Planejamento experimental em setembro de 2005.

D	S	T	Q	Q	S	S
				<sup>1</sup> Dieta	<sup>2</sup> Dieta	<sup>3</sup> Dieta
<sup>4</sup> Dieta	<sup>5</sup> Dieta	<sup>6</sup> Dieta	<sup>7</sup> Dieta	<sup>8</sup> Dieta	<sup>9</sup> Dieta	<sup>10</sup> Dieta
<sup>11</sup> Dieta	<sup>12</sup> Dieta	<sup>13</sup> Dieta	<sup>14</sup> <b>Sangue</b>	<sup>15</sup>	<sup>16</sup>	<sup>17</sup>

\* A dieta seguiu até dia 13/09/05, no dia 14/09/05 houve coleta de sangue e a partir daí intervalo *washout*.

Tabela 3 - Planejamento experimental em outubro de 2005.

D	S	T	Q	Q	S	S
<sup>9</sup>	<sup>10</sup>	<sup>11</sup> <b>Sangue</b>	<sup>12</sup> Dieta	<sup>13</sup> Dieta	<sup>14</sup> Dieta	<sup>15</sup> Dieta
<sup>16</sup> Dieta	<sup>17</sup> Dieta	<sup>18</sup> Dieta	<sup>19</sup> Dieta	<sup>20</sup> Dieta	<sup>21</sup> Dieta	<sup>22</sup> Dieta
<sup>23</sup> Dieta	<sup>24</sup> Dieta	<sup>25</sup> Dieta	<sup>26</sup> <b>Sangue</b>	<sup>27</sup>	<sup>28</sup>	<sup>29</sup>

\* A dieta aconteceu do dia 12/10/05 ao dia 25/10/05, dia 26/10/05 houve coleta de sangue e a partir daí intervalo *washout*.

Novembro de 2005 – Intervalo *washout* até dia 22/11/05, dia 23/11/05 houve coleta de sangue, iniciando a suplementação também no dia 23/11/05.

Tabela 4- Planejamento experimental em dezembro de 2005.

D	S	T	Q	Q	S	S
				<sup>1</sup> Suplem	<sup>2</sup> Suplem	<sup>3</sup> Suplem
<sup>4</sup> Suplem	<sup>5</sup> Suplem	<sup>6</sup> Suplem	<sup>7</sup> <b>Sangue</b>	<sup>8</sup> Suplem	<sup>9</sup> Suplem	<sup>10</sup> Suplem
<sup>11</sup> Suplem	<sup>12</sup> Suplem	<sup>13</sup> Suplem	<sup>14</sup> Suplem	<sup>15</sup> Suplem	<sup>16</sup> Suplem	<sup>17</sup> Suplem
<sup>18</sup> Suplem	<sup>19</sup> Suplem	<sup>20</sup> Suplem	<sup>21</sup> Suplem	<sup>22</sup> Suplem	<sup>23</sup> Suplem	<sup>24</sup> Suplem
<sup>25</sup> Suplem	<sup>26</sup> Suplem	<sup>27</sup> Suplem	<sup>28</sup> Suplem	<sup>29</sup> Suplem	<sup>30</sup> Suplem	

\* Suplementação todo mês, havendo coleta de sangue dia 07/12/05.

Janeiro de 2006 – suplementação todo o mês, havendo a última coleta de sangue dia 18/01/06.

### **Registro alimentar e de exercício**

Foi entregue aos indivíduos um registro alimentar de três dias (anexo IV) que foi preenchido e devolvido aos pesquisadores. Também foi solicitado que o atleta fornecesse sua planilha de treinamento semanal, coincidente com o período de registro alimentar, com o objetivo de estimar o gasto calórico com o exercício.

O gasto calórico específico com os exercícios de natação, ciclismo e corrida foram estimados com base na tabela de gasto com exercício (AINSWORTH *et al.*, 1993).

O registro alimentar de três dias foi calculado por nutricionista, com treinamento na área de nutrição esportiva, a fim de identificar se os padrões alimentares atuais (ingesta calórica e distribuição de macro e micronutrientes) estavam de acordo com a Ingesta Dietética de Referência e as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Medicina Esportiva (SOCIEDADE..., 2003), assim como à fase do treinamento em que se encontravam. Esse registro foi utilizado como base para o cálculo das dietas por considerar os hábitos alimentares, locais e horários de refeições de cada indivíduo.

O procedimento de registro alimentar obedeceu a seguinte metodologia:

Foi solicitado que cada atleta registrasse todos os alimentos consumidos em três dias da semana de sua alimentação, sendo um dia atípico (dia atípico: final de semana) e dois dias típicos (dia típico: em geral os dias da semana, em que se segue uma rotina mais semelhante de alimentação). Assinalou-se que estes dias não precisavam ser consecutivos. Deviam ser descritas as refeições com os horários, as quantidades em medidas caseiras e se possível a marca do produto alimentício.

Para minimizar erros na descrição das porções dos alimentos confeccionou-se um material com fotos (baseado no Registro Fotográfico para Inquéritos Dietéticos, ZABOTTO, 1996). Esse material foi distribuído e criteriosamente explicado para cada participante, constando os diferentes tamanhos de pratos, talheres, copos, quantidades (cheio, raso, normal), tamanhos (pequeno, médio e grande) para que os registros fossem detalhados e padronizados.

Após o preenchimento dos registros por parte dos atletas, todas as anotações foram conferidas com os mesmos, para que não houvesse nenhuma dúvida quanto ao material anotado. Todos os registros alimentares foram calculados com o auxílio do software NutWin e as informações nutricionais da média dos três dias foi utilizada.

### Cálculo da dieta

A dieta de cada atleta foi elaborada individualmente, levando em consideração seus hábitos alimentares. Para o cálculo das necessidades de energia e nutrientes foram levados em consideração os registros alimentares e também um cálculo teórico da estimativa do gasto energético conforme proposto pelo Instituto de Medicina Americano (FOOD..., 2002). Mais especificamente, calculou-se uma média de ingestão de energia, macronutrientes e micronutrientes dos registros alimentares. Além disto, foi feita uma estimativa teórica da energia que cada atleta necessitava para suprir suas necessidades. Para tanto, o seguinte protocolo foi adotado: cada atleta devia descrever o tempo gasto em horas em cada uma de suas atividades diárias (como sono, caminhada, trabalho de escritório, sentado), porém sem contabilizar o tempo despendido com seu treinamento. As horas despendidas com o treinamento foram inicialmente contabilizadas como horas de sono, pois foram calculadas separadamente.

A equação utilizada para calcular o gasto está descrita abaixo:

$$EER = 662 - 9,53 \times \text{idade (anos)} + PA \times [15,91 \times \text{massa corporal (kg)} + 539,6 \times \text{estatura (m)}]$$

Onde EER (*Estimated Energy Requirement*) corresponde ao requerimento de energia estimado, e PA (*Physical Activity*) ao nível de atividade física.

Conforme o número de horas que o sujeito fica envolvido em dormir, permanecer sentado, trabalhando em pé, com atividades domésticas leves ou pesadas, é atribuído um fator atividade (FA).

O fator atividade (FA) diária do indivíduo corresponde a um nível de atividade física (PA), o qual pode ser identificado no quadro 2, e é então utilizado na equação da EER descrita acima.

Quadro 2 – Fator atividade

DRI	PA	FA
sedentário	1,00	( $\geq 1 < 1,4$ )
leve	1,11	( $\geq 1,4 < 1,6$ )
ativo	1,25	( $\geq 1,6 < 1,9$ )
muito ativo	1,48	( $\geq 1,9 < 2,5$ )

### **Composição corporal**

Com o objetivo de caracterizar a amostra foi estimada a composição corporal. Para tanto se utilizou a técnica de dobras cutâneas, empregando a equação de predição específica para atletas, composta por sete dobras cutâneas, proposta por Jackson (1978). Como referência, triatletas do sexo masculino tem tipicamente entre 6 e 11 % de gordura corporal (ROWLANDS, 2000).

### **Procedimentos para os testes de exercício**

Os atletas foram orientados verbalmente e por escrito (ANEXO V) a não consumir café ou qualquer tipo de bebidas alcoólicas bem como a não realizar exercícios físicos intensos nas 24 horas que antecediam os testes. Foi solicitado a todos os participantes que comparecessem no dia previamente marcado trajando roupas e calçados adequados para os testes. Para os testes máximos os sujeitos foram instruídos a ingerir seu desjejum habitual, cuidando para não realizar o exercício em jejum, ou com intervalo de no mínimo 1 hora entre o desjejum e o teste, tentando evitar qualquer desconforto gastrointestinal ou mal estar durante o teste. O agendamento dos testes ocorreu de acordo com as possibilidades de horário dos participantes.

### **Testes nos ergômetros**

O equipamento de calorimetria indireta era ligado uma hora antes do primeiro teste, para aquecimento e estabilização das células de análise de gases. Em seguida realizava-se a calibração manual dos gases. Este procedimento foi adotado em todos os dias de teste. A calibração do espirômetro inclui procedimentos de calibração do pneumotacógrafo e do analisador de gases. Uma calibração completa foi realizada pelo menos uma vez por dia. Se as condições do teste fossem alteradas durante o dia por qualquer razão (i.e., alterações consideráveis na temperatura e/ou pressão atmosférica ou falta de energia elétrica), o procedimento completo era repetido.

#### Procedimentos:

a) informação das condições ambientais: antes do início do processo de calibração foram informadas temperatura ambiente, pressão atmosférica e umidade relativa do ar.

b) calibração do volume no pneumotacógrafo: inicialmente foi feita eletronicamente pelo sistema a calibração do volume zero no pneumotacógrafo. Nesse momento era importante assegurar que não houvesse movimento do ar ou que se respirasse perto do pneumotacógrafo, podendo introduzir fluxo. Em seguida, foi realizada a calibração do volume com cinco injeções e ejeções de ar em diferentes velocidades através do pneumotacógrafo com uma seringa de três litros.

c) calibração do analisador de gases: consistia no ajuste das concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> de acordo com as concentrações dos cilindros de referência (21% O<sub>2</sub> e nitrogênio para balanço) e de calibração (12% O<sub>2</sub>, 5,09% CO<sub>2</sub>, e nitrogênio para balanço), da empresa *Air Products*. Por último, foi feita a medida da *phase delay*, ou seja, a diferença de tempo entre a detecção de fluxo pelo pneumotacógrafo, praticamente instantânea, e as medidas das concentrações dos gases pelo analisador.

Durante os testes foram registrados os seguintes parâmetros: consumo de oxigênio por minuto ( $\dot{V}O_2$ ), produção de gás carbônico por minuto ( $\dot{V}CO_2$ ), ventilação por minuto ( $\dot{V}E$ ), pressão parcial de oxigênio ao final da expiração ( $P_{ET}O_2$ ), pressão parcial de gás carbônico ao final da expiração ( $P_{ET}CO_2$ ), razão de troca respiratória (RER), frequência cardíaca, tempo e velocidade.

#### **Teste máximo**

Foram realizados testes de corrida e ciclismo para determinar as variáveis fisiológicas potência aeróbia máxima ( $\dot{V}O_{2\text{máx}}$ ) e limiar ventilatório, através de um teste de cargas progressivas, com o objetivo de caracterizar a amostra.

Os indivíduos eram instruídos a fazer um breve alongamento antes do teste, e após a colocação dos aparatos de frequência cardíaca e máscara de coleta de gases, ficavam sentados por aproximadamente 3 min antes do início do teste.

O teste na esteira rolante foi realizado com protocolo em rampa com velocidade inicial de 5 km.h<sup>-1</sup> e incremento de carga de 0,5 km.h<sup>-1</sup> a cada 20 segundos. O teste no



cicloergômetro foi realizado com protocolo em rampa, velocidade inicial de 25 W e incremento de carga de 25 W.min<sup>-1</sup>. Todos os testes duraram entre 8 e 14 min.

Para interromper o teste, pelo menos dois dos critérios a seguir deveriam ocorrer (i) frequência cardíaca próxima da máxima prevista (220 menos a idade); (ii) platô na curva de consumo de oxigênio; (iii) taxa de troca respiratória maior que 1,15, (iv) através da solicitação voluntária do sujeito, ou qualquer outra situação que colocasse em risco a integridade do indivíduo.

Após o período inicial de testes de potência aeróbia máxima, determinação de limiares ventilatórios e composição corporal, foi elaborada uma pasta com os resultados e entregue a cada um dos participantes.

### **Coleta de sangue**

Todos os participantes realizaram a coleta de sangue pela manhã entre 6:30 e 8:00 a.m., com 8h de jejum e em repouso, ou seja, sem ter praticado nenhum exercício desde o momento de acordar até a hora da coleta sangüínea.

Um profissional treinado e habilitado, coletou 15 mL de sangue da veia da região antecubital, com seringa esterilizada e como anti-séptico álcool a 70%. Todas as seringas e agulhas foram descartadas em caixas de papelão especiais marca Descarpack, São Paulo/Brasil, com capacidade de 13 litros.

As coletas de sangue ocorreram em momentos distintos do treinamento conforme explicado anteriormente.

### **3.5. Descrição das técnicas de análise sangüínea**

O sangue foi coletado e armazenado em tubos tipo *Falkon* contendo 300 µL da solução anticoagulante EDTA a 10%.

Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 5 minutos a 1.000g (3.000 rpm) para separação do plasma e elementos figurados. O plasma foi armazenado em tubos tipo *ependorff* de 1,5 mL e congelado imediatamente em freezer -80°C para posterior análise do TRAP, carbonilas, compostos fenólicos, grupamento sulfidríla, enzima creatina quinase, ácido úrico e TBARS.

Os eritrócitos foram lavados e centrifugados três vezes com igual volume de solução fisiológica. Uma parte usada para análise da quimiluminescência. Os glóbulos lavados foram preparados e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise das enzimas antioxidantes.

Uma parte do sangue integral foi reservada em tubos separados para a análise dos parâmetros hematológicos, e encaminhada no mesmo turno da coleta para o laboratório Weinmann onde foram feitas as análises. O estudo recebeu apoio do laboratório Weinmann para a análise da ferritina, eritrograma e reticulócitos.

### **Parâmetros hematológicos**

Para o eritrograma foi utilizado o analisador automático Sysmex SE9500, para os reticulócitos foi acoplado o módulo RAM ao equipamento acima, usando o corante auramina e com citometria de fluxo para detecção e quantificação dos reticulócitos. Para a ferritina foi utilizado o equipamento Vitros ECI, da *Ortho Clinical Diagnostics*, pela técnica de quimiluminescência.

### **Oxidação de proteínas – Método das carbonilas**

Grupos carbonilas, aldeídos e cetonas podem ser introduzidos em proteínas por diversas reações, e o aparecimento de tal grupo carbonila é tomado como provável evidência de modificação oxidativa. A palavra provável é importante porque a presença de grupos carbonilas é certamente uma modificação não exclusivamente oxidativa. Por exemplo, glicação de proteínas pode adicionar grupos carbonilas em resíduos de aminoácidos. Apesar dessa cautela, o ensaio de grupos carbonilas em proteínas forneceu uma técnica conveniente para detectar e quantificar a modificação oxidativa das proteínas.

A avaliação das carbonilas foi realizada de acordo com o método descrito por Reznick & Packer (1994). O método consiste na reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas formando hidrazonas que podem ser medidas espectrofotometricamente. É uma técnica com alta reprodutibilidade podendo detectar níveis de carbonilas em vários sistemas.

Para a realização do experimento foram utilizados os reagentes:

- Guanidina (PM 95,53): 5,73 g em 10mL de ácido HCl (2,5M) pH 2,5;

2,4 DNPH: 19,8mg em 10mL de ácido HCl 2,5M;

- TCA 20% P/V;
- TCA 10% P/V;
- Etanol – acetato de etila 1:1 (V/V).

Para calcular a proteína utiliza-se uma curva padrão de albumina bovina, dissolvida em guanidina 6M e medida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 280 nm. Para realização da curva de albumina utiliza-se:

- 0,2mg albumina / 0,4 mL de guanidina corresponde a 0,5 mg/mL;
- 0,4mg albumina / 0,4 mL de guanidina corresponde a 1 mg/mL;
- 0,6mg albumina / 0,4 mL de guanidina corresponde a 1,5 mg/mL.

Primeiro coloca-se 0,8 mL de DNPH com 0,2 mL de plasma para que ocorra reação do DNPH com as carbonilas da amostra. Para cada amostra, utiliza-se outro tubo onde se mede a proteína total da amostra. Este tubo é utilizado como “branco”, e as concentrações utilizadas são as mesmas utilizadas para medida das carbonilas. Neste tubo coloca-se 0,2 mL de amostra e 0,8 mL de HCl 2,5 M. Os tubos são incubados por uma hora, preferencialmente no escuro e agitados a cada quinze minutos.

A partir da primeira etapa, descrita acima, as demais são realizadas da mesma forma, tanto para os tubos onde se utilizou DNPH quanto para os tubos onde serão avaliadas as proteínas.

Após é adicionado 1 mL de solução de TCA 20 % em ambos os tubos. Colocam-se os tubos no gelo por 10 minutos e centrifuga-se por cinco minutos em centrífuga refrigerada a 3000 rpm. Usar o precipitado, o sobrenadante é descartado.

Em seguida, acrescenta-se ao precipitado 0,8 mL de TCA 10 % e agita-se mecanicamente com bastão de vidro. Centrifuga-se por cinco minutos. Finalmente o precipitado é lavado por três vezes com 0,8 mL de etanol – acetato de etila para remover o DNPH livre e lipídios contaminantes.

O precipitado final é dissolvido em 0,4 mL de guanidina 6M e agitado por 10 minutos à 37°C. O material insolúvel é removido por centrifugação adicional. O sobrenadante é lido em espectrofotômetro a 360 nm. No tubo onde se mede a proteína total da amostra, lê-se em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 280 nm. Os resultados foram expressos em nmol.mg proteína<sup>-1</sup>.

### Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry *et al.* (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de  $1\text{mg.mL}^{-1}$ .

Para realização deste ensaio serão utilizados os seguintes reagentes:

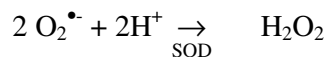
- Reativo de folin ciocalteu diluído em água destilada na proporção de 1:3;
- Reativo C, que é composto por 50 mL do reativo A, 0,5 mL do reativo B1 e 0,5 mL do reativo B2, onde os reativos A, B1 e B2 são respectivamente:  $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sódio) 2% em  $\text{NaOH}$  (hidróxido de sódio) 0,1N;  $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de cobre) 1%;  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6.4\text{H}_2\text{O}$  (tartarato de sódio e potássio) 2%.

Em tubos de ensaio, são adicionados 20  $\mu\text{L}$  de glóbulos vermelhos, previamente preparados para análise das enzimas, em 0,78 mL de água destilada e 2 mL de reativo C preparado a fresco, aguardando-se 10 minutos. Depois, adiciona-se 0,2 mL do reativo de folin ciocalteu, os tubos agitados e aguarda-se mais 30 min. Após, a solução adquire uma coloração azulada que é medida no espectrofotômetro a 625 nm.

O cálculo é feito utilizando-se um fator de correção médio calculado a partir da curva de calibração construída utilizando-se a solução padrão de albumina bovina. Todas as amostras são feitas em duplicata, e a média das absorvâncias utilizada nos cálculos dos resultados das enzimas.

### Superóxido dismutase eritrocitária

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase e a glutathiona peroxidase.



A técnica utilizada para determinação da SOD está baseada na inibição da reação de geração do radical superóxido a partir da auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra catalisa a reação e reduz a quantidade de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , assim há

uma redução da absorvância no sistema de medição. Portanto, quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor a auto-oxidação do pirogalol.

Neste ensaio, não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, por isso, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (MARKLUND, 1985).

Para realização deste ensaio foram utilizados os seguintes reagentes:

- Solução tampão (tris-base na concentração de 50 mM; EDTA na concentração de 1 mM em pH 8,2);
- Pirogalol 24 mM (em ácido clorídrico a 10 mM);
- Enzima catalase a 30  $\mu$ M.

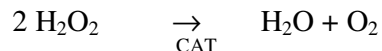
Para se ter o resultado em unidade de SOD, necessita-se de um fator de calibração. Por isso, faz-se necessário a construção de uma curva padrão utilizando três concentrações distintas de SOD (0,25U, 0,5U e 1U), através da qual será obtida a equação da reta para realização dos cálculos. Desta forma, calcula-se o fator de calibração necessário para converter a porcentagem de inibição da auto-oxidação em unidades de enzima.

Em cubeta de quartzo são adicionados 988  $\mu$ L de tampão e 4  $\mu$ L de catalase. Zera-se o espectrofotômetro e adiciona-se 8  $\mu$ L de pirogalol, observando a auto-oxidação do mesmo. Desta forma, obtemos o máximo (100 %) de oxidação desta substância, para calcular a porcentagem de inibição causada pela SOD da amostra. Com a amostra, procede-se da mesma forma, apenas com o reajuste do volume de tampão para 985  $\mu$ L e de amostra para 5  $\mu$ L, para se ter um volume final de 1 mL. Os resultados são expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína (U SOD.mg proteína<sup>-1</sup>).

### **Catalase**

A atividade da catalase (CAT) é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, e obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Sendo

assim, a atividade da enzima catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio.



Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorvância no comprimento de onda de 240 nm, utilizando-se cubetas de quartzo (BOVERIS & CHANCE, 1973).

Para realização deste ensaio são utilizados os seguintes reagentes:

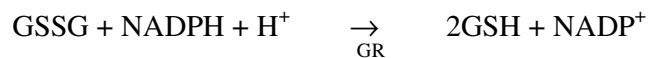
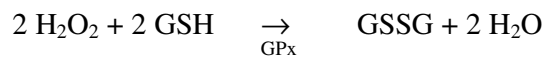
- Solução tampão constituída de fosfatos a 50 mM e pH 7,4;
- Peróxido de hidrogênio 0,3 M.

Em cubeta de quartzo são adicionados 975 µL do tampão fosfato e 10 µL de amostra de sangue, esta cubeta é colocada no espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, são adicionados 15 µL do peróxido de hidrogênio e feito o monitoramento da diminuição da absorvância no comprimento de onda selecionado.

Os resultados são expressos em picomoles por miligrama de proteína (pmol.mg proteína<sup>-1</sup>).

### Glutationa peroxidase

A enzima glutaciona peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutaciona reduzida (GSH) para formar glutaciona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, por isso a sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx.



A amostra é previamente preparada adicionando-se uma mistura de cianetos (cianeto de potássio - KCN 9 mM e ferrocianeto de potássio - K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 0,9 mM), para inibir a atividade pseudo peroxidase da hemoglobina. Inicialmente utiliza-se a mistura de cianetos para se obter o reativo de Drabkin, para medir a quantidade de hemoglobina. Depois de conhecida a concentração de hemoglobina, estas mesmas soluções são

utilizadas, em diferentes proporções, para se obter a solução transformante, que vai transformar toda a hemoglobina em cianometahemoglobina.

Solução transformante:

- 5 mL de KCN 9 mM;
- 5 mL de  $K_3[Fe(CN)_6]$  0,9 mM.

A atividade da GPx é medida em espectrofotômetro. É monitorada a diminuição de absorvância do NADPH a 340 nm (FLOHÉ & GUNZLER, 1984).

Para realização deste ensaio são utilizados os seguintes reagentes:

- Solução tampão de fosfatos 143 mM e EDTA 1 mM, com pH 7,5;
- NADPH 0,24 mM;
- Azida sódica 1 mM, utilizada para inibir a atividade da catalase;
- Hidroperóxido de tert-butila 0,5 mM;
- Glutathione redutase (GR) 0,25 U.mL<sup>-1</sup>;
- Glutathione (GSH) 5 mM.

Em cubeta de quartzo são adicionados 715 µL de tampão, 33 µL de NADPH, 10 µL de azida sódica, 50 µL de hidroperóxido de tert-butila e 17 µL de GR. A absorvância é registrada por um período de aproximadamente 1 minuto, até haver estabilização da linha base. Após, são adicionados 50 µL de GSH, e a diminuição da absorvância monitorada por aproximadamente 2 minutos, esta será considerada a absorvância 1. Finalmente são acrescentados 167 µL da amostra e monitorado por mais 2 minutos, e a diminuição da absorvância será devida ao consumo de NADPH e considerada a absorvância 2. Os resultados são expressos em micromoles por minuto por miligrama de proteína (mmol.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>).

### **TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico**

É um método capaz de estimar o dano ocasionado a lipídios de membrana. Técnica descrita por Draper & Hadley (1990).

- Tampão em temperatura ambiente.
- Retirar 300 µL, juntar com 600 µL TCA (2:1).
- Centrifugar 2600 rpm, por 10 minutos.

- Reagir 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante com 500  $\mu\text{L}$  TBA (0,67%).
- Ferver 20 minutos.
- Resfriar 5 a 10 minutos.
- Ler em 532 nm.

		água destilada		
0 $\mu\text{L}$	TMP (2nmol/mL)	400 $\mu\text{L}$		(Branco)
30 $\mu\text{L}$	TMP (2nmol/mL)	370 $\mu\text{L}$	}	(Curva)
60 $\mu\text{L}$	TMP (2nmol/mL)	340 $\mu\text{L}$		
120 $\mu\text{L}$	TMP (2nmol/mL)	280 $\mu\text{L}$		

Resultados estão expressos em  $\text{pmol.mg prote\u00edna}^{-1}$ .

### Quimiluminesc\u00eancia

A quimiluminesc\u00eancia foi mensurada nos eritr\u00f3citos usando  $400 \text{ mmol.L}^{-1}$  de hidroper\u00f3xido de tert butil. A luz \u00e9 emitida de uma rea\u00e7\u00e3o entre o hidroper\u00f3xido de tert butil e os lip\u00eddeos, e \u00e9 medida em um contador de cintila\u00e7\u00e3o, adaptado para contar a emiss\u00e3o de luz usando um canal de tr\u00edtio. O meio de rea\u00e7\u00e3o consistiu de  $120 \text{ mmol.L}^{-1}$  KCl,  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$  de tamp\u00e3o fosfato (pH 7,4). Resultados expressos em  $\text{cps.mg Hb}^{-1}$  (GONZALEZ-FLECHA *et al.*, 1991; LLESUY *et al.*, 1990).

### Capacidade antioxidante total

A medida de capacidade antioxidante total (TRAP), de acordo com a t\u00e9cnica descrita por Lissi *et al.* (1995), \u00e9 baseada na avalia\u00e7\u00e3o da capacidade antioxidante da amostra em compara\u00e7\u00e3o com os valores obtidos atrav\u00e9s do trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-\u00e1cido carbox\u00edlico), que \u00e9 considerado antioxidante padr\u00e3o.

A *curva de calibra\u00e7\u00e3o* \u00e9 feita adicionando 3 mL de tamp\u00e3o AZO {2,2-azo-bis(2-amidinopropano)hidrocloruro} 20 mM-fosfato 50 mM (pH: 7,4) num vial de cintila\u00e7\u00e3o e agregando 10 $\mu\text{L}$  de luminol (5-amino-2,3-dehidro-1-4-ftalazinediona) 5,6 mM. Faz-se a leitura basal no contador beta, observando se os valores iniciais s\u00e3o acima de 50.000 cps. Agrega-se ent\u00e3o 2,5 ou 5  $\mu\text{L}$  de trolox 320  $\mu\text{M}$  (s\u00e3o feitas duas curvas com quantidades diferentes de trolox) e faz-se leituras at\u00e9 que se tenha obtido uma emiss\u00e3o semelhante \u00e0 leitura basal.



Para a *análise da amostra* coloca-se 3 mL de tampão AZO 20 mM-fosfato 50 mM (pH: 7,4) num vial de cintilação, agrega-se 10 µL de luminol 5,6 mM e faz-se a leitura basal. Agrega-se então o plasma e mede-se até a emissão máxima. As quantidades de plasma utilizadas variam de 10 a 35 µL, dependendo da amostra, e são considerados no cálculo final.

Os resultados são expressos em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  trolox.

### **Ácido úrico**

Tem sido considerado um marcador antioxidante não enzimático.

Análise através de kit comercial URICOSTAT Enzimático AA (Wiener Laboratories, Argentina).

Reagente 4-AF/POD: adicionar água destilada (50 mL).

Reagente de trabalho:

- 80 partes de água destilada,
- 10 partes de Fenol,
- 10 partes de 4-AF/POD,
- 0,8 parte de uricase

Colocar nessa ordem, não homogeneizar muito, apenas verter.

20 µL de amostra + 1 mL de tampão de trabalho.

Misturar,

Incubar por 15 minutos a 37 °C,

Deixar esfriar,

Ler em espectrofotômetro a 505 nm,

Cor estável por 45 minutos.

Para 36 amostras:

- 40 mL de água destilada,
- 4 mL de fenol,
- 4 mL de 4-AF/POD,
- 320 µL uricase.

Branco - água destilada,

Padrão e amostras em duplicata.

Os resultados são expressos em  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### Compostos fenólicos

É considerado um marcador antioxidante, e está relacionado com os componentes da dieta alimentar. Técnica descrita por Waterman & Mole (1994).

Curva: 5, 10, 20, 30 e 40  $\mu\text{L}$  padrão, completar para 100  $\mu\text{L}$

100  $\mu\text{L}$  plasma

300  $\mu\text{L}$  TCA 10%

100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante,

1300  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ ,

100  $\mu\text{L}$  Folin,

200  $\mu\text{L}$  de solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,

200  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$

725 nm

Solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ :

- 35 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (100 mL) de água destilada,
- Dissolver o sal a  $70^\circ\text{C}$  -  $80^\circ\text{C}$ ,
- Deixar descansar por 24 h e após esse período semear com um cristal de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e filtrar.

Os resultados são expressos em equivalentes de ácido tânico. $\text{mL}$  plasma $^{-1}$ .

### Sulfidril

Os grupos sulfidril foram determinados no plasma por espectrofotometria, como descrito por Ellman (1958). 100  $\mu\text{L}$  de plasma são diluídos, e incubados com 15  $\mu\text{L}$  DTNB 2 mM (5,5- dithiobis-2-nitrobenzoate) e 685  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato por 5 minutos a temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 412 nm. Como padrão foi usada a cisteína.

Os resultados são expressos em  $\text{tiol}\cdot\text{mg}$  prot $^{-1}$ .

### **Creatina quinase total**

Enzima marcadora do dano muscular.

Foi realizada a determinação quantitativa em modo cinético da creatina quinase total (CK) no plasma, com a utilização de kit comercial CK-NAC Liquiform (Labtest, Brasil).

Os resultados foram expressos em U.L<sup>-1</sup>.

### **3.6. RECURSOS HUMANOS**

Doutoranda: Cláudia Dornelles Schneider (Nutricionista)

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Reischak de Oliveira

Colaboradores:

LAPEx: Belmar Andrade (Cardiologista)

Geórgia Franco Becker (Nutricionista)

Giovani dos Santos Cunha (Educador Físico)

Ricardo Rocha (Graduando em Educação Física)

LEAO: Doutoranda Jaqueline Barp (Farmacêutica)

Roberta Mendes (Doutoranda)

CEEQ: Doutorando Márcio Martins Silveira (Educador Físico)

PPG Psiquiatria: Doutoranda Elisabeth Meyer da Silva

### 3.7. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Todas as informações coletadas foram armazenadas em um banco de dados elaborado especialmente para este fim, e analisadas com o auxílio do programa estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 10.0.

Todas as variáveis contínuas foram verificadas quanto ao pressuposto de normalidade, através do teste Shapiro-Wilk, e de homocedasticidade de variâncias através do teste de Levene ou do teste de esfericidade de Mauchly.

Foi utilizado o teste t pareado para verificar as diferenças entre antes e depois das intervenções dietéticas, para as variáveis de resposta nutricionais e bioquímicas TBARS, TRAP, SOD, CAT, GPx, carbonilas, sulfidril, ácido úrico, compostos fenólicos e CK.

Para avaliar o comportamento dos parâmetros de estresse oxidativo ao longo do período de treinamento e o efeito das intervenções dietéticas foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas e *post hoc* de Bonferroni.

Para avaliar a associação entre os níveis da enzima creatina quinase e os parâmetros de estresse oxidativo foi utilizada a correlação de *Pearson*.

O nível de significância utilizado foi de 5%, conforme estudos padronizados desta natureza.

### 3.8. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aceito pelo comitê de ética em pesquisa PROPESQ/UFRGS sob nº 2005474 (anexo VI).

Todos os participantes receberam os esclarecimentos necessários sobre os objetivos da pesquisa. Foi garantida a confidencialidade assim como a possibilidade de recusa ou abandono da pesquisa em qualquer momento. Para proteger a privacidade dos participantes e estimular respostas sinceras nos registros, cada indivíduo recebeu um número de identificação usado para identificar seus dados nos diferentes momentos. Concordando com a inclusão no estudo, foram integrados ao protocolo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os dados serão mantidos em local considerado seguro pelos responsáveis do projeto. Apenas os membros da equipe, diretamente ligados à pesquisa, tiveram acesso e manusearam os dados coletados.

O material original será guardado em ambiente seguro por no mínimo cinco anos. Espera-se que este projeto gere informações importantes sobre atletas de triatlo em treinamento para uma competição de *Ironman*. Para todos os atletas o envolvimento na pesquisa irá aumentar seu conhecimento sobre necessidades nutricionais individuais de treinamento, tais como a ingesta calórica, distribuição de macro e micronutrientes, especificamente os antioxidantes. Além disso, eles receberam os resultados dos testes bioquímicos, do eletrocardiograma em repouso, da avaliação da composição corporal e do teste ergoespirométrico realizados durante o projeto, bem como aprenderam sobre o significado dos mesmos.

Outros estudos permitiram observar que muitos dos participantes apreciam participar de pesquisas. Eles têm boa vontade em participar das entrevistas de acompanhamento e com frequência ficam desapontados quando o último encontro é realizado. Fazer parte de um projeto de pesquisa frequentemente induz os participantes a modificarem seus comportamentos. Assim, a pesquisa em si é uma oportunidade para que os participantes avaliem seu modo de vida.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados as características gerais dos participantes, e os três artigos resultantes dessa tese, denominados de estudo 1 a estudo 3. Cada estudo possui a formatação de acordo com as normas de publicação da revista selecionada. Para facilitar a leitura, optamos por deixar nesse documento as tabelas e figuras na ordem em que se inserem, e não ao final do artigo como em geral é solicitado pelas revistas. Além disso, dados individuais de todos os parâmetros avaliados estão relacionados no anexo VII.

### 4.1. Características do grupo

A tabela 5 apresenta a caracterização da amostra no início do estudo.

Tabela 5 – Características gerais da amostra ao início do estudo.

n=13	Média $\pm$ dp	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	32,1 $\pm$ 5,4	22	42
Massa corporal (kg)	74,1 $\pm$ 6,2	63,0	85,9
Estatura (cm)	175,5 $\pm$ 5,0	168	185
$\dot{V}O_{2\text{máx}}$ esteira (mL.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	58,6 $\pm$ 6,9	49,6	74
Limiar anaeróbio na esteira (mL.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )*	50,4 $\pm$ 6,3	42,8	61,9
$\dot{V}O_{2\text{máx}}$ bicicleta (mL.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	60,0 $\pm$ 6,7	50,3	69,6
Limiar anaeróbio na bicicleta (mL.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )*	47,6 $\pm$ 6,7	35,8	56,6
Gordura corporal (%)	15,0 $\pm$ 5,3	7,7	25,2
Volume treino (h.sem <sup>-1</sup> )	15,5 $\pm$ 3,4	10,6	21,0
Prática de triatlo (anos)	5,9 $\pm$ 4,2	1	15
<i>Ironman</i> realizados		0	7

\*Os limiares anaeróbios foram determinados pelo método do limiar ventilatório.

Em relação ao treinamento para *Ironman*, este se caracteriza por realizar-se predominantemente sob intensidades aeróbias. A tabela 6 apresenta a planilha de treinamento simplificada de um dos atletas, de forma a exemplificar as distâncias

percorridas semanalmente para cada uma das três modalidades que compõem o *Ironman*. Este detalhamento foi feito em três momentos distintos ao longo da temporada.

Tabela 6 – Quantificação da carga de treino na Natação, Ciclismo e Corrida do atleta 12, representativo dos participantes deste estudo.

Modalidade	Momento 1 (22 a 28/08/2005)	Momento 2 (03 a 09/10/2005)	Momento 3 (12 a 18/12/2005)
Natação (km.sem <sup>-1</sup> )	8,9	11,7	7,6
Ciclismo (km.sem <sup>-1</sup> )	120	145	155
Corrida (km.sem <sup>-1</sup> )	25	28,1	33
TOTAL (km.sem <sup>-1</sup> )	153,9	184,8	195,6

Não encontramos diferenças importantes nos parâmetros hematológicos ao longo do período do estudo que tivessem implicação sobre a saúde dos triatletas. Os dados individuais são apresentados no anexo VIII.

Não encontramos associação entre a enzima creatina quinase e os parâmetros de estresse oxidativo, avaliado através do teste de correlação de *Pearson*, demonstrado na tabela 7.

Tabela 7 – Associação entre a enzima creatina quinase e parâmetros de estresse oxidativo

Parâmetros	Antes suplementação		8 semanas de suplementação	
	r	p	r	p
Catalase	-0,101	0,743	-0,082	0,800
Superóxido dismutase	0,211	0,488	0,302	0,341
Glutathiona peroxidase	-0,069	0,822	0,073	0,822
TBARS	-0,293	0,331	0,062	0,848
Carbonil	0,312	0,299	0,063	0,846
Sulfidril	0,308	0,306	0,068	0,835
Ácido úrico	-0,126	0,681	-0,137	0,671
TRAP	0,308	0,756	-0,172	0,594
Fenólicos	0,212	0,486	-0,130	0,687

## 4.2. Estudo 1: EXERCÍCIO AGUDO E ESTRESSE OXIDATIVO

Este estudo foi desenvolvido antes do estudo principal, considerado projeto piloto.

Os resultados parciais deste trabalho foram apresentados na forma de pôster no Congresso Internacional do Colégio Americano de Medicina Esportiva (*ACSM 53th Annual Meeting, Denver*) em junho de 2006.

Este trabalho foi submetido para publicação na Revista Brasileira de Medicina do Esporte. O artigo foi submetido em 21 de maio de 2007 (anexo IX).

### EFEITO DO EXERCÍCIO DE ULTRA-RESISTÊNCIA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

#### RESUMO

**Introdução:** Exercícios de longa duração podem levar ao desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante, acarretando dano a lipídeos, proteínas e DNA. Entretanto, alguns estudos avaliando triatlo *Ironman* observaram proteção aos lipídeos. **Objetivo:** Avaliar parâmetros de estresse oxidativo após uma competição de meio *Ironman*. **Métodos:** Participaram 11 sujeitos com idade de  $31,1 \pm 3,3$  anos, massa corporal  $72,4 \pm 5,4$  kg, estatura  $176,2 \pm 4,8$  cm, gordura corporal  $9,8 \pm 3,3$  %,  $\dot{V}O_{2\text{máx}}$  na corrida  $60,7 \pm 6,0$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. Foram mensurados: dano a lipídeos através da quimiluminescência nos eritrócitos e TBARS no plasma, dano a proteínas através das carbonilas plasmáticas, ácido úrico e compostos fenólicos plasmáticos, assim como a atividade antioxidante enzimática da catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase nos eritrócitos. **Resultados:** Houve uma redução na atividade da enzima superóxido dismutase ( $23,24 \pm 1,49$  para  $20,77 \pm 2,69$  U SOD.mg proteína<sup>-1</sup>,  $p=0,045$ ), e um aumento no ácido úrico ( $40,81 \pm 10,68$  para  $60,33 \pm 6,71$  mg.L<sup>-1</sup>,  $p<0,001$ ) logo após a competição. Não houve diferença estatisticamente significativa na atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase e nos compostos fenólicos totais, assim como não foi observado dano a lipídeos (TBARS e quimiluminescência) e proteínas (carbonilas). **Conclusão:** Este grupo de atletas não sofreu estresse oxidativo, provavelmente devido à liberação de ácido úrico e outros antioxidantes no plasma.

**Palavras-chave:** radicais livres, ácido úrico, superóxido dismutase.



## ABSTRACT

Ultra endurance exercise could unbalance pro and antioxidant system, leading to lipid, protein and DNA damage. Nevertheless, some studies evaluating *Ironman* triathlon found protection to lipids. **Purpose:** Evaluate oxidative stress parameters after a half-*Ironman* competition. **Methods:** Eleven subjects aging  $31.1 \pm 3.3$  yr, body weight  $72.4 \pm 5.4$  kg, height  $176.2 \pm 4.8$  cm, body fat  $9.8 \pm 3.3$  %,  $\dot{V}O_{2\max}$  on run  $60.7 \pm 6.0$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, participate in this study. The following data were measured: lipid damage by chemoluminescence in erythrocyte and TBARS in plasm, protein damage by plasmatic carbonyls, uric acid and phenolic compounds, as well as the antioxidant enzymatic activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes. **Results:** A reduction in superoxide dismutase ( $23.24 \pm 1.49$  to  $20.77 \pm 2.69$  U SOD.mg protein<sup>-1</sup>,  $p=0.045$ ), and a rise in uric acid ( $40.81 \pm 10.68$  to  $60.33 \pm 6.71$  mg.L<sup>-1</sup>,  $p<0.001$ ) were found soon after the competition. No differences were found in catalase and glutathione peroxidase, phenolic compounds as well as in lipid (TBARS and chemoluminescence) and protein (carbonyl) damage. **Conclusion:** These athletes did not suffer oxidative stress, probably due to uric acid and other plasmatic antioxidants.

**Keywords:** free radicals, uric acid, superoxide dismutase.

## INTRODUÇÃO

Exercícios extenuantes ou de longa duração estão relacionados ao dano tecidual e podem causar estresse oxidativo<sup>(1-3)</sup>, uma vez que o exercício aumenta o consumo de oxigênio e causa um distúrbio na homeostase pró e antioxidante intracelular<sup>(4)</sup>. Os radicais livres (RL) produzidos pelo exercício podem ser o estímulo inicial para a biogênese mitocondrial em uma situação de treinamento crônico<sup>(5)</sup>. A melhora do sistema antioxidante (AO) parece depender das cargas de treinamento<sup>(6)</sup>, sendo tais adaptações tecido-específicas, sugerindo um mecanismo regulatório complexo<sup>(7)</sup>. O treinamento físico pode prevenir parcialmente a formação de RL no exercício exaustivo<sup>(8)</sup> e pode aumentar as defesas AO<sup>(9)</sup>. Ainda não foi descoberto nenhum índice absoluto e definitivo de estresse oxidativo (EO), no entanto, os RL ao reagirem com compostos biológicos produzem derivados oxidados cujos níveis podem ser usados como índices de EO. Pode-se medir a peroxidação lipídica, o dano a proteínas e DNA, e mudanças no estado dos compostos AO e atividade de enzimas AO. Tem crescido o interesse por esportes de longa duração como

maratonas, corridas de aventura, e triatlo de longa distância como *Ironman* e meio-*Ironman*. Artigos relacionando exercício de longa duração ao EO apontam para o desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante, podendo acarretar dano a lipídeos<sup>(10-12)</sup> e proteínas<sup>(13)</sup> de membrana, assim como ao DNA<sup>(14)</sup>. Entretanto, estudos avaliando triatletas após o *Ironman* do Havaí observaram proteção aos lipídeos de membrana<sup>(15, 16)</sup>. Além disso, estudos mais recentes investigam se a suplementação AO seria capaz de proteger do dano oxidativo em Ironman, mas os estudos ainda não são concordantes<sup>(12, 17, 18)</sup>. Como pudemos observar, os resultados do efeito do exercício de longa duração sobre o EO em humanos são conflitantes. São poucos os artigos que apresentam a medida destes parâmetros em atletas brasileiros. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi mensurar os parâmetros bioquímicos sanguíneos de estresse oxidativo em triatletas brasileiros após uma competição de meio *Ironman*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Participaram deste estudo 13 triatletas voluntários do sexo masculino, com idade média de  $31,1 \pm 3,3$  anos, residentes na cidade de Porto Alegre e grande Porto Alegre. Os sujeitos participaram de uma competição de triatlo de longa distância, integrante do calendário da Federação Gaúcha de Triatlo, que ocorreu em 15 de fevereiro de 2004 no Balneário Pinhal, RS. A competição contemplou 1,9 km de natação, 90 km de ciclismo e 21 km de corrida, caracterizando um meio *Ironman*. Todos os atletas estavam engajados em um treinamento que objetivava a participação no *Ironman* de Florianópolis.

Os atletas foram orientados a ingerir o seu desjejum habitual, assim como a manter os procedimentos de alimentação e hidratação a que estavam acostumados no dia da competição, não havendo interferência por parte dos pesquisadores nestes parâmetros. Foram coletadas amostras sanguíneas antes e logo após a competição por um profissional habilitado. As amostras de sangue foram preparadas e aliqüotadas em tubos plásticos de 1,5 mL, congeladas e transportadas em um container contendo nitrogênio líquido para o laboratório de bioquímica da Escola de Educação Física (ESEF) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) onde foi armazenado a  $-73^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises.

Dos 13 atletas que realizaram a coleta de sangue inicial dois não completaram a etapa do ciclismo, sendo automaticamente excluídos do estudo. Desta forma a amostra final foi composta por 11 triatletas. Todos os indivíduos foram informados do objetivo,

possíveis desconfortos, riscos e benefícios do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com a declaração de Helsinki. O estudo foi aceito pelo comitê de ética em pesquisa da UFRGS.

Previamente à competição, os atletas foram avaliados no laboratório de pesquisa do exercício da ESEF da UFRGS. Para medir o consumo máximo de oxigênio na esteira rolante foi realizado um teste incremental em rampa, utilizando um sistema automático ergoespirométrico, respiração a respiração (CPX/d; Medical Graphics Corporation; St Paul, MN). Para medir a massa corporal foi utilizada balança digital, com resolução de 100g e capacidade máxima de 180,0 kg, e para medir a estatura foi utilizado o estadiômetro com precisão de 0,5 cm e capacidade máxima de 210 cm, ambos da marca Urano (Canoas, RS). Para avaliar o percentual de gordura corporal foi utilizado o método de dobras cutâneas, utilizando o adipômetro Lange, com a equação de predição com sete dobras cutâneas para atletas<sup>(19)</sup>.

#### **Análises Bioquímicas:**

Uma amostra de sete mL de sangue foi coletada de uma veia na região antecubital e armazenada em tubos plásticos com 100 µL de EDTA 10%. O sangue foi centrifugado por cinco min a 1000g em centrífuga refrigerada, o plasma aliquoteado e congelado para análise das carbonilas, TBARS, compostos fenólicos e ácido úrico. Os eritrócitos foram lavados três vezes com igual volume de solução fisiológica e mantidos refrigerados. Uma parte foi preparada e congelada para posterior análise da atividade de enzimas antioxidantes e outra parte utilizada para a análise da quimiluminescência, realizada no dia seguinte a coleta de sangue. Foram utilizados os seguintes equipamentos: (a) para análise da QL: um contador (LKB Wallac Rack Beta Liquid Scintillation Counter – 1209, LKB Producter AB, Bromma, Suécia), com o circuito de coincidência desconectado, utilizando o canal de trítio; (b) para mensurar as carbonilas e a atividade das enzimas catalase, Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase foi utilizado um espectrofotômetro (*UV-Visible Spectrophotometer* – Cary 1E, Varian, Austrália); (c) para medir o TBARS, ácido úrico e compostos fenólicos foi utilizado um espectrofotômetro (Spectronic 20 Genisys Spectrophotometer, Spectronic Instruments, NY, USA).

*Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD):* foi determinada nos eritrócitos pela taxa de inibição da auto-oxidação do pirogalo a 420 nm. Esta atividade foi determinada a partir de uma curva padrão de SOD disponível comercialmente

(percentagem de inibição da auto-oxidação do pirogalol). O meio de reação consistiu de 50 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão tris (pH 8,2), 24 mmol.L<sup>-1</sup> pirogalol, e 30 μmol.L<sup>-1</sup> catalase. Resultados expressos em U SOD.mg proteína<sup>-1</sup> (20). *Atividade da enzima Catalase (CAT)*: Foi medida nos eritrócitos pelo consumo de peróxido de hidrogênio a 240 nm. O meio de reação consistiu de 50 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão fosfato (pH 7,4) e 0,3 mol.L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio. Resultados expressos em pmol.mg proteína<sup>-1</sup> (21). *Atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx)*: Foi medida através da oxidação do NADPH a 340 nm. O meio de reação consistiu de 143 mmol.L<sup>-1</sup> tampão fosfato (pH 7,5), 1 mmol.L<sup>-1</sup> azida sódica, 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> hidroperóxido de tert butyl, 0,25 U.mL<sup>-1</sup> glutathione redutase, 0,24 mmol.L<sup>-1</sup> NADPH, e 5 mmol.L<sup>-1</sup> glutathione reduzida. Resultados expressos em mmol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>(22). *Quimiluminescência (QL)*: foi mensurada nos eritrócitos usando 400 mmol.L<sup>-1</sup> de hidroperóxido de tert butil. A luz é emitida de uma reação entre o hidroperóxido de tert butil e os lipídeos, e é medida em um contador de cintilação, adaptado para contar a emissão de luz usando um canal de trítio (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer, modelo 1215, LKB-Produkter AB, Suécia). O meio de reação consistiu de 120 mmol.L<sup>-1</sup> KCl, 30 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão fosfato (pH 7,4). Resultados expressos em cps.mg Hb<sup>-1</sup> (23, 24). *Substâncias Reativas ao Ácido Tio-Barbitúrico (TBARS)*: foi mensurado no plasma. Juntar 300 μl plasma com 600 μl TCA (2:1), centrifugar a 10.000 g por 10 min. Reagir 500 μl do sobrenadante com 500 μl TBA (0,67%). Ferver 20 minutos e após resfriar 5 min. Ler a 532 nm. Resultados expressos em pmol.mg proteína<sup>-1</sup> (25). *Ácido Úrico*: Foi analisado no plasma através do kit comercial Uricostat enzimático AA (Wiener Laboratórios – Argentina). Resultados expressos em mg.L<sup>-1</sup>. *Carbonilas*: O método consiste na reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas formando hidrazonas que são medidas espectrofotometricamente a 360 nm. (1) coloca-se o DNPH com o plasma. Para cada amostra, utiliza-se outro tubo onde, mede-se a proteína total da amostra, usando HCl ao invés de DNPH; (2) é adicionado o TCA 20% e em seguida TCA 10% em ambos os tubos, para a precipitação das carbonilas e proteínas; (3) o precipitado é lavado com etanol e acetato de etila para remover o DNPH livre e lipídios contaminantes. O precipitado final é dissolvido em guanidina e lido a 360 nm. A proteína total da amostra lê-se a 280 nm. Resultados expressos em nM.mg proteína<sup>-1</sup>(26). *Compostos Fenólicos Totais*: foram dosados no plasma utilizando o método modificado do Folin-Ciocalteau. 100 μL de plasma foram misturados a 300 μL de ácido tricloroacético

15%, e centrifugados a 10.000g por 10 min a 4°C. Após, 100 µL do sobrenadante foram adicionados a 1.500 µL de água destilada, 100 µL Folin-Ciocalteu e 200 µL de solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. As amostras foram então comparadas espectrofotometricamente a 725nm com amostras de ácido tânico que serviu como padrão. Resultados expressos em equivalentes de ácido tânico.mL plasma<sup>-1(27)</sup>. *Medida da Proteína:* Foi medida de acordo com o método amplamente utilizado de Lowry, 1951<sup>(28)</sup>.

Tratamento estatístico: Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (DP) e foram analisados com o auxílio do pacote estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, 10.0). Foi utilizado o teste t pareado, e nível de significância p<0,05.

## RESULTADOS

Após análise exploratória dos dados verificou-se que as variáveis apresentaram comportamento normal. As características descritivas da amostra compreendem idade 31,1 ± 3,3 anos, massa corporal 72,4 ± 5,4 kg, estatura 176,2 ± 4,8 cm, gordura corporal 9,8 ± 3,3 %,  $\dot{V}O_{2\text{máx}}$  na corrida 60,7 ± 6,0 mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. Os atletas levaram entre 4h27min51s e 5h30min23s (300,2 ± 24,3 min) para completar a competição.

A tabela 1 apresenta os parâmetros de estresse oxidativo antes e após a competição de meio *Ironman*.

Tabela 1 – Parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo antes e depois de uma competição de meio *Ironman* em uma amostra de 11 triatletas.

Variáveis	Antes	Depois	p
	Média ± DP	Média ± DP	
Quimiluminescência (cps.mg Hb <sup>-1</sup> )	16249 ± 1577	16989 ± 1532	0,331
TBARS (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	5,66 ± 2,26	7,33 ± 1,55	0,068
Carbonilas (nmol.mg prot <sup>-1</sup> )	5,43 ± 1,64	5,10 ± 1,47	0,582
Fenólicos (equival. ácido tânico.mL plasma <sup>-1</sup> )	87,7 ± 19,2	101,4 ± 21,4	0,080
Ac. Úrico (mg.L <sup>-1</sup> )	40,8 ± 10,7	60,3 ± 6,7	0,000*
Catalase (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	21,4 ± 4,0	18,4 ± 3,3	0,058
Superóxido Dismutase (U SOD.mg prot <sup>-1</sup> )	23,3 ± 1,4	21,0 ± 2,7	0,044*
Glutationa Peroxidase (mmol.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	4,19 ± 0,51	3,95 ± 0,66	0,239

\* diferença significativa entre antes e depois (p<0,05).

Pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa para os parâmetros de dano a lipídeos (TBARS e quimiluminescência) ou proteínas (carbonilas). A atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase, assim como os compostos fenólicos totais não se mostraram alterados após a competição.

Foi constatado um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) nas concentrações plasmáticas de ácido úrico após a competição de meio *Ironman* (tabela 1). Observou-se uma redução significativa ( $p = 0,044$ ) na atividade da enzima Superóxido Dismutase após a competição de meio *Ironman* (tabela 1).

## DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito do exercício de longa duração sobre o estresse oxidativo em uma situação real de competição. Através das técnicas utilizadas neste estudo, não foi possível identificar dano a lipídeos ou a proteínas de membrana após o meio-*Ironman*. De acordo com nossos resultados, o trabalho de Oztasan *et al.*<sup>(29)</sup>, mostrou que ratos submetidos a exercício até a exaustão, após terem recebido um treinamento aeróbio (5 x sem, ao longo de 8 semanas), estavam protegidos do dano a lipídeos, avaliado em eritrócitos através do malondialdeído, quando comparados a ratos sedentários.

Interessante notar que em um estudo avaliando maratona foi verificado que após o exercício os níveis de TBARS no soro reduziram<sup>(11)</sup>. Conforme Alessio<sup>(30)</sup>, o fato de ser treinado faz com que o indivíduo tenha níveis mais atenuados de resposta do TBARS comparado aos não treinados.

Ao contrário dos nossos achados, Pétiobis e Déléris<sup>(13)</sup> encontraram dano a lipídios e proteínas. Os autores demonstraram que em indivíduos treinados, após 120 min de exercício com intensidade crescente em cicloergômetro (50 a 75% do  $\dot{V}O_{2\text{máx}}$ ), os fosfolipídeos da membrana dos eritrócitos sofreram ataque das espécies reativas de oxigênio (ERO), e que a carbonilação verificada pareceu estar ligada aos efeitos combinados do aumento da acidose e da desidratação celular. A técnica de espectrometria FT-IR utilizada foi apresentada como uma ferramenta capaz de caracterizar mudanças estruturais nas moléculas, em especial nos eritrócitos<sup>(13)</sup>. Além disso, níveis elevados de F<sub>2</sub>-Isoprostanos durante uma ultramaratona de 50 km oferecem fortes evidências que o dano a lipídeos tenha resultado de um estresse oxidativo (EO) aumentado em resposta ao exercício<sup>(10)</sup>. Após uma ultramaratona de 80 km os valores de F<sub>2</sub>-Isoprostanos aumentaram

significativamente, tanto no grupo placebo quanto no grupo suplementado com vitamina C, indicando que a corrida induziu ao estresse oxidativo<sup>(31)</sup>.

Mastaloudis *et al.*<sup>(32)</sup> também encontraram um aumento na lipoperoxidação medida através dos F<sub>2</sub>-Isoprostanos plasmáticos, após uma ultramaratona de 50 km. Este resultado foi observado somente no grupo não suplementado, o grupo que recebeu suplementação de vitaminas C e E foi protegido. Outro achado interessante do mesmo estudo foi que a resposta inflamatória induzida pelo exercício não foi influenciada pela suplementação de antioxidantes. Esta resposta inflamatória é importante, pois estimula a recuperação do exercício por induzir a regeneração do tecido danificado e o recrutamento da proliferação de células satélite. Isto é relevante, pois a prevenção da inflamação poderia inibir a adaptação muscular à atividade física, o chamado efeito do treinamento físico.

Em nosso estudo não foi observada alteração no dano a proteínas após a competição. Da mesma forma, Miyazaki *et al.*<sup>(33)</sup> não observaram mudança nos marcadores de oxidação protéica tanto após 12 semanas de treinamento quanto após exercício exaustivo, porém avaliando sujeitos saudáveis, não atletas. Em outro modelo de exercício, Sentürk *et al.*<sup>(34)</sup> avaliando atletas em um teste incremental máximo, observaram dano as proteínas. Deve-se destacar que os atletas em nosso estudo não necessariamente chegaram à exaustão, e provavelmente mantiveram-se no metabolismo aeróbio a maior parte da competição, o que poderia explicar a diferença entre os resultados encontrados. Ainda assim, Radák *et al.*<sup>(35)</sup> observaram após 93km de corrida um aumento nas carbonilas plasmáticas e que este aumento estava correlacionado com as carbonilas urinárias, sugerindo um marcador não invasivo de EO.

As propriedades antioxidantes não enzimáticas do ácido úrico conferem efeitos *scavenger* sobre os radicais livres *in vivo*, o que foi demonstrado no estudo de Waring *et al.*<sup>(36)</sup>, pela administração de ácido úrico, o qual temporariamente aumentou a concentração circulante do ácido úrico e reduziu o EO induzido pelo exercício em indivíduos jovens e saudáveis. Em nosso estudo, observamos um aumento das concentrações plasmáticas de ácido úrico após a competição de meio *Ironman*, de acordo com os resultados de Mastaloudis *et al.*<sup>(10)</sup> em 2001, onde os níveis de ácido úrico também aumentaram durante uma ultramaratona de 50 km. Naquele estudo, em comparação ao protocolo sedentário, os níveis de ácido úrico estiveram elevados em todos os pontos durante a prova. Mastaloudis *et al.*<sup>(32)</sup> em 2004, encontraram um aumento do ácido úrico após uma corrida de

ultramaratona, os quais se mantiveram elevados mesmo dois dias após a corrida. Esta elevação pode ser explicada por um aumento da oxidação da purina com o exercício. As necessidades energéticas aumentadas, características do exercício vigoroso, regulam várias vias metabólicas incluindo a adenilato ciclase (ou mioquinase no músculo). Esta enzima é responsável pela produção de um ATP e um AMP a partir de dois ADP. Enquanto o ATP é usado para energia, o AMP é degradado a ácido úrico, pela via xantina oxidase.

No estudo de Ginsburg *et al.*<sup>(15)</sup>, os autores observaram em triatletas que realizaram o *Ironman* do Havaí, uma proteção aos lipídeos de membrana. Dentre as possíveis explicações para esta proteção citam (a) uma maior liberação de estradiol no plasma, (b) uma indução dos antioxidantes que ocorrem naturalmente no plasma ou (c) redução dos pró-oxidantes no plasma. Sendo assim, podemos sugerir que em nosso estudo o ácido úrico, um dos antioxidantes plasmáticos, estando aumentado após o meio *Ironman* (tabela 1) poderia ser um dos responsáveis por esse efeito protetor.

Em relação ao sistema de defesa antioxidante enzimático, a atividade da enzima catalase nos eritrócitos não sofreu alteração significativa após o meio *Ironman*, o que está de acordo com o estudo de Marzatico *et al.*<sup>(37)</sup>, avaliando atletas após uma meia-maratona. Por outro lado, no estudo de Aguilo *et al.*<sup>(38)</sup>, ciclistas profissionais realizaram um exercício exaustivo com percurso em montanha de 171 km, e após o final da prova a atividade da enzima catalase mostrou-se aumentada em torno de 30%, voltando aos valores basais após 3h de recuperação. Apesar do meio *Ironman* ser um exercício de longa duração, não necessariamente foi considerado exaustivo aos atletas, assim como o percurso realizado pelos atletas era plano e talvez por isso não tenha causado alteração na atividade da CAT.

Além disso, observamos uma redução na atividade da enzima superóxido dismutase após o meio *Ironman* (tabela 1). Este resultado é diferente do encontrado por Palazzetti *et al.*<sup>(39)</sup> em triatletas submetidos a um duatlo após protocolo de supertreinamento, e Aguilo *et al.*<sup>(38)</sup>, com ciclistas profissionais após uma prova exaustiva em montanha de 171 km, onde a atividade da SOD não se modificou após a competição. Por outro lado, Oztasan *et al.*<sup>(29)</sup>, verificaram que após o exercício exaustivo agudo a atividade da enzima CuZn-SOD nos eritrócitos de ratos treinados estava aumentada.

Podemos observar que os dados da literatura são conflitantes, já que apresentam redução, aumento ou ausência de mudança nos parâmetros de EO pós-exercício agudo. A



discrepância dos resultados entre os estudos pode resultar de diferentes técnicas de medida, tipos de cobaia, esporte e treinamento, assim como o modelo de exercício agudo realizado. Além disso, as diferenças entre o resultado dos estudos podem ser atribuídas ao balanço inicial de enzimas antioxidantes, pois conforme Tauler *et al.*<sup>(40)</sup> o tipo de ERO gerada nos eritrócitos é influenciado por diversos fatores, incluindo a intensidade do exercício e o balanço das enzimas antioxidantes antes do exercício.

Sentürk *et al.*<sup>(34)</sup> avaliaram os eritrócitos de indivíduos sedentários e atletas após um protocolo exaustivo em bicicleta, tanto antes quanto após um período de dois meses de suplementação com as vitaminas A, C e E. Os autores demonstraram que uma simples sessão de exercício intenso foi capaz de aumentar os parâmetros de estresse oxidativo e induzir deterioração da função e estrutura dos eritrócitos em sedentários, o que foi prevenido por dois meses de suplementação antioxidante. Contudo esse comportamento não se repetiu nos indivíduos que eram treinados. Este estudo também mostrou que a diferença entre os eritrócitos sedentários e treinados pode ser parcialmente dependente da jovem população de eritrócitos presente nos indivíduos treinados, os quais são mais resistentes ao estresse oxidativo. Em resumo, o exercício afeta as propriedades dos eritrócitos e leva à hemólise por um mecanismo oxidativo em sedentários, mas não em treinados. O estresse oxidativo pode ser um importante fator responsável pela destruição dos eritrócitos observada após treinamento vigoroso, agudo em sedentários e/ou em início do período de treinamento. No estudo atual estes parâmetros referentes aos eritrócitos não foram mensurados, mas em estudos futuros este tipo de informação deve ser incluída para melhorar o entendimento sobre a questão do estresse oxidativo.

Podemos indicar ainda como limitação do estudo o fato da alimentação, hidratação e suplementação durante a competição não terem sido controlados. Seria interessante em uma próxima intervenção avaliar um maior número de atletas, incluindo a medida da enzima creatina quinase, marcadora de dano muscular, e acompanhar o estresse oxidativo durante o período de recuperação após a competição.

## **CONCLUSÃO**

Após a competição de meio *Ironman* foi observado um aumento nas concentrações plasmáticas de ácido úrico e uma redução na atividade da enzima superóxido dismutase. Os parâmetros de dano a lipídeos e proteínas de membrana não se

alteraram, assim como não houve mudança na atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase. Sendo assim, podemos sugerir que este grupo de atletas, após uma competição de longa duração, não sofreu estresse oxidativo, possivelmente devido à liberação de ácido úrico e outros antioxidantes no plasma.

## REFERÊNCIAS

1. Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL, Donnelly AE. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc* 1998;30:1603-7.
2. Kanter MM, Lesmes GR, Kaminsky LA, La Ham-Saeger J, Nequin ND. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. Relationship to lipid peroxidation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1988;57:60-3.
3. Heunks LM, Vina J, van Herwaarden CL, Folgering HT, Gimeno A, Dekhuijzen PN. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol* 1999;277:R1697-704.
4. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222:283-92.
5. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;107:1198-205.
6. Margaritis I, Tessier F, Prou E, Marconnet P, Marini JF. Effects of endurance training on skeletal muscle oxidative capacities with and without selenium supplementation. *J Trace Elem Med Biol* 1997;11:37-43.
7. Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M, Ji LL. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol* 1997;272:R363-9.
8. Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, et al. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 2000;50:271-7.
9. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31:987-97.
10. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 2001;31:911-22.

11. Rokitzki L, Logemann E, Sagredos AN, Murphy M, Wetzel-Roth W, Keul J. Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress. *Acta Physiol Scand* 1994;151:149-58.
12. Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty LS, Morrow JD, Ahmed A, et al. Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:1328-35.
13. Petibois C, Deleris G. Evidence that erythrocytes are highly susceptible to exercise oxidative stress: FT-IR spectrometric studies at the molecular level. *Cell Biol Int* 2005;29:709-16.
14. Niess AM, Baumann M, Roecker K, Horstmann T, Mayer F, Dickhuth HH. Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes. *J Sports Med Phys Fitness* 1998;38:111-5.
15. Ginsburg GS, O'Toole M, Rimm E, Douglas PS, Rifai N. Gender differences in exercise-induced changes in sex hormone levels and lipid peroxidation in athletes participating in the Hawaii Ironman triathlon. *Ginsburg-gender and exercise-induced lipid peroxidation. Clin Chim Acta* 2001;305:131-9.
16. Ginsburg GS, Agil A, O'Toole M, Rimm E, Douglas PS, Rifai N. Effects of a single bout of ultraendurance exercise on lipid levels and susceptibility of lipids to peroxidation in triathletes. *Jama* 1996;276:221-5.
17. McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Morrow JD, Shooter LA, Holmes S, et al. Effect of alpha-tocopherol supplementation on plasma homocysteine and oxidative stress in highly trained athletes before and after exhaustive exercise. *J Nutr Biochem* 2005;16:530-7.
18. Knez WL, Jenkins DG, Coombes JS. Oxidative stress in half and full Ironman triathletes. *Med Sci Sports Exerc* 2007;39:283-8.
19. Jackson AS, Pollock ML. Generalized equations for predicting body density of men. *Br J Nutr* 1978;40:497-504.
20. Marklund SL. Direct assay with potassium superoxide. In: R. Greenwald (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, pp.249-255. Boca Raton, FL: CRC Press; 1985.
21. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134:707-16.

22. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114-21.
23. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 1991;10:93-100.
24. Llesuy SF, Milei J, Gonzalez Flecha BS, Boveris A. Myocardial damage induced by doxorubicins: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology. *Free Radic Biol Med* 1990;8:259-64.
25. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186:421-31.
26. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994;233:357-63.
27. Waterman P. MS. Analysis of phenolic plant metabolites. London: Blackwell Scientific Pubs; 1994.
28. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
29. Oztasan N, Taysi S, Gumustekin K, Altinkaynak K, Aktas O, Timur H, et al. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol* 2004;91:622-7.
30. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993;25:218-24.
31. Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, et al. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon. *J Appl Physiol* 2002;92:1970-7.
32. Mastaloudis A, Morrow JD, Hopkins DW, Devaraj S, Traber MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1329-41.
33. Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, et al. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 2001;84:1-6.
34. Senturk UK, Gunduz F, Kuru O, Kocer G, Ozkaya YG, Yesilkaya A, et al. Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. *J Appl Physiol* 2005;99:1434-41.

35. Radak Z, Ogonovszky H, Dubecz J, Pavlik G, Sasvari M, Pucsok J, et al. Super-marathon race increases serum and urinary nitrotyrosine and carbonyl levels. *Eur J Clin Invest* 2003;33:726-30.
36. Waring WS, Convery A, Mishra V, Shenkin A, Webb DJ, Maxwell SR. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin Sci (Lond)* 2003;105:425-30.
37. Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L, Della Valle G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 1997;37:235-9.
38. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Cordova A, Pons A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 2005;84:1-7.
39. Palazzetti S, Richard MJ, Favier A, Margaritis I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol* 2003;28:588-604.
40. Tauler P, Aguilo A, Guix P, Jimenez F, Villa G, Tur JA, et al. Pre-exercise antioxidant enzyme activities determine the antioxidant enzyme erythrocyte response to exercise. *J Sports Sci* 2005;23:5-13.

### 4.3. Estudo 2: DIETA RICA EM ANTIOXIDANTES vs SUPLEMENTAÇÃO

Este foi considerado o estudo principal. Todos os atletas participantes realizaram todas as intervenções dietéticas. Cada intervenção dietética durou 14 dias.

Conforme o delineamento cruzado adotado, o estudo iniciou com 6 atletas no grupo controle e 7 atletas no grupo intervenção durante o período de 14 dias. Após esse período, houve um *washout* de um mês sem nenhum tratamento, antes dos grupos serem cruzados. O intervalo *washout* tem o objetivo de reduzir o efeito *carryover*, na expectativa que a variável de desfecho retorne ao normal antes do início da próxima intervenção. No entanto, no momento da análise estatística nos deparamos com o “efeito do tempo” ou efeito *carryover*, decorrente do período de *washout*. O efeito *carryover* é a influência residual da intervenção no desfecho após sua interrupção. Como os valores dos parâmetros mensurados ao início da segunda etapa das dietas estavam estatisticamente diferentes dos valores mensurados ao início da primeira etapa, os resultados não puderam ser agrupados, e sim tivemos de optar por apresentar os dados de somente uma parte da amostra. A tabela com o resumo do resultado dos testes estatísticos para avaliar o efeito *carryover* são apresentados no anexo X.

Os valores dos deltas das intervenções dietéticas são apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Valores dos deltas para os parâmetros de estresse oxidativo após cada intervenção dietética.

	Dieta controle	Dieta Antioxidante	Suplementação
Catalase	0,21 ± 1,70	-0,97 ± 1,61	5,26 ± 1,68
SOD	15,17 ± 2,50	13,53 ± 2,61	-7,20 ± 3,64
GPx	0,48 ± 0,17	-0,004 ± 0,18	0,42 ± 0,22
TRAP	-0,35 ± 29,85	77,19 ± 21,84	-23,00 ± 18,54
Ácido úrico	1,80 ± 2,44	-5,06 ± 1,79	-1,36 ± 2,82
Fenólicos	-9,65 ± 6,01	3,27 ± 6,37	-0,005 ± 2,79
Sulfidril	0,40 ± 0,48	1,47 ± 0,19	-0,31 ± 0,36
Carbonil	4,73 ± 0,92	-4,23 ± 0,48	10,34 ± 0,18
TBARS	-0,0003 ± 0,20	0,69 ± 0,18	-0,23 ± 0,19

Este trabalho foi submetido para publicação na revista *Clinical Nutrition* em 15/05/07 (anexo XI).

## DIETARY MANIPULATION AND ANTIOXIDANT SUPPLEMENTATION IN OXIDATIVE STRESS IN TRIATHLETES

### ABSTRACT

*Background & aims:* The consumption of fruits and vegetables provide compounds considered to be chemoprotective. Athletes represent a population potentially exposed to oxidative damage, since they have an increased oxygen consumption. An unbalanced and inadequate diet can expose the athlete to a higher risk of deficiencies of the antioxidant system. The aim of this study was to evaluate the effect of 14 days of three different dietary interventions: standard diet, antioxidant diet, and antioxidant supplementation, on various oxidative stress parameters in seven male amateur triathletes. *Methods:* We measured plasmatic lipid peroxidation, carbonyl, sulfhydryl, total antioxidant capacity, and erythrocyte activity of the anti-oxidant enzymes catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase. *Results:* We found a positive effect of the antioxidant diet compared to supplementation diet on total antioxidant capacity (56.7 %) and sulfhydryl (75.7 %), as well as a reduction of 28.7 % in carbonyl. Lipid peroxidation increased 23.8 % after the antioxidant diet, coinciding with a greater consumption of polyunsaturated fatty acids and a lower vitamin E: polyunsaturated fatty acids ratio. *Conclusion:* Results indicate that the antioxidant diet offered protection against protein damage, but the lower vitamin E: polyunsaturated fatty acids ratio favors lipid damage.

**KEYWORDS:** Diet, Supplementation, Antioxidant vitamins, Oxidative stress, Athletes.

### INTRODUCTION

Triathletes taking part in the Ironman triathlon supply a unique model to study the effects of exercise-induced oxidative stress and the effects of prolonged training on physiological processes. These athletes represent a population potentially exposed to oxidative damage due to high oxygen consumption during training. As a consequence, the idea of using antioxidant supplementation in athletes has become popular<sup>(1, 2)</sup>. The antioxidant (AO) defenses act as a coordinated system where deficiencies in one component may affect the efficiency of the others. The AO defense system depends on micronutrients such as vitamins C and E and minerals such as Cu, Zn and Mn<sup>(3)</sup>. Besides, some carotenoids exert AO activity in lipid phases by quenching oxygen or free radicals.

Several studies have assessed the efficacy of antioxidant nutrients in fighting free radicals, as well as improving the athletes' performance. However, results are still controversial<sup>(4-7)</sup>. A suitable proportion of antioxidants or combinations thereof, to counteract deleterious effects of reactive oxygen species on human body have not yet been established. Additionally, an unbalanced diet can expose athletes to a higher risk of antioxidant system deficiencies. Factors associated with a healthy lifestyle, e.g., antioxidant supplement use, regular exercise, higher vitamin C serum levels, and a diet rich in fruit and vegetables, were significantly associated with lower urinary 8-OHdG excretion<sup>(6)</sup>.

Among AO vitamins, the antioxidant function of vitamin E is critical for preventing oxidation of tissue polyunsaturated fatty acid (PUFA), and the dietary requirement for vitamin E, which depends on the diet's PUFA content, is commonly expressed as a ratio of vitamin E to PUFA. Animal experiments have shown that increasing the degree of dietary fatty acids unsaturation the peroxidizability of the lipids increases<sup>(8)</sup>.

An increased intake of fruits and vegetables is related to an increased blood level of vitamins, minerals, and other chemoprotective compounds such as flavonoids, resveratrol, carotenoids<sup>(9)</sup>. On the other hand, this higher consumption of fruits and vegetables results in greater intake of dietary fiber, phytate, oxalic acid, etc., affecting dietary bioavailability<sup>(10)</sup>, which is also dependent on food matrix, food processing and microconstituent species<sup>(11)</sup>. Therefore, the aim of this study was to observe and to compare the effect of 14 days of three distinct dietary interventions – standard diet, antioxidant diet, and antioxidant supplementation – on oxidative stress in triathletes.

## **MATERIAL AND METHODS**

Subject Characteristics: Seven healthy male athletes volunteered for the study (mean  $\pm$  SEM for age  $33.0 \pm 2.5$  yrs; height  $1.76 \pm 2.1$  m; body mass  $73.9 \pm 2.6$  kg; fat mass  $16.2 \pm 2.1$  %). Prior to the study, the subjects' health status was assessed from their medical history and exercise electrocardiogram. Each subject was used as his own control. The body fat percentage was determined from the skinfold thickness measured at seven places, as described by Pollock and Jackson, 1978. All athletes were amateurs and trained  $14.7 \pm 0.9$  h every week, divided into  $3.8 \pm 1.2$  h for swimming,  $7.0 \pm 1.4$  h cycling, and  $4.7 \pm 0.8$  h running. Maximal oxygen uptake ( $\dot{V}O_{2\max}$ ) was measured using an automatic



ergospirometric system, assessed breath by breath (CPX/d system; Medical Graphics Corporation; St Paul, MN). Treadmill and cycle-ergometer  $\dot{V}O_{2max}$  were  $57.0 \pm 1.6$  and  $57.4 \pm 2.0$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, respectively. Subjects were selected on the basis of nonsmoking status, age between 21 and 43 years, and regular exercise patterns. The subjects – users of AO supplement – were asked to discontinue its use one month prior to and during the study. According to Mastaloudis et al.,<sup>(12)</sup> one month is enough to washout the plasma vitamins. All subjects were informed of the experimental procedures and gave informed written consent in accordance with the Declaration of Helsinki. Approval was obtained from the university's ethics committee. The study was conducted during the 2005/2006 training and competition season, in preparation for the Ironman in May 2006 in Florianopolis, Brazil.

Experimental procedures: Three-day diet (3 week-days) and physical activity (7 days) records were filled out by subjects before the beginning of the study, to assess their average daily energy, macronutrients and antioxidant vitamins intake, as well energy expenditure.

*Diet and physical activity records and training schedule:* In a pre-test conducted under the direction of a qualified dietitian, the subjects were individually instructed on how to record food intakes using standard household measures (a face-to-face interview). Each subject received a foods guidebook containing photographs showing household utensils and serving sizes. After the food diary had been filled out, the dietitian examined it with the help of the subjects in order to assess the records and eliminate inconsistencies. The energy intake and dietary composition were analyzed using the NUTWIN computer program for dietary analysis (UNIFESP, 1.5 version, 2002, SP, Brazil).

Physical activities were divided in following groups: (i) personal activities (meals, personal hygiene); (ii) home activities (gardening, domestic work); (iii) activities not related to work (walking, commuting time); (iv) professional activities; (v) hours of sleep. Moreover, a 7-day schedule with swim, run and bike training was supplied by each athlete's coach. The Compendium of Physical Activities of Ainsworth et al.,<sup>(13)</sup> was used to provide the energy cost of swimming, biking and running, expressed as metabolic equivalents. The appropriate metabolic equivalents values, based on the subject's report of the type and intensity of activity, were assigned.

**Diets:** This study focuses on three dietary interventions: standard diet (S-D), antioxidant diet (AO-D) and antioxidant supplementation (AO-S). Each dietary intervention lasted 14 days, with an interval of one month between them. Before and after each intervention, blood samples were collected for oxidative stress analysis. Individualized diets were calculated from food records to provide energy according to training schedule. Macronutrients were in accordance with endurance athletes guidelines. This estimate was done for the standard and the antioxidant diets. Vitamins A, C and E were the differential between the standard and the antioxidant diets. Subjects also received: (i) a list with food equivalents for macronutrients; (ii) a list with foods to be avoided and foods to be consumed moderately during the standard diet because of their AO vitamins content; (iii) a table with foods rich in vitamins A, C and E, as well the number of servings to be consumed during the AO diet. Each subject was allowed a choice of fruits and vegetables from the list supplied to them, making it a self-selected diet. The American Dietary Reference Intakes (DRI) for micronutrients was used as reference (<http://www.nal.usda.gov>). **Standard diet:** It was calculated to supply one time the DRI for vitamin A, one time the DRI for vitamin E, and two times the DRI for vitamin C (900 µg retinol acetate, 15 mg α-tocopherol acetate, and 180 mg ascorbic acid.). Each subject received a bottle of 500 mL extra-virgin olive oil, and packs containing Brazil nuts. They were instructed to eat one Brazil nut per day and one tablespoon of olive oil as salad dressing at lunch and dinner. **Antioxidant diet:** It was calculated to supply two times the DRI for vitamin A, two times the DRI for vitamin E, and five times the DRI for vitamin C (1800 µg retinol acetate, 30 mg α-tocopherol acetate and 450 mg ascorbic acid). Each subject received a kit containing: 500 g wheat germ, 14 packs with 40g of dehydrated apricot, 14 packs with 30g of Brazil nuts, 1 bottle of 500 mL extra-virgin olive oil, 14 bottles of 450 mL of natural orange juice. Subjects were instructed to consume daily 1 pack of apricot, 1 pack of Brazil nuts, 1 bottle of orange juice, 20 to 30g of wheat germ, and 1 table spoon of olive oil as salad dressing. **Antioxidant supplementation:** In a third phase, subjects took daily a capsule of antioxidant vitamins, with one time the DRI for vitamin A and E, and three times the DRI for vitamin C, (900 µg retinol acetate, 15 mg α-tocopherol acetate, and 270 mg ascorbic acid) during 14 days. They were further instructed to follow standard diet 2 (calculated as previous described), so that the amount of vitamins taken with the standard diet plus the amount taken as supplement were the

same as to the amount in the antioxidant diet. All supplement capsules were prepared by Quiron Pharmacy (Porto Alegre, Brazil).

To improve adherence to the nutritional advice given during the study, once a week we got in touch with each subject by phone. During the phone call any doubt about the diet was elucidated. Questions were asked about food intake on the previous day, and subjects were reminded about the importance of study. The efficacy of phone call strategies in improving adherence to the study and promoting behavior changes was demonstrated by several authors.

**Blood analysis:** Venous blood samples (~10 mL) were taken from an antecubital vein into 100  $\mu$ L EDTA-10% tubes, in the early morning, at rest, after overnight fasting. Basal blood test was set to occur at a standardized time, i.e., between 06.30 and 08.00 a.m. The blood was centrifuged at 1000g, 5°C, for 5 minutes. Plasma was aspirated and collected in eppendorf tubes and immediately frozen at -70°C for further analysis of carbonyl, sulfhydryl, total antioxidant capacity (TRAP), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The remaining erythrocytes were washed and centrifuged three times with the same volume of saline solution, prepared and stored at -70°C until they were later analyzed for antioxidant enzyme activity.

No absolute and conclusive indices of oxidative stress are available. However, several parameters are proposed as oxidative stress indicators. As measure of oxidized biological compounds we used (i) lipid peroxidation to evaluate plasma aldehydes through TBARS assay; (ii) protein oxidation through plasmatic carbonyl groups; (iii) decrease in thiol groups of plasmatic proteins through sulfhydryl; (iv) total antioxidant capacity of plasma through TRAP assay. (v) activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase was also measured.

**SOD Activity:** Superoxide dismutase activity was determined by the inhibition rate of pyrogallol auto-oxidation at 420 nm. The results were expressed as U SOD.mg protein<sup>-1</sup> <sup>(14)</sup>. **CAT Activity:** Catalase activity was measured by tracking the decrease in absorption at 240 nm. The results were expressed as pmol.mg protein<sup>-1</sup> <sup>(15)</sup>. **GPx Activity:** Glutathione peroxidase activity was measured by following NADPH oxidation at 340 nm. The results were expressed as mmol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup> <sup>(16)</sup>. **TRAP** was measured in plasma using 320  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> Trolox as standard antioxidant, according to the method used by Lissi et al. <sup>(17)</sup>. The results were expressed as  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> Trolox. **TBARS** were measured in plasma as

an index of the lipid peroxidation during an acid-heating reaction, as previously described. The results were expressed as nmol.mg protein<sup>-1</sup> (18). *Sulphydryl* was determined in plasma as described by Ellman<sup>(19)</sup>. The results were expressed as thiol.mg protein<sup>-1</sup>. *Carbonyls* were measured in plasma at 360 nm. The results were expressed as nmol.mg protein<sup>-1</sup> (20). *Protein* was measured according to the Lowry method (21).

Statistical analysis: Initially, data was analyzed to test normality. Statistical evaluation of results was carried out using analysis of variance (ANOVA) with repeated measures and Bonferroni *post hoc* test for comparisons between the “delta” of dietary interventions for the dietary parameters and the oxidative stress parameters. T test was used to compare hematological parameters before and after each intervention, as well as the oxidative stress of the different dietary interventions. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 12.0) software was used. Significance was accepted at  $p < 0.05$  and all values are reported as mean  $\pm$  SEM.

## RESULTS

### Dietary Parameters:

Table 1 shows the nutritional parameters of the proposed diets and of the athletes' diets before the beginning of the study (previous diet). Previous diet values refer to the average of 3 days of food intake as recorded in the athletes' diaries.

Both AO-D and S-D adjusted macronutrients intake according to guidelines for endurance athletes. Before beginning of the study, athletes were taking  $1.12 \pm 0.23$  times the DRI for vitamin A,  $1.86 \pm 0.46$  times the DRI for vitamin C, and  $0.93 \pm 0.35$  times the DRI for vitamin E. The standard diet was calculated to provide one time the DRI of vitamin A and E, and two times the DRI of vitamin C. When analyzing Table 1 we see that the athletes almost always already ate the minimum amount of anti-oxidant vitamins as recommended in the guidelines. Furthermore, we observe a great variance in antioxidant vitamins in the athletes' previous diet, with minimum and maximum intake varied from 368 to 1,788  $\mu$ g of retinol, from 17.5 to 318 mg of ascorbic acid, and from 3.0 to 40.1 mg of  $\alpha$ -tocopherol.

**Table 1** Dietary parameters before and during nutritional intervention.

Nutrient	Previous diet	Standard diet	Antioxidant diet
Energy (kcal.d <sup>-1</sup> )	3292 ± 334	3338 ± 237	3493 ± 223
Carbohydrate (%)	53.1 ± 1.7 <sup>a</sup>	60.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	58.4 ± 1.4
Protein (%)	17.9 ± 2.3	15.7 ± 1.1	15.2 ± 1.0
Protein (g.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	1.96 ± 0.009	1.82 ± 0.006	1.86 ± 0.005
Fat (%)	29.0 ± 1.7 <sup>a</sup>	23.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	26.4 ± 1.1
Fiber (g.d <sup>-1</sup> )	23.2 ± 2.4 <sup>a,c</sup>	39.8 ± 2.8 <sup>a,b</sup>	42.5 ± 2.3 <sup>b,c</sup>
Vitamin A (µg.d <sup>-1</sup> )	1009 ± 211 <sup>c</sup>	894 ± 16 <sup>b</sup>	2132 ± 36 <sup>b,c</sup>
Vitamin C (mg.d <sup>-1</sup> )	167 ± 41.4 <sup>c</sup>	197 ± 8.7 <sup>b</sup>	483 ± 8.7 <sup>b,c</sup>
Vitamin E (mg.d <sup>-1</sup> )	14.1 ± 5.4 <sup>c</sup>	15.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	32.0 ± 0.5 <sup>b,c</sup>
Vitamin E:PUFA ratio	0.90 ± 0.20	1.12 ± 0.0089 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.0058 <sup>b</sup>

Values expressed as mean ± SEM. Equivalent letters indicate a statistically significant difference.

The antioxidant diet (AO-D) was calculated to provide two times the DRI for vitamins A and E, and five times the DRI for vitamin C. We observed a significant difference on antioxidant vitamins between the antioxidant diet and the previous and standard diets. It thus confirms that the antioxidant diet significantly increased AO-vitamins in the food of this group of athletes. Moreover, and as expected, fiber content was higher in the AO-D compared to the SD, since subjects had a greater intake of fruits and vegetables.

Vitamin E to polyunsaturated fatty acids ratio (vitamin E:PUFA ratio) during AO supplementation was 2.17 ± 0.11. We found a significant difference between S-D vs. AO-S (1.12 ± 0.0089 vs 2.17 ± 0.11, p<0.001), and AO-D vs. AO-S (0.77 ± 0.0058 vs 2.17 ± 0.11, p<0.001) in the vitamin E:PUFA ratio.

### **Hematological Parameters:**

Hematological parameters did not change in the course of the study (Table 2).

**Table 2** Hematological parameters of triathletes.

Parameters	Standard diet (S-D)		Antioxidant diet (AO-D)		Supplementation(AO-S)	
	before	after	before	after	before	after
Hb (g.dL <sup>-1</sup> )	15.4±0.23	15.4±0.20	15.4±0.37	14.9±0.20	15.0±0.18	15.3±0.31
Hematocrit (%)	45.4±0.69	45.8±0.56	45.9±1.19	44.8±0.82	44.4±0.85	45.9±0.83
MCV (fL)	89±1.4	88±1.3	89±1.6	88±1.6	87±1.2	89±1.1
MCH (pg)	30.1±0.51	29.8±0.52	29.8±0.54	29.3±0.41	29.6±0.51	29.6±0.55
MCHC (g.dL <sup>-1</sup> )	33.8±0.23	33.7±0.27	33.5±0.29	33.2±0.38	33.9±0.34	33.3±0.34
RDW (%)	13.24±0.30	12.66±0.17	12.67±0.20	13.10±0.21	13.22±0.21	13.29±0.19
Reticulocytes (%)	1.24±0.12	1.10±0.11	1.11±0.12	1.16±0.009	1.07±0.12	1.11±0.13
Ferritine(ng.mL <sup>-1</sup> )	120±18.7	133±23.5	176±23.2	140±29.9	139±34.0	142±28.7

Values expressed as mean ± SEM. MCV: Hb: Hemoglobin, MCV: Mean corpuscular volume, MCH: Mean corpuscular hemoglobin, MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration.

### **Oxidative Stress Parameters:**

Results of oxidative stress parameters are presented in Table 3.

The most important finding of the study was the positive effect of the antioxidant diet compared to supplementation, in relation to protective parameters like TRAP, sulfhydryl, as well as a decrease in protein damage evaluated by plasmatic carbonyls. However, TBARS increased during AO-D, which didn't occur during the supplementation period.

We did not observe any differences in effect of the nutritional interventions on CAT and GPx enzymes.

**Table 3** Oxidative stress parameters of triathletes.

Parameters (n=7)	Standard diet (S-D)		Antioxidant diet (AO-D)		Supplementation (AO-S)	
	before	after	before	after	before	after
CAT	31.8±1.7	32.0±1.4	27.0±0.9	26.1±1.2	31.0±1.6	36.1±1.2*
SOD	16.6±1.4	31.7±1.8*	17.3±0.9	30.9±2.6*	41.6±3.9	34.4±1.2
GPx	3.26±0.08	3.73±0.21*	3.93±0.09	3.89±0.11	4.53±0.22	4.96±0.23
SOD/(CAT+GPx)	0.49±0.01	0.90±0.01*	0.56±0.004	1.04±0.01*	1,18±0.10	0.84±0.004*
TRAP	238.6±16.1	238.2±32.5	136.1±10.7	213.3±20.9*	173.8±17.4	150.8±10.8
Sulfhydryl	4.77±1.1	2.84±0.4	1.94±0.1	3.41±0.2*	3.24±0.4	2.93±0.3
Carbonyl	10.8±0.8	15.5±0.2*	14.6±0.6	10.4±0.3*	11.0±0.1	21.3±0.2*
TBARS	1.71±0.08	1.71±0.23	2.94±0.14	3.64±0.16*	0.93±0.12	0.70±0.14

Values expressed as mean  $\pm$  SEM. CAT: Catalase ( $\text{pmol.mg prot}^{-1}$ ), SOD: Superoxide Dismutase ( $\text{U SOD.mg prot}^{-1}$ ), GPx: Glutathione Peroxidase ( $\text{mmol.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$ ), TRAP: total antioxidant capacity ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$  trolox), Sulfhydryl ( $\text{thiol.mg prot}^{-1}$ ), Carbonyl ( $\text{nmol.mg prot}^{-1}$ ), TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances ( $\text{pmol.mg prot}^{-1}$ ). \*  $p < 0.05$  before vs. after.

#### ***Standard diet (S-D):***

SOD activity increased 90.9 % after 14 days of S-D ( $p=0.001$ ) and AO-D ( $p=0.002$ ). Supplementation period did not change SOD activity. The SOD/(CAT+GPx) ratio increased 83.6 % after S-D ( $p=0.001$ ), despite GPx increases 14.4 % ( $p=0.033$ ). Carbonyl increased 43.5 % ( $p=0.002$ ), but protein damage was lower compared to supplementation (93.6 %).

TRAP, TBARS and sulfhydryl did not change although we observed a great intersubjects' variability on TRAP.

#### ***Antioxidant diet (AO-D):***

The highest protection against protein damage was observed in AO-D, as carbonyl levels decreased 28.7 % after this intervention, while sulfhydryl increased 75.7%.

TRAP increased 56.7 % ( $p=0.012$ ).

SOD activity increased 78.6 % ( $p=0.002$ ) similarly as in the S-D, but in an opposite manner to supplementation. The SOD/(CAT+GPx) ratio increased after AO-D 85.7 % ( $p=0.009$ ), since activity of CAT and GPx did not change.

TBARS levels were increased 23.8 % after AO-D ( $p=0.010$ ), which didn't occur during the other dietary interventions.

#### ***Antioxidant supplementation (AO-S):***

SOD activity did not change, differently as in the other two periods of the study. In fact, at the beginning of AO-S, SOD levels were high compared to the other intervention periods (Table 3).

The SOD (CAT+GPx) ratio decreased 28.8 % after supplementation ( $p=0.010$ ). Despite high SOD levels at the beginning of AO-S, which did not change after supplementation, CAT activity increased 17 % after intervention ( $p=0.020$ ).

It was during this period that the highest protein damage occurred (93.6 %,  $p<0.001$ ).

TRAP and TBARS did not change after 14 days of AO-S.

## **DISCUSSION**

To date, few human studies have assessed and compared the effects of dietary and antioxidant supplement interventions on oxidative stress in athletes during the training period.

We agree with Morillas-Ruiz et al.,<sup>(7)</sup> who propose that the high variance observed among individuals in oxidative stress biomarkers helps supporting the idea that in order to study the effect of antioxidants on oxidative stress the study should use the same subjects that receive the antioxidant supplementation as control group.

The AO-D diet caused a positive effect on TRAP of 56.7 %. During AO-D athletes ate more fruits and vegetables compared to AO-S, wherein vitamins were supplied in capsules. One explanation for our findings would be that other antioxidants besides vitamins A, C, and E are also responsible for the protection provided by fruits and vegetables. The contribution of vitamin C to the total antioxidant activity of a fruit was usually less than 15%. Part of the AO capacity of fruits and vegetables may derive from flavonoids. Fruits contain a group of natural AO that could have not only a high AO activity but also a good combination or mixture of AO<sup>(22)</sup>. Besides, flavonoids can act as



aryl hydrocarbon receptor antagonists and these benefits are probably due to a cocktail of nutrients in a synergistic way<sup>(9)</sup>. Dunlap et al.,<sup>(23)</sup> showed that the supplementation of sled dogs' diet with blueberries (rich in flavonoids and polyphenol) appeared to increase the amount of AO available to the animal.

Carbonyl levels, parameter of oxidative protein damage, reduced 28.7 % after 14 days of AO-D. In confirmation of this, thiol groups measured by sulfhydryl were increased 75.7 %. Sulfhydryl groups of proteins have a protective role against free radicals damage and are often essential for protein stability and/or function. Thiol susceptibility to oxidation depends on which radical was generated and on how it was generated. Diffusible species such as superoxide can be rapidly scavenged by protein thiols. Carbonyl increased 93.6 % after AO-S but sulfhydryl did not change. Thus, we can assume that the decrease of 28.8 % in the SOD/(CAT+GPx) ratio could have caused superoxide radical to accumulate more than thiols could have protected the body from oxidative damage. SOD is an enzyme capable of reducing the superoxide radical into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which is the substrate for CAT. When cells have increased levels of SOD without a proportional increase in peroxidases, cells face a peroxide overload challenge<sup>(24)</sup>.

Although protein damage was greater after AO-S, there was a reduction in lipid damage during this period, thus demonstrating that oxidative and antioxidant mechanisms act differently according to the situation. Depending on the target tissue, type of radical, and antioxidant capacity of that tissue, oxidative damage might occur or not.

It should be pointed out that the supplementation period coincided with a period of more active training than that at the beginning of the study, since athletes were followed through six months of Ironman training. Since training load for Ironman gradually increases along time, the increase in carbonyl levels at this stage might be related to a higher degree of muscle demand.

It seems that supplementation with antioxidant vitamins could be related to a reduction in SOD activity. According to Golestani et al.,<sup>(25)</sup> vitamin E exerts sophisticated and multifaceted effects on cellular processes, depending on the molecular background and accumulation of vitamin E in the cells. At early stages, vitamin E might have scavenged ROS, thus increasing the activity of SOD enzyme by eliminating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as its inhibitor. At later stages, after its concentration in the lipid structures have raised, it might have acted as a pro-oxidant, decreasing antioxidant capacity and inhibiting SOD. In our study, athletes

were instructed to consume a diet rich in antioxidant food, in large or small quantities, at different times. One month washout was observed between dietary interventions. It is possible that after six months of follow-up and orientation vitamin E might have accumulated in the cells – as proposed by Golestani et al. – leading to a reduced SOD activity trend as observed after supplementation. Lower SOD activity could generate an accumulation of superoxide radical which, reacting with nitric oxide, produces peroxynitrite. Peroxynitrite in its turn may inhibit SOD activity even more. Since the superoxide radical ion seems not to be able to migrate among tissues, in this study it may have caused protein damage.

There was an increase of 23.8 % in lipid peroxidation after AO-D. The lipid substratum is more sensitive to oxidation than the protein substratum<sup>(7)</sup>. Initially, this result seems to be the opposite of the other parameters measured during AO-D. But after analyzing the dietary parameters (Table 1), we found a probable explanation for it: (i) greater lipid contribution during AO-D compared to S-D and AO-S ( $26.7 \pm 1.1$  vs  $22.7 \pm 0.9$  and  $21.4 \pm 0.8$  %, respectively), since a higher intake of fatty foods was necessary to increase the amount of vitamin E in AO-D; (ii) in relation to the type of fatty acids offered in diets, we observed that AO-D had significantly more PUFA than S-D ( $p=0.003$ ) and AO-S ( $p=0.008$ ); and finally, (iii) there is a relation between vitamin E and PUFA. Increasing the degree of dietary fatty acid unsaturation increases the peroxidizability of the lipids, and vitamin E is the most effective chain-breaking lipid-soluble antioxidant. Vitamin E:PUFA ratio presented the lowest levels during AO-D compared to S-D and AO-S ( $0.77 \pm 0.006$  vs  $1.12 \pm 0.009$  and  $2.17 \pm 0.11$  mg  $\alpha$ -tocopherol.g<sup>-1</sup> PUFA, respectively). According to Valk et al.,<sup>(8)</sup> the widely used ratio of at least 0.6 mg  $\alpha$ -tocopherol.g<sup>-1</sup> PUFA is suggested as adequate for human adults. In athletes, this relation is probably different, since higher oxygen consumption increases the production of ROS, thus making them more susceptible to lipid peroxidation. We observed that in dietary interventions where this relation presented a higher ratio, protection against lipid peroxidation was greater.

Depending on the concentration, redox potential and inorganic chemistry of the cells, these vitamins may exert pro-oxidant effects that increase oxidative lipid damage. Two months of vitamin E supplementation did not attenuate increases in oxidative stress in triathletes competing in the Kona triathlon race event. On the contrary, athletes experienced greater lipid peroxidation<sup>(26, 27)</sup>. Because of possible pro-oxidant effects, the

effects of multiple dosages and long-term use of these vitamins deserves further investigation.

Another plausible explanation for TBARS increase during AO-D is related to hypercaloric diet interacting with exercise. Hypercaloric diets alone are related to several degenerative processes linked to oxidative stress, since the oxygen used in oxidative metabolism results in ROS production. Furthermore, exercise increases oxygen consumption, which leads to oxidative stress. Therefore, the interaction between a hypercaloric diet and exercise could be deleterious to health. To test this hypothesis, Burneiko et al.,<sup>(28)</sup> submitted mice fed with hypercaloric diet to physical training. They observed diverging effects on the oxidative stress in the serum and liver of the animals. While serum oxidative stress decreased, the interaction produced pro-oxidant effects on the liver, thus decreasing antioxidant defenses. In our study, due to their high training load, triathletes ingested a hypercaloric diet of an average 3442 kcal (ranging from 2360 to 4070 kcal, Table 1). Among the oxidative stress parameters measured, we observed an increase in plasmatic TBARS during this specific AO-D period. It is important to point out that our results refer only to blood parameters and those measures of tissue oxidative stress were not evaluated.

Due to the chemical diversity of AO compounds present in foods, complete databases on food AO content are not available. In addition, levels of single AO in food do not necessarily reflect their total AO capacity; this also depends on the synergic and redox interactions among the different molecules present in the food<sup>(29)</sup>. Some food composition data are available for flavonoids on the USDA website, but none are available in Brazil. Since 2003, the Ministry of Health in Brazil is developing the “TACO” (Brazilian Table of Food Composition) project, to provide data of a great number of nutrients in national and regional foods, but flavonoids are not included in that project. Besides, differences in vitamin content in foods can be explained by food composition that varies due to genetic and environmental variations and changes during storage and preparation. This variability should be taken into account when estimating the actual vitamin intake of an individual to be used as the basis of recommendations for improvement of vitamin status by dietary modification. The results should encourage using local food composition tables for reducing variability in vitamin content of foods from different geographical origins<sup>(30)</sup>.

Potential limitations of this study include the brief duration of pill-taking (14 days), and we did not determine the effects of other doses of vitamin A, C and E in this trial. We did not measure plasmatic concentration of antioxidant vitamins after interventions. Besides, the observed difference may be attributable to differential genetic susceptibility, environmental factors not examined in this trial, or a combination of the above.

In conclusion, we found a positive effect of antioxidant diet compared to supplementation, on TRAP and sulfhydryl, as well as a reduction of 28.7 % in carbonyl. TBARS increased 23.8 % after the antioxidant diet, coincident with the greater consumption of polyunsaturated fatty acids, and smaller vitamin E:PUFA ratio. The results indicate that the antioxidant diet offered protection against protein damage, but the smaller vitamin E:PUFA ratio favors lipid damage.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

Local industries/companies such as “UNIAGRO” and “Sucos Petry” supported this research with foods. The analysis of hematological parameters was made by Weinmann Laboratory. CS received scholarship support from CAPES (the Brazilian Research Council) and was involved in the design of the study, under the supervision of AO, JCM and ABK. JCM and ABK provided consumables and equipment for blood analysis in their labs. CS had primary responsibility for writing the manuscript, but all the other authors provided content and editorial comments on the draft. CS and GB were involved in all dietary planning and calculation. CS, RR and GB were involved in data collection and blood analysis. CS performed the statistical analysis under the supervision of AO. All authors read and approved the final manuscript. None of the authors had any conflict of interest. Special thanks to Giovani Cunha and Márcio Silveira for their help during data collection and blood analysis.

#### **REFERENCES:**

1. Ji L L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 283-92.
2. Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L, Della Valle G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic

- performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 1997; 37: 235-9.
3. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 2001; 85 Suppl 2: S67-74.
  4. Tauler P, Aguilo A, Fuentespina E, Tur J A, Pons A. Diet supplementation with vitamin E, vitamin C and beta-carotene cocktail enhances basal neutrophil antioxidant enzymes in athletes. *Pflugers Arch* 2002; 443: 791-7.
  5. Mastaloudis A, Morrow J D, Hopkins D W, Devaraj S, Traber M G. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1329-41.
  6. Huang H Y, Helzlsouer K J, Appel L J. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 647-52.
  7. Morillas-Ruiz J M, Villegas Garcia J A, Lopez F J, Vidal-Guevara M L, Zafrilla P. Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress. *Clin Nutr* 2006; 25: 444-53.
  8. Valk E E, Hornstra G. Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review. *Int J Vitam Nutr Res* 2000; 70: 31-42.
  9. Zhang S, Qin C, Safe S H. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 1877-82.
  10. Riedl J, Linseisen J, Hoffmann J, Wolfram G. Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *J Nutr* 1999; 129: 2170-6.
  11. Reboul E, Richelle M, Perrot E, Desmoulins-Malezet C, Pirisi V, Borel P. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 8749-55.
  12. Mastaloudis A, Leonard S W, Traber M G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 911-22.
  13. Ainsworth B E, Haskell W L, Whitt M C, Irwin M L, Swartz A M, Strath S J, et al. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: S498-504.

14. Marklund S L. Direct assay with potassium superoxide. In: R. Greenwald, Ed. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985: 249-255.
15. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134: 707-16.
16. Flohe L, Gunzler W A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-21.
17. Lissi E, Pascual C, Del Castillo M D. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun* 1992; 17: 299-311.
18. Draper H H, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-31.
19. Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-7.
20. Reznick A Z, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233: 357-63.
21. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
22. Wang H, Cao G, Prior R L. Total Antioxidant Capacity of Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 701-705.
23. Dunlap K L, Reynolds A J, Duffy L K. Total antioxidant power in sled dogs supplemented with blueberries and the comparison of blood parameters associated with exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2006; 143: 429-34.
24. Pinho R A, Andrades M E, Oliveira M R, Pirola A C, Zago M S, Silveira P C, et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int* 2006; 30: 848-53.
25. Golestani A, Rastegar R, Sharifabrizi A, Khaghani S, Payabvash S M, Salmasi A H, et al. Paradoxical dose- and time-dependent regulation of superoxide dismutase and antioxidant capacity by vitamin E in rat. *Clin Chim Acta* 2006; 365: 153-9.
26. Nieman D C, Henson D A, McAnulty S R, McAnulty L S, Morrow J D, Ahmed A, et al. Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36: 1328-35.
27. McAnulty S R, McAnulty L S, Nieman D C, Morrow J D, Shooter L A, Holmes S, et al. Effect of alpha-tocopherol supplementation on plasma homocysteine and oxidative

- stress in highly trained athletes before and after exhaustive exercise. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 530-7.
28. Burneiko R C, Diniz Y S, Galhardi C M, Rodrigues H G, Ebaid G M, Faine L A, et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 1167-72.
29. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr* 2003; 133: 2812-9.
30. Sundl I, Murkovic M, Bandoniene D, Winklhofer-Roob B M. Vitamin E content of foods: Comparison of results obtained from food composition tables and HPLC analysis. *Clin Nutr* 2007; 26: 145-53.

#### 4.4. Estudo 3: SUPLEMENTAÇÃO ANTIOXIDANTE

Este estudo apresenta uma amostra de 12 triatletas devido à perda amostral.

A suplementação durou oito semanas.

Este trabalho foi submetido por correio para publicação na revista *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* dia 28 de maio de 2007.

### ANTIOXIDANT VITAMIN SUPPLEMENTATION AND OXIDATIVE STRESS IN TRIATHLETES

#### ABSTRACT

*Background:* Triathletes taking part in the Ironman triathlon supply a unique model to study the effects of exercise-induced oxidative stress and the effects of prolonged training on physiological processes. These athletes represent a population potentially exposed to oxidative damage due to high oxygen consumption during training. As a consequence, the idea of using antioxidant supplementation in athletes has become popular. The aim of this study was to describe oxidative stress parameters after 8 weeks of antioxidant vitamin supplement, at nutritional doses, during Ironman training. *Methods:* Twelve male amateur triathletes (mean±SD for age 31.8±5.6 yr; body mass 74.4±6.4 kg; height 1.76±5.2 m; fat mass 15.0±5.5 %; treadmill  $\dot{V}O_{2max}$  57.9±6.8 ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; cycle-ergometer  $\dot{V}O_{2max}$  59.2±6.4 ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) participated in this descriptive study. All athletes trained 15.5±3.4 h.week<sup>-1</sup>, and took 900 µg retinol acetate, 15 mg α-tocopherol acetate, and 270 mg ascorbic acid capsules for 8 weeks. Blood samples, taken before and after 8 weeks, were analyzed for antioxidant enzyme activity, total antioxidant capacity, uric acid, sulfhydryl, carbonyl, and lipid peroxidation. *Results:* Activity of erythrocyte antioxidant enzyme decreased after 8 weeks of supplementation period (p<0.05); so did plasmatic carbonyls (p=0.001). We did not find significant differences in total antioxidant capacity, lipid peroxidation, uric acid, sulfhydryl, and creatine quinase during the period of the study. *Conclusion:* The effects of the antioxidant mixture were observed for doses that can be provided by a diversified and balanced diet. Whatever the mechanisms involved, the antioxidant mixture and/or training helped to preserve the endogenous antioxidant system after these 8 weeks.

*Key Words:* free radicals, vitamin A, vitamin C, vitamin E, exercise.



## INTRODUCTION

Triathlon Ironman consists of three sequential and continuous aerobic modalities, and involves swimming 3.8 Km, cycling 180 Km, and running 42.195 Km. Triathletes training for Ironman spend around 18,000 kcal per week. Physical training can reduce erythrocyte susceptibility to oxidative stress<sup>1</sup>, and increase antioxidant defenses<sup>2,3</sup>. The improvement in the enzymatic defense system that occurs with training was not enough to suppress oxidative stress induced by exercise, suggesting the need for using antioxidant (AO) supplementation in athletes<sup>4</sup>. Supplementation is especially important during periods of intense training and/or competition. In this case, a normal diet is not always enough<sup>5</sup>. Moreover, some athletes adopt unbalanced dietary regimens, which can cause poor nutritional status. Studies on animals suggest protection with supplementation, but it is not clear if antioxidant supplementation can provide the same protection in humans<sup>6</sup>. A lot of antioxidants have been studied, either individually or combined<sup>7</sup>. Positive results using vitamin C or E were found<sup>8</sup>. However, since the antioxidant effect of vitamin C is enhanced in the presence of vitamin E<sup>9</sup>, the combination of antioxidants may have a greater effect on quenching radical oxygen species. Earlier studies on the protective effects of vitamin supplementation, though, have been inconclusive: decreased oxidative stress<sup>10-12</sup>, no effect on lipid peroxidation<sup>13-15</sup>, and even increased lipid peroxidation<sup>16</sup> and DNA damage<sup>17</sup>. The popularity of antioxidant supplements in physically active people makes this an important area for research. Most of the studies uses high doses of supplementation, impossible of be reached through the feeding. There are few studies on the effect of oxidative stress on ultraendurance athletes. Most of the studies evaluate oxidative damage or protection parameters in acute exercise models. This study aims to describe oxidative stress parameters after 8 weeks of antioxidant vitamin supplement (ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, retinol acetate), at nutritional doses, during the training period for the Ironman competition.

## MATERIALS AND METHODS

### Subject Characteristics

Twelve healthy male athletes volunteered for this descriptive study (mean  $\pm$  SD for age  $31.8 \pm 5.6$  yr; height  $1.76 \pm 5.2$  m; body mass  $74.4 \pm 6.4$  kg; fat mass  $15.0 \pm 5.5$  %). The sampling was intentional, being recruited the athletes that were in training to participate in Ironman Brazil 2006. Each subject was used as his own control. The body fat percentage was determined from the skinfold thickness measured at seven places, as described by Jackson and Pollock<sup>18</sup>. All of them were amateurs and trained  $15.5 \pm 3.4$  h each week, divided into  $3.8 \pm 1.2$  h for swimming,  $7.0 \pm 1.4$  h cycling, and  $4.7 \pm 0.8$  h running. Treadmill and cycle-ergometer  $\dot{V}O_{2\max}$  were  $57.9 \pm 6.8$ , and  $59.2 \pm 6.4$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, respectively. Maximal oxygen uptake was measured using an automatic spirometric system, assessed breath by breath (CPX/d system; Medical Graphics Corporation; St Paul, MN). Subjects were selected on the basis of nonsmoking status, age between 21 and 43 years, and maintenance of regular exercise patterns. The subjects, who were antioxidant supplement users, were asked to discontinue the supplement for 1 month prior to the study. According to Mastaloudis *et al.*<sup>19</sup>, one month is sufficient to wash out the plasma vitamins. They were instructed to refrain from making any drastic changes in their diet during the study. All subjects were informed of the experimental procedures and gave informed written consent in accordance with the Helsinki declaration. Approval was obtained from the university's ethics committee. All subjects reported to the laboratory twice in the morning for blood collection, in rest and while fasting. The study was developed during the training and competition season in 2005/2006.

### Intervention

**Diet:** to standardize feeding, subjects were instructed to consume a prescribed diet in the beginning of the study. Diets were computed using the NUT program (São Paulo, Brazil). Average daily intake was  $3210 \pm 766$  kcal, of which  $62.6 \pm 2.5$  % was carbohydrate,  $16.4 \pm 3.0$  % protein,  $21.1 \pm 1.8$  % fat,  $44.8 \pm 6.6$  g fiber,  $886.3 \pm 47.6$   $\mu$ g retinol,  $15.5 \pm 0.7$  mg dl- $\alpha$ -tocopherol, and  $205 \pm 21$  mg vitamin C.

**Supplement:** venous blood samples were obtained at the onset of the study (BASE) before any supplement was ingested. A supplement in the form of a capsule, consisting of

antioxidant vitamins (270 mg ascorbic acid, 900 µg retinol acetate, and 15 mg dl- $\alpha$ -tocopherol acetate) was taken daily for the duration of the study (8 weeks). After 8 weeks on BASE, further blood samples were taken. These doses were chosen, because they can be consumed through the feeding. All supplements were encapsulated by Quiron Pharmacy (Porto Alegre, Brazil). Subjects were instructed to take a capsule a day.

### **Blood Analysis**

Venous blood samples (~10 mL) were taken from an antecubital vein into 100 µL EDTA-10% tubes, in the early morning after fasting overnight. All samples were taken between 06.30 and 08.00. A part was used to determine hematological parameters such as erythrocyte number, hemoglobin concentration, hematocrit and reticulocyte. These were determined in an automatic flow cytometer analyzer (Sysmex SE9500, Sysmex SE9500-RAM). Ferritin was determined by chemoluminescence (Vitros ECI, Ortho Clinical Diagnostics). The remaining blood was centrifuged at 1000g for 5 minutes. Plasma was aspirated and collected in *eppendorf* tubes and immediately frozen at -70 C for further analysis of carbonyl, sulfhydryl, creatine kinase (CK), total antioxidant capacity (TRAP), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and uric acid. The remaining erythrocytes were washed and centrifuged three times with the same volume of saline solution, prepared and frozen at -70 C till they were analyzed later for antioxidant enzyme activity. All samples (BASE and 8 weeks) were analyzed together. Each parameter was analyzed in different days. Blood levels of antioxidant vitamins were not measured in detriment to the measurement of total antioxidant capacity (TRAP).

**SOD Activity:** Superoxide dismutase activity was determined by the inhibition rate of pyrogallol auto-oxidation at 420 nm. This activity was determined from a standard curve of commercially available SOD (percentage inhibition of pyrogallol auto-oxidation). The reaction medium consisted of 50 mmol.L<sup>-1</sup> tris buffer (pH 9.2), 24 mmol.L<sup>-1</sup> pyrogallol, and 30 µmol.L<sup>-1</sup> catalase. The results were expressed as U SOD.mg protein<sup>-1</sup> <sup>20</sup>. **CAT Activity:** Catalase activity was measured by tracking the fall in absorption at 240 nm. The reaction medium consisted of 50 mmol.L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.4) and 0.3 mol.L<sup>-1</sup> hydrogen peroxide. The results were expressed as pmol.L<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup> <sup>21</sup>. **GPx Activity:** Glutathione peroxidase activity was measured by following NADPH oxidation at 340 nm. The reaction medium consisted of 143 mmol.L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.5), 1 mmol.L<sup>-1</sup>

sodium azide, 0.5 mmol.L<sup>-1</sup> tert butyl hydroperoxide, 0.25 U.mL<sup>-1</sup> glutathione reductase, 0.24 mmol.L<sup>-1</sup> NADPH, and 5 mmol.L<sup>-1</sup> reduced glutathione. The results were expressed as mmol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup> <sup>22</sup>. **TRAP**: Total antioxidant capacity was measured in plasma using 320 µmol.L<sup>-1</sup> trolox as standard antioxidant, according to the method used by Lissi *et al.* <sup>23</sup>. The reaction medium consisted of 20 mmol.L<sup>-1</sup> AZO, 50 mmol.L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.4), and 5.6 mmol.L<sup>-1</sup> luminol. The results were expressed as µmol.L<sup>-1</sup> trolox. **TBARS**: It was measured in plasma. The results were expressed as nmol.mg protein<sup>-1</sup> <sup>24</sup>. **Uric Acid**: It was measured in plasma by Uricostat enzymatic AA Kit (Wiener Laboratories – Argentina). The results were expressed as mg.L<sup>-1</sup>. **CK**: It was measured in plasma by commercial kit (CK-NAC Liquiform, Labtest – Brazil). The results were expressed as U.L<sup>-1</sup>. **Sulphydryl**: It was determined in plasma as described by Ellman <sup>25</sup>. The results were expressed as thiol.mg protein<sup>-1</sup>. **Carbonyls**: It was measured in plasma at 360 nm. The results were expressed as nmol.mg protein<sup>-1</sup> <sup>26</sup>. **Protein**: was measured according to the Lowry method <sup>27</sup>.

### Statistical Analysis

Initially data was analyzed using Shapiro-Wilk tests. Statistical evaluation of results was carried out using t-test parametric statistics. In cases where normal distribution was not found, the corresponding non-parametric test was used (Wilcoxon test). The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 10.0) software was used. Significance was accepted at level p<0.05 and all values are reported as means ± standard deviation (SD).

## RESULTS

Table I shows the indices of oxidative stress before and after the period of antioxidant vitamin supplementation in Brazilian amateur triathletes: basal (BASE) in the beginning (November 23<sup>rd</sup>), and after 8 weeks of supplementation (January 18<sup>th</sup>).

Table I. Oxidative stress parameters before and after supplementation (mean  $\pm$  SD).

Parameters	BASE	8 weeks
Catalase (pmol.mg prot <sup>-1</sup> ) <sup>#</sup>	31.44 $\pm$ 3.58	27.04 $\pm$ 4.18*
SOD (U SOD.mg prot <sup>-1</sup> )	42.45 $\pm$ 8.55	27.48 $\pm$ 3.68*
GPx (mmol.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> ) <sup>#</sup>	4.52 $\pm$ 0.54	3.41 $\pm$ 1.20*
TBARS (pmol.mg prot <sup>-1</sup> ) <sup>#</sup>	0.86 $\pm$ 0.27	0.84 $\pm$ 0.41
TRAP ( $\mu$ mol.L <sup>-1</sup> trolox)	168.68 $\pm$ 39.28	216.40 $\pm$ 93.28
Carbonyls (nmol.mg prot <sup>-1</sup> )	11.06 $\pm$ 0.36	8.23 $\pm$ 2.32*
Uric acid (mg.L <sup>-1</sup> )	47.73 $\pm$ 7.80	49.90 $\pm$ 10.87
Sulfhydryl (thiol.mg prot <sup>-1</sup> )	3.33 $\pm$ 0.99	2.82 $\pm$ 1.13

*Note.* TRAP: Plasma total antioxidant capacity; SOD: erythrocyte superoxide dismutase activity; GPx: erythrocyte glutathione peroxidase activity; TBARS: plasma thiobarbituric acid reactive substances. <sup>#</sup> Non-parametric tests for Catalase, GPx, and TBARS. \* p<0.05 Between BASE and 8 weeks.

Dependent t-test revealed a significant decrease in all erythrocyte antioxidant enzyme activities between BASE and 8 weeks. Catalase decreased by 14.0% (p=0.018, figure 1), glutathione peroxidase decreased by 24.6% (p=0.013, figure 2), and superoxide dismutase decreased by 35.3% (p<0.001, figure 3).

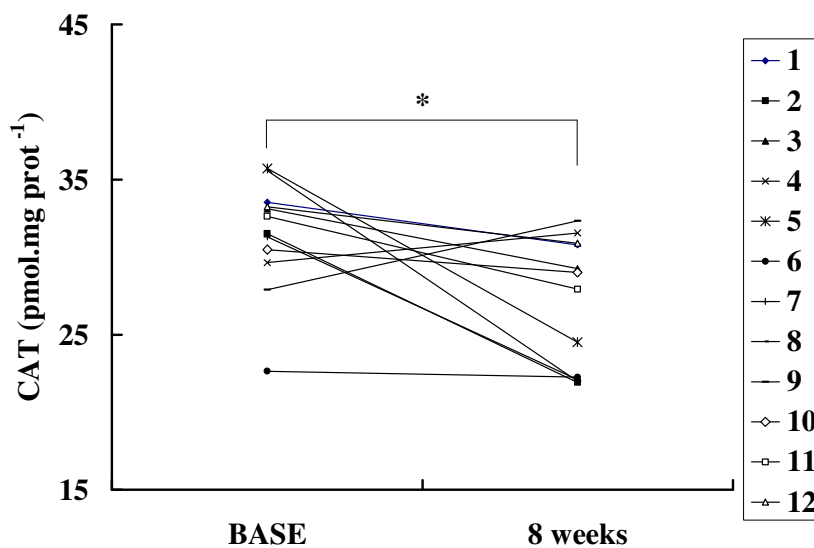


Fig. 1. –Individual catalase activity before and after 8 weeks of supplement (\* p&lt;0.05)

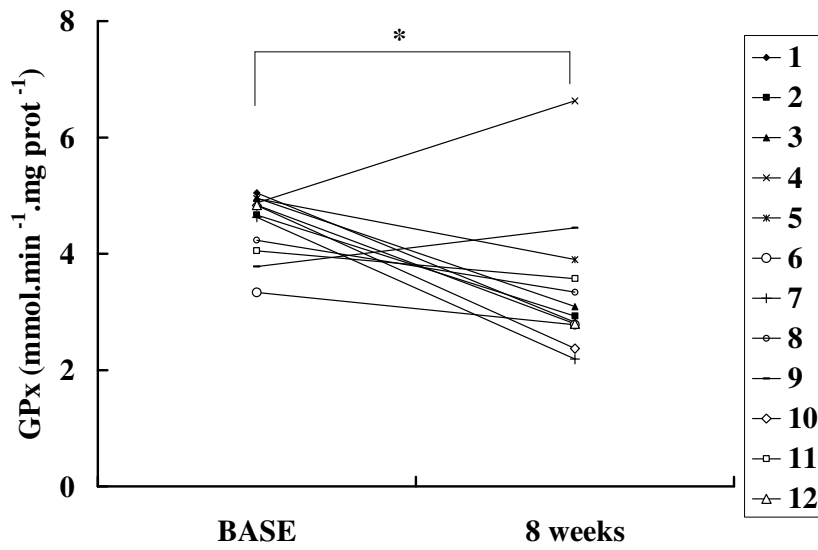


Fig. 2. – Individual glutathione peroxidase activity before and after 8 weeks of supplement (\* p<0.05).

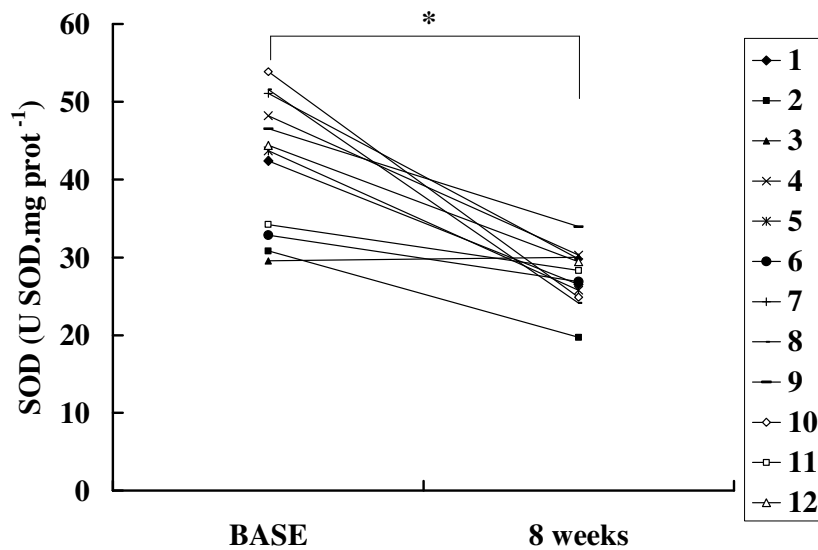


Fig. 3. – Individual superoxide dismutase activity before and after 8 weeks of supplement (\* p<0.05).

Moreover, there was a significant decrease of 25.6 % in plasma carbonyls between BASE and 8 weeks (p=0.001, figure 4).

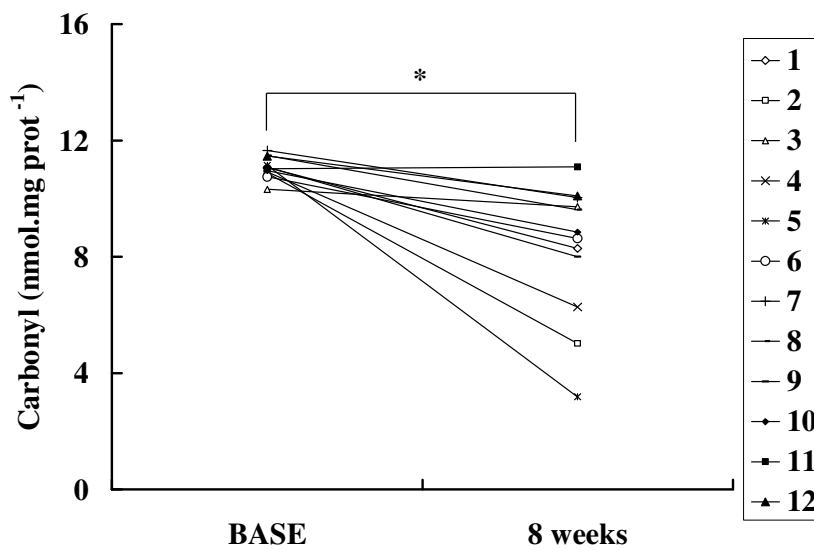


Fig. 4. – Individual protein damage before and after 8 weeks of supplement (\* p<0.05).

There was no significant difference in TRAP, TBARS, uric acid, and sulfhydryl. However, we found a larger intersubject variability in TRAP (figure 5) after 8 weeks of supplementation (103.1-402.3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  trolox), in comparison to BASE (113.5-240.2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  trolox).

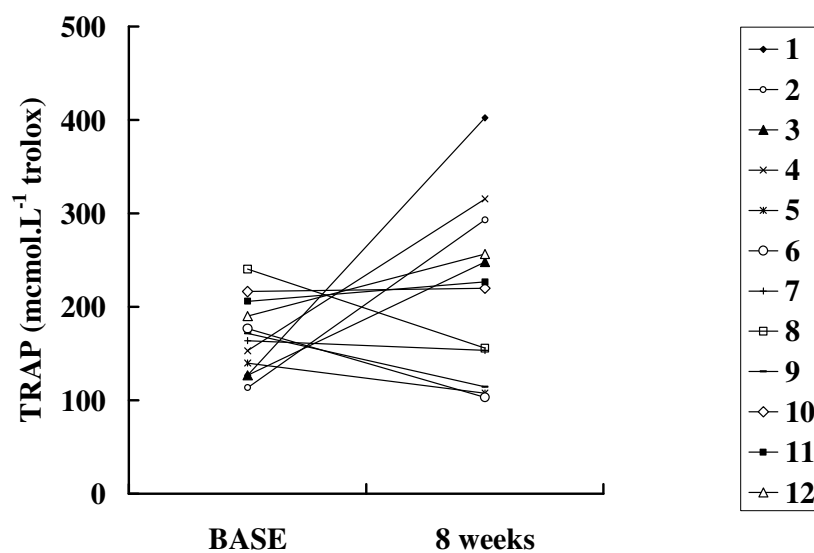


Fig. 5. – Individual total antioxidant capacity before and after 8 weeks of supplement.

Creatine kinase levels didn't change after 8 weeks of training and supplementation ( $1016 \pm 742$  vs.  $1192 \pm 564$  U.L<sup>-1</sup>, BASAL vs. 8 weeks;  $p=0.321$ ).

Table II shows the basal hematological parameters in the twelve amateur triathletes. There was a decrease in erythrocyte and an increase in MCV and MCH at the end of eight weeks of endurance training. Compared to Tauler *et al.*<sup>28</sup>, hematological parameters were similar.

Table II. Hematological parameters before and after supplementation in triathletes.

Parameters n=12	Reference values	BASE (mean $\pm$ SD)	8 weeks (mean $\pm$ SD)
Erythrocytes ( $10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	4.5 – 6.1	5.06 $\pm$ 0.23	4.87 $\pm$ 0.30*
Hemoglobin (g.dL <sup>-1</sup> )	13.3 - 16.7	15.14 $\pm$ 0.49	14.79 $\pm$ 0.70
Hematocrit (%)	39.0 - 50.0	44.86 $\pm$ 1.92	43.79 $\pm$ 1.89
MCV (fL)	82.0 - 98.0	88.74 $\pm$ 4.30	90.03 $\pm$ 3.79*
MCH (pg)	27.3 - 32.6	29.90 $\pm$ 1.24	30.36 $\pm$ 1.27*
MCHC (g.dL <sup>-1</sup> )	31.6 - 34.9	33.72 $\pm$ 0.88	33.74 $\pm$ 0.72
RDW (%)	11.6 - 13.9	13.26 $\pm$ 0.58	13.20 $\pm$ 0.62
Ferritin (ng.mL <sup>-1</sup> )	30 - 300	142.27 $\pm$ 87.36	115.36 $\pm$ 72.11
Reticulocyte (%)	1.00- 2.00	1.04 $\pm$ 0.26	1.18 $\pm$ 0.31

*Note.* MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean cell hemoglobin concentration ; RDW: red cell distribution width. \* Between BASE and 8 weeks ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

The amount of vitamins used in the supplements of this study is in accordance with requirements for American dietary reference intakes (<http://nal.usda.gov>). Each capsule contains the equivalent amount to three times the RDA for vitamin C, and one time the RDA for vitamin C and E.



Data presented in our study shows that 8 weeks of training and antioxidant vitamin supplementation is associated with reduced antioxidant enzyme activity. As in our study, Palazzetti *et al.*<sup>29</sup> also used an antioxidant mixture in low doses. Their results showed that even at a lower dose of supplementation and at higher training level, antioxidants provided a protective effect against exercise-induced muscle damage in triathletes. Similarly, during two-week tapering training, triathletes supplemented with antioxidant vitamins had a significant decrease in SOD activity, and no changes in GPx activity at rest<sup>30</sup>. It is not clear how exogenous antioxidants affect the efficiency of the endogenous antioxidant system. The antioxidant enzyme activity can be modified differently: first, increase (adaptation) or decrease if oxidative stress is important or lengthy (utilization)<sup>5</sup>. The factors that influenced the results could be related to: (a) supplementation caused a down-regulation in antioxidant enzymatic activity; (b) there was an adaptation to oxidative stress due to the training.

The major effects of antioxidant supplementation can be accounted for by the fact that antioxidant synergic action can be evidenced when oxidative stress is increased. We did not find any increase in the oxidative stress through the parameters measured. It is important to point out that our protocol was accomplished in rest and without control group, not including evaluation of the effect of supplementation after an exercise session. In literature, we found two studies evaluating the acute effect of exercise after 6 weeks of antioxidant supplementation with 1 g vitamin C and 300 UI  $\alpha$ -tocopherol in an ultramarathon of 50 km. In the 1<sup>st</sup> study, a group of female runners showed a smaller oxidative damage to DNA in comparison with the placebo group<sup>13</sup> whereas in the 2<sup>nd</sup> study, the supplementation totally inhibited lipid peroxidation induced by exercise in men and women. The authors pointed out that men and women responded differently to supplementation during the period, and men possibly benefited less from the antioxidants<sup>10, 13</sup>. We could not study female triathletes because the number of athletes in training for Ironman in our population was very low.

Alessio *et al.*<sup>31</sup> propose that unless nutrition is severely compromised, oxidative stress under resting conditions would be expected to be minimal and would not be discernible in the same healthy subjects before and after 2 weeks of vitamin C supplementation. If stress is used to induce an antioxidant response, like exercise, then the

pro-oxidant stimulus needs to be intense and continued for a prolonged period of time to show different response patterns to oxidative stress.

No significant differences were detected in lipid peroxidation (plasma TBARS concentrations) after 8 weeks of training and daily supplementation, a finding which is consistent with previous studies<sup>13, 29</sup>. In contrast to this, Schröder *et al.*<sup>11</sup> demonstrate a significant decrease in lipid peroxide levels in professional basketball players after 32 days of administration of an antioxidant supplement (vitamins A, C, and E) during a regular competition season. Miyazaki *et al.*<sup>32</sup> showed that 12-weeks of endurance training decreased the amount of exercise-induced lipid peroxidation. Besides, in Tauler *et al.*<sup>28</sup>, after a period of three months of supplementation with an antioxidant cocktail (500 mg of vitamin E, 30 mg of beta carotene and 1g of vitamin C a day), the group of supplemented athletes presented a smaller index of oxidative stress, SOD and CAT enzyme activity, compared to athletes in the placebo group. It should be considered if in the beginning of the study, lipid damage parameters were high; otherwise we don't have to expect reduction.

Increased  $\text{OH}^\bullet$  formation can enhance protein tyrosine and phenylalanine oxidation<sup>33</sup>. In the present study, the levels of oxidative protein reduced after 8 weeks of training and supplementation ( $p=0.001$ ). Miyazaki *et al.*<sup>32</sup> found that 12-week endurance training, without supplementation, unaffected the levels of oxidative protein.

Palazzetti *et al.*<sup>34</sup> suggest that triathletes undertaking an overtraining protocol have their total antioxidant capacity reduced, that is, non-enzymatic antioxidants are strongly consumed during the training period. On the other hand, athletes in this study were not subjected to overtraining, as evidenced by creatine kinase, a marker of muscular damage, which did not change during the study. Our data did not show statistical differences in TRAP. However, we observed after 8 weeks of supplementation, a larger intersubject variability in comparison to initial periods of supplementation (figure 5). The TRAP gave an overall value corresponding to the sum of all AO. However, interpretation of the changes in AO capacity is difficult because it can increase as a result of nutritional effects or because of an adaptation to oxidative stress. Furthermore, some AO concentrations can be modified without any evolution of the TRAP<sup>5</sup>.

In this study, no correlation was found between creatine kinase, a marker of muscular damage, and oxidative stress parameters at the beginning or at the end of antioxidant supplementation.

Hematological parameters had the purpose of verifying any possible anemia or pseudoanemia in these athletes. The most common finding in athletes is dilutional pseudoanemia that is caused by plasma volume expansion rather than actual blood loss <sup>35</sup>. Athletes tend to have lower hemoglobin concentrations than their sedentary counterparts. Sports anemia is a false anemia and a beneficial adaptation to aerobic exercise, caused by expanded plasma volume that dilutes red blood cells <sup>36</sup>. We found a significant decrease in erythrocytes and an increase in MCV and MCH, despite not finding pseudoanemia in athletes, since erythrogram values, especially hemoglobin, were within the reference range.

## **CONCLUSION**

We found a decrease in carbonyls and erythrocyte enzyme activities of catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase after 8 weeks of training and supplementation. In contrast to, TRAP, TBARS, uric acid, sulfhydryl, and CK didn't change. In this study, the antioxidant mixture was supplied in doses that can be provided by a diversified and balanced diet. Whatever the mechanisms involved, the antioxidant mixture and/or training helped to preserve the endogenous antioxidant system after these 8 weeks.

## **REFERENCES:**

1. Petibois C, Deleris G. Erythrocyte adaptation to oxidative stress in endurance training. *Arch Med Res* 2005;36(5):524-31.
2. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31(7):987-97.
3. Schneider CD, Barp J, Ribeiro JL, Bello-Klein A, Oliveira AR. Oxidative stress after three different intensities of running. *Can J Appl Physiol* 2005;30(6):723-34.
4. Ashton T, Rowlands CC, Jones E, Young IS, Jackson SK, Davies B, et al. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1998;77(6):498-502.
5. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 2006;36(4):327-58.

6. Powers SK, Lennon SL, Quindry J, Mehta JL. Exercise and cardioprotection. *Curr Opin Cardiol* 2002;17(5):495-502.
7. Goldfarb AH. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol* 1999;24(3):249-66.
8. Huang HY, Appel LJ, Croft KD, Miller ER, 3rd, Mori TA, Puddey IB. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2002;76(3):549-55.
9. Rinne T, Mutschler E, Wimmer-Greinecker G, Moritz A, Olbrich HG. Vitamins C and E protect isolated cardiomyocytes against oxidative damage. *Int J Cardiol* 2000;75(2-3):275-81.
10. Mastaloudis A, Yu TW, O'Donnell RP, Frei B, Dashwood RH, Traber MG. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med* 2004;36(8):966-75.
11. Schroder H, Navarro E, Tramullas A, Mora J, Galiano D. Nutrition antioxidant status and oxidative stress in professional basketball players: effects of a three compound antioxidative supplement. *Int J Sports Med* 2000;21(2):146-50.
12. Rokitzki L, Logemann E, Huber G, Keck E, Keul J. alpha-Tocopherol supplementation in racing cyclists during extreme endurance training. *Int J Sport Nutr* 1994;4(3):253-64.
13. Mastaloudis A, Morrow JD, Hopkins DW, Devaraj S, Traber MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med* 2004;36(10):1329-41.
14. Kanter MM, Nolte LA, Holloszy JO. Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J Appl Physiol* 1993;74(2):965-9.
15. Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, et al. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon. *J Appl Physiol* 2002;92(5):1970-7.
16. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med* 2001;31(6):745-53.

17. Davison GW, Hughes CM, Bell RA. Exercise and mononuclear cell DNA damage: the effects of antioxidant supplementation. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2005;15(5):480-92.
18. Jackson AS, Pollock ML. Generalized equations for predicting body density of men. *Br J Nutr* 1978;40(3):497-504.
19. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 2001;31(7):911-22.
20. Marklund SL. Direct assay withpotassium superoxide. In: R. Greenwald (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, pp.249-255. Boca Raton, FL: CRC Press; 1985.
21. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134(3):707-16.
22. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114-21.
23. Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun* 1992;17(5):299-311.
24. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186:421-31.
25. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82(1):70-7.
26. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994;233:357-63.
27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
28. Tauler P, Aguilo A, Guix P, Jimenez F, Villa G, Tur JA, et al. Pre-exercise antioxidant enzyme activities determine the antioxidant enzyme erythrocyte response to exercise. *J Sports Sci* 2005;23(1):5-13.
29. Palazzetti S, Rousseau AS, Richard MJ, Favier A, Margaritis I. Antioxidant supplementation preserves antioxidant response in physical training and low antioxidant intake. *Br J Nutr* 2004;91(1):91-100.
30. Margaritis I, Palazzetti S, Rousseau AS, Richard MJ, Favier A. Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *J Am Coll Nutr* 2003;22(2):147-56.

31. Alessio HM, Goldfarb AH, Cao G. Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. *Int J Sport Nutr* 1997;7(1):1-9.
32. Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, et al. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 2001;84(1-2):1-6.
33. Leeuwenburgh C, Hansen PA, Holloszy JO, Heinecke JW. Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radic Biol Med* 1999;27(1-2):186-92.
34. Palazzetti S, Richard MJ, Favier A, Margaritis I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol* 2003;28(4):588-604.
35. Shaskey DJ, Green GA. Sports haematology. *Sports Med* 2000;29(1):27-38.
36. Eichner ER. Sports anemia, iron supplements, and blood doping. *Med Sci Sports Exerc* 1992;24(9 Suppl):S315-8.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Após a realização do estudo, pudemos observar que os marcadores de estresse oxidativo reagiram de forma diferente conforme o parâmetro de dano medido e a intervenção nutricional realizada. Nossos achados permitem aceitar parcialmente a primeira hipótese desse estudo, visto que o dano a proteínas foi menor após a dieta rica em antioxidantes, e que o dano a lipídeos foi menor após a suplementação. Entretanto, os resultados mostram que após a suplementação antioxidante, houve um aumento de dano a proteínas, e após a dieta rica em antioxidantes houve aumento do dano a lipídeos.

A análise dos dados permitiu verificar que os níveis do sulfidril, a atividade da enzima superóxido dismutase e a capacidade antioxidante total estavam aumentados após a dieta antioxidante, aceitando parcialmente a segunda hipótese do estudo, já que o mesmo não ocorreu após o período da suplementação antioxidante.

A terceira hipótese do estudo foi refutada, visto que não encontramos mudança nos níveis da enzima creatina quinase total com o incremento do volume de treino. Da mesma forma, a análise dos nossos dados não demonstrou correlação entre esta enzima e os parâmetros de estresse oxidativo.

## **6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

Podemos apontar como limitações do estudo os seguintes aspectos:

- A ausência de grupo placebo.
- Não ter medido a concentração plasmática das vitaminas antioxidantes.
- Não ter controlado a evolução individual do treinamento dos atletas durante o período do estudo.
- Variabilidade no nível de treinamento da amostra.
- Tamanho da amostra.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AINSWORTH, B. E.; HASKELL, W. L.; LEON, A. S.; JACOBS JR, D. R.; MONTOYE, H. J.; SALLIS, J. F.; PAFFENBARGER JR, R. S. Compendium of physical activities: classification of energy costs of human physical activities. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.25, n.1, p71-80, 1993.
2. AMAYA-FARFAN, J.; DOMENE, S. M. A.; PADOVANI, R. M. DRI: Síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. *Rev. Nutr.*, v.14, n.1, p.71-78, 2001.
3. ASHTON, T.; ROWLANDS, C. C.; JONES, E.; YOUNG, I. S.; JACKSON, S. K.; DAVIES, B.; PETERS, J. R. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v.77, p.498-502, 1998.
4. BALAKRISHNAN, S. D.; ANURADHA, C. V. Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. *Cell. Biochem. Funct.*, v.16, p.269-275, 1998.
5. BOVERIS, A.; CHANCE, B. The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide: General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*, v.134, p.707-716, 1973.
6. BRAAKHUIS, A. J.; MEREDITH, K.; COX, G. R.; HOPKINS, W. G.; BURKE, L. M. Variability in estimation of self-reported dietary intake data from elite athletes resulting from coding by different sports dietitians. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, v.13, n.2, p. 152-165, 2003.
7. CHILD, R. B.; WILKINSON, D. M.; FALLOWFIELD J. L.; DONNELLY, A. E. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.30, n.11, p.1603-1607, 1998.
8. CUPARI, L. Guia de Nutrição: nutrição clínica no adulto. São Paulo: Manole, 2002.
9. DAVIES, K. J. A.; QUINTANILHA, A. T.; BROOKS, G. A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Bioch. Bioph. Res. Com.*, v.107, n.4, p.1198-1205, 1982.
10. DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology.*, v.186, p.421-431, 1990.

11. ELLMAN G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.*, v.82, n.1, p.70-77, 1959.
12. FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assay of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymology*, v.105, p.114-121, 1984.
13. FOOD AND NUTRITION BOARD, INSTITUTE OF MEDICINE, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorous, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997. Disponível em: <<http://www.nap.edu>> acesso em 09 jun 2005.
14. \_\_\_\_\_. DIETARY Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline, 1998. Disponível em: <<http://www.nap.edu>> acesso em 09 jun 2005.
15. \_\_\_\_\_. DIETARY Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids, 2000. Disponível em: <<http://www.nap.edu>> acesso em 09 jun 2005.
16. \_\_\_\_\_. DIETARY Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nyckel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2001. Disponível em: <<http://www.nap.edu>> acesso em 09 jun 2005.
17. \_\_\_\_\_. DIETARY Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids, 2002. Disponível em: <<http://www.nap.edu>> acesso em 09 jun 2005.
18. GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydrogen initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Rad. Biol. Med.*, v.10, p.93-100, 1991.
19. GONZÁLEZ-GROSS, M.; GUTIÉRREZ, A.; MESA, J. L.; RUIZ-RUIZ J.; CASTILLO M. J. La nutrición en la práctica deportiva: Adaptación de la pirámide nutricional a las características de la dieta del deportista. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.51, n.4, p.321-31, 2001.
20. HEUNKS, L. M. A.; VIÑA, J.; VAN HERWAARDEN, C. L. A.; FOLGERING, H. T. M.; GIMENO, A.; DEKHUIJZEN, P. N. R. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Physiol.*, v.277 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 46), p.R1697-R1704, 1999.

21. JACKSON, A. S.; POLLOCK, M. L. Generalized equations for predicting body density of men. *Brit. J. of Nutr.*, v.40, p.497-504, 1978.
22. JENKINS, R.R. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.72, p.670S-674S, 2000. Suppl.
23. JI, L. L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.222, p. 283-292, 1999.
24. KANTER, M. M.; LESMES, G. R.; NEGUIN, N. D.; KAMINSKY, L. A.; SAEGER, J. M. Serum lipids levels and lipid peroxidation in ultramarathon runners. *Annu. Sports Med.*, v.3, p.39-41, 1986.
25. KREIDER, R. B.; BOONE, T.; THOMPSON, W. R.; BURKES, S.; CORTES, C. W. Cardiovascular and thermal responses of triathlon performance. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.20, p.385-390, 1988a.
26. KREIDER, R. B. Physiological considerations of ultraendurance performance. *Int. J. Sports Nutr.*, v.1, n.1, p.3-27, 1991.
27. LAURSEN, P. B.; RHODES, E. C. Physiological analysis of a high intensity ultraendurance event. *Strength Cond. J.*, v.21, p.26-38, 1999.
28. LAURSEN, P. B.; RHODES, E. C.; LANGILL, R. H. The effects of 3000-m swimming on subsequent 3-h cycling performance: implications for ultraendurance triathletes. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v.83, n.1, p.28-33, 2000.
29. LAURSEN, P. B.; JENKINS, D. G. The scientific basis for high-intensity interval training: optimizing training programmes and maximizing performance in highly trained endurance athletes. *Sports Med.*, v.32, n.1, p.53-73, 2002a.
30. LAURSEN, P. B.; RHODES, E. C.; LANGILL, R. H.; MCKENZIE, D. C.; TAUNTON, J. E. Relationship of exercise test variables to cycling performance in an Ironman triathlon. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v.87, n.4-5, p.433-440, 2002b.
31. LEEUWENBURGH, C.; HOLLANDER, J.; LEICHTWEISS, S.; GRIFITHS, M.; GORE, M.; JI, L. L. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am. J. Physiol.*, v.272 (Regulatory Integrative Comp. Physiol 41), p.R363 – R369, 1997.
32. LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; CASTILLO, M. D. Evaluation of total antioxidant reactivity from luminal-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad. Biol. Med.*, v.18, p.153-158, 1995.

33. LLESUY, S. F. MILEI, J.; FLECHA, B. S. G.; BOVERIS, A. Myocardial damage induced by doxorubicins: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology. *Free Rad. Biol. Med.*, v.8, p.259-264, 1990.
34. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAHL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.
35. McANULTY, S. R.; McANULTY, L. S.; NIEMAN, D. C.; MORROW, J. D.; SHOOTER, L. A.; HOLMES, S.; et al. Effect of alpha-tocopherol supplementation on plasma homocysteine and oxidative stress in highly trained athletes before and after exhaustive exercise. *J. Nutr. Biochem.*, v.16, p.530-537, 2005.
36. MARGARITIS, I.; TESSIER, F.; M. -J. RICHARD; MARCONNET, P. No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int. J. Sports Med.*, v.18, n.3, p.186-190, 1997.
37. MARKLUND, S. In: Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Boca Raton. CRC Press, p.243-247, 1985.
38. MARZATICO, F.; PANSARASA, O.; BERTORELLI, L.; SOMENZINI, L.; DELLA VALLE, G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J. Sports Med. Phys. Fitness.*, v.37, n.4, p.235-239, 1997.
39. MASTALOUDIS, A.; LEONARD, S. W.; TRABER, M. G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Rad. Biol. Med.*, v.31, n.7, p.911-922, 2001.
40. MASTALOUDIS, A.; YU, T.-W.; O'DONNELL, R. P.; FREI, B.; DASHWOOD, R. H.; TRABER, M. G. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic. Biol. Med.*, v.36, n.8, p.966-975, 2004a.
41. MASTALOUDIS, A.; MORROW, J. D.; HOPKINS, D. W.; DEVARAJ, S.; TRABER, M. G. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic. Biol. Med.*, v.36, n.10, p.1329-1341, 2004b.
42. MILLER, W. R.; ROLLNICK, S. Entrevista Motivacional. Artmed, Porto Alegre, 1 ed., 2001.

43. NIEMAN, D. C.; HENSON, D. A.; McANULTY S R.; McANULTY L S.; MORROW, J. D.; AHMED, A.; et al. Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.36, p.1328-1335, 2004.
44. O'TOOLE, M. L. Training for ultraendurance triathlons. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.21, p.5209-5213, 1989.
45. PHILIPPI, S. Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para decisão nutricional. 2 ed., Gráfica Coronário, 2002.
46. PINHEIRO, A. V. B.; LACERDA, E. M. A.; BENZECRY, E. H.; GOMES, M. C. S.; COSTA, V. M. *Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras*. 5 ed, Atheneu, São Paulo, 2005.
47. POWERS, S. K.; JI, L. L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.31, n.7, p.987-997, 1999.
48. REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, v.233, p.357-363, 1994.
49. RIEDL, J.; LINSEISEN, J.; HOFFMANN, J.; WOLFRAM, G. Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *J. Nutr.*, v.129, p. 2170–2176, 1999.
50. ROBINSON, Y.; CRISTANCHO, E.; BONING, D. Intravascular hemolysis and mean red blood cell age in athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.38, n.3, p.480-483 2006.
51. ROWLANDS D. S.; DOWNEY, B. Physiology of Triathlon. In: GARRETT, Jr., W. E.; KIRKENDALL, D. T. *Exercise and Sport Science*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.921-922.
52. SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev. Bras. Med. Esporte*, v. 10, n.4, p.308-313, 2004.
53. SENTÜRK, Ü. K.; GÜNDÜZ, F.; KURU, O.; KOÇER, G.; ÖZKAYA, Y. G.; YESILKAYA, A.; BOR-KÜÇÜKATAY, M.; ÜYÜKLÜ, M.; YALÇIN, O.; BASKURT, O. K. Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained human. *J. Appl. Physiol.*, v.99, n.4, p.1434-1441, 2005.
54. SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA DO ESPORTE. Diretriz da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte - Modificações dietéticas, reposição

- hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. *Rev. Bras. Med. Esp.*, v.9, n.2, p.43-56, 2003.
55. STRAIN, J. J.; ELWOOD, P. C.; DAVIS, A.; KENNEDY, O., COULTER J.; FEHILY, A.; MULHOLLAND C. W.; ROBSON, P. J.; THURNHAM, D. I.; Frequency of fruit and vegetable consumption and blood antioxidants in the Caerphilly cohort of older men. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v.54, p.828-833, 2000.
56. TARNOPOLSKY, M. Protein requirements for endurance athletes. *Nutrition*, v.20, p.662-668, 2004.
57. TAULER, P.; AGUILÓ, A.; FUENTESPINA, E.; TUR, J. A.; PONS, A. Diet supplementation with vitamin E, vitamin C and  $\beta$ carotene cocktail enhances basal neutrophil antioxidant enzymes in athletes. *Pflügers Arch.- Eur. J. Physiol.*, v.443, p.791-797, 2002.
58. TAULER, P.; AGUILÓ, A.; GUIX, P.; JIMÉNEZ, F.; VILLA, G.; TUR, J. A.; CÓRDOVA, A.; PONS, A. Pre-exercise antioxidant enzyme activities determine the antioxidant enzyme erythrocyte response to exercise. *J. Sports Sci.*, v.23, p.5-13, 2005.
59. VIÑA, J.; GOMEZ-CABRERA, M. C.; LLORET, A.; MARQUEZ, R.; MIÑANA, J. B.; PALLARDÓ, F. V.; SASTRE, J. Free radical in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life*, v.50, n.4-5, p.271-277, 2000.
60. VOGT, S.; HEINRICH, L.; SCHUMACHER, Y. O.; GROSSHAUSER, M.; BLUM, A.; KONIG, D.; BERG, A.; SCHMID, A. Energy intake and energy expenditure of elite cyclists during pre-season training. *Int. J. Sports Med.*, v.26, n.8, p.701-706, 2005.
61. WATERMAN, P.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Pubs, London, 238 p., 1994.
62. WU, H. J.; CHEN, K. T.; SHEE, B. W.; CHANG, H. C.; HUANG, Y. J.; YANG, R. S. Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and hematological parameters. *World J. Gastroenterol.*, v.10, n.18, p.2711-2714, 2004.
63. ZABOTTO, C. B. Registro Fotográfico para Inquéritos Dietéticos: Utensílios e Porções. UNICAMP, São Paulo; UFG, Goiânia, 1996.

64. ZALCMAN, I.; GUARITA, H. V.; JUZWIAK, C. R.; CRISPIM, C. A.; ANTUNES, H. K.; EDWARDS, B.; TUFIK, S.; DE MELLO, M. T. Nutritional status of adventure racers. *Nutrition*, v.23, n.5, p.404-411, 2007.
65. ZARYSKI, C.; SMITH, D. J. Training principles and issues for ultra-endurance athletes. *Curr. Sports Med. Rep.*, v.4, n.3, p.165-170, 2005.

**Anexos****ANEXO I – FICHA DE COLETA DE DADOS**

Nome: \_\_\_\_\_ Código: \_\_\_\_\_

**FICHA DE COLETA DE DADOS:****Dados de identificação:**

DN: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Convênio médico: \_\_\_\_\_

Fone: \_\_\_\_\_ (res) \_\_\_\_\_ (com) \_\_\_\_\_ (cel)

Email: \_\_\_\_\_

Prática do triatlo (anos): \_\_\_\_\_ Ironman realizados: \_\_\_\_\_

Nome treinador: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Crítérios de inclusão:**

Fumante: ( ) sim ( ) não

Medicamentos: anti-inflamatórios ( ) sim ( ) não      analgésicos ( ) sim ( ) não

\_\_\_\_\_

Outro medicamento: \_\_\_\_\_

Suplementos: vitaminas ( ) sim ( ) não      minerais ( ) sim ( ) não

\_\_\_\_\_

Exames: glicose ( ) sim ( ) não      colesterol ( ) sim ( ) não      TGL ( ) sim ( ) não

\_\_\_\_\_

**Anamnese alimentar:**

Alergia a alimentos: \_\_\_\_\_

Intolerâncias: \_\_\_\_\_

Alimentos que prefere: ( ) doce ( ) salgado \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Bebidas alcoólicas: \_\_\_\_\_

Tipo de líquidos ao longo do dia: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Costuma adoçar as bebidas: ( ) sim ( ) não ( ) açúcar ( ) adoçante \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um estudo que visa determinar a correlação entre dieta, estresse oxidativo e exercício de ultra-resistência. Sua presença será necessária em torno de 2 vezes por mês ao longo do período de seis meses no Laboratório de Pesquisa do Exercício (LAPEX) da UFRGS, onde serão realizados os testes.

Serão realizados dois testes de carga máxima em esteira rolante e cicloergômetro, para determinação do consumo máximo de oxigênio e limiares ventilatórios. Também serão realizadas uma avaliação da composição corporal e uma avaliação cardiológica.

Você receberá orientação nutricional individualizada com prescrição dietética durante o período do estudo. O objetivo do estudo é comparar os efeitos de dietas ricas em antioxidantes ou de suplementos de antioxidantes em relação aos parâmetros de estresse oxidativo. Portanto, sempre antes e após as intervenções dietéticas de 2 semanas de duração, será coletada uma amostra sanguínea no turno da manhã, em jejum e sem prática de exercício.

Você será acompanhado por uma equipe de pesquisadores experientes, dessa forma, o risco de complicação é mínimo.

Você também não deverá ser portador de qualquer tipo de doença, nem estar fazendo uso de qualquer medicação ou suplementação nutricional que por ventura possa interferir nos resultados do estudo em questão, como por exemplo, suplementos de vitaminas e minerais.

A participação neste estudo é absolutamente voluntária, sem, portanto, qualquer tipo de gratificação, tendo direito aos seus resultados ao longo do estudo.

Todas as informações serão confidenciais, tendo acesso a elas somente os profissionais envolvidos no estudo e o voluntário analisado.

Você é livre para realizar perguntas antes, durante ou após o estudo, estando livre para desistir do mesmo em qualquer momento, sem prejuízo algum.

Qualquer dúvida ou dificuldade entre em contato com os pesquisadores pelo telefone 3308-5861.

### DECLARAÇÃO

Declaro estar ciente dos benefícios, riscos e conseqüências deste estudo. Não receberei qualquer pagamento por minha participação, além do acesso aos meus resultados. Aceito, dessa forma, participar desta investigação.

\_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**ANEXO III – PAR-Q: Questionário sobre prontidão para a atividade física**

Nome do participante: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

O PAR-Q é designado para ajudar você a ajudar a si mesmo. Muitos benefícios de saúde estão associados ao exercício regular, e o preenchimento do PAR-Q é um primeiro passo sensível a ser dado se você está planejando aumentar a quantidade de atividade física em sua vida.

Para muitas pessoas, a atividade física não deve representar qualquer problema ou risco. O PAR-Q tem sido designado para identificar o pequeno número de adultos para quem a atividade física pode ser imprópria ou para aqueles que devem receber orientação médica sobre o tipo de atividade mais adequada para o seu caso.

O bom senso é o seu melhor guia para responder a estas perguntas. Leia-as cuidadosamente e marque (x) no SIM ou NÃO ao lado da questão, dependendo se ela se aplica a você.

SIM    NÃO

1. Seu médico alguma vez já lhe disse que você tem problema cardíaco?
2. Você sente freqüentemente dores no coração ou no peito?
3. Você muitas vezes se sente fraco ou tem fortes episódios de tontura?
4. Algum médico já lhe disse que sua pressão arterial estava muito alta?
5. Algum médico já lhe disse que você tem um problema ósseo ou articular tal como artrite que tenha sido agravado por exercício ou possa piorar com exercício?
6. Há uma boa razão física não mencionada aqui pela qual você não deva seguir um programa de atividade mesmo que quisesse?
7. Você tem mais de 65 anos e não está acostumado com exercício vigoroso?

## ANEXO IV – REGISTRO ALIMENTAR

### RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 3 DIAS

O objetivo deste registro é conhecer os seus hábitos alimentares. Para que eles estejam o mais próximo possível da sua realidade, é importante que você anote TUDO o que comer e beber durante estes 3 dias. Isto quer dizer o que comer na hora das refeições e fora delas também (as conhecidas “beliscadas”). Sempre que souber, procure anotar as marcas dos fabricantes (por exemplo, requeijão da lacesa, pão integral da seven boys, etc.), indicar quando o alimento for light ou diet. Procure anotar com detalhes as quantidades (em medidas caseiras como colheres de sopa/chá, copo, caneca, etc. cheias ou rasas, grandes, médias ou pequenas) e qualidades (se comer fruta diga qual foi: banana, maçã, etc.). Quando comer pratos elaborados como lasanhas, quiches, pastelões, procure descrever o recheio e o tamanho da porção, comparando-a a outro alimento e/ou usando as medidas caseiras fornecidas.

Indicar se os sucos são puros ou diluídos com água, se são adoçados com açúcar ou adoçante, se são naturais ou artificiais e a marca.

Anotar o queijo parmesão (ralado) quando adicionar aos alimentos.

Exemplo:

#### DESJEJUM – 7h

1 copo (de requeijão) de leite desnatado  
 1 colher de sopa cheia de Nescau  
 1 banana caturra  
 1 pão francês de 50g  
 1 colher de sopa rasa – margarina becel  
 1 colher de sopa cheia de mel  
 1 fatia de queijo lanche fatiado

#### COLAÇÃO – 10h

2 barras de cereal trio de morango com chocolate

#### ALMOÇO – 12:30

1 prato fundo de macarrão com 4 colheres de sopa cheias de molho de tomate pomarola, mais 1 colher de sopa cheia de queijo parmesão ralado.  
 1 coxa de frango sem pele mais 1 sobrecoxa sem pele  
 2 rodela finas de beterraba cozida e 2 folhas médias de alface sem tempero  
 2 copos (de requeijão) de suco de uva *izz*i puro  
 1 picolé chicabom de sobremesa

#### LANCHE – 18h

3 bananas médias e 6 bolachas de água e sal

#### MERENDA – não comi nada

#### JANTA – 22h

1 pizza sadia sabor calabresa  
 2 copos de coca-cola normal  
 3 bombons sonho de valsa

#### CEIA – não comi nada

Procure não alterar seus hábitos alimentares nestes dias. Anote logo após ou durante as refeições. Não julgue sua alimentação, faça as anotações e depois questione suas dúvidas.

Nome:

Código:

Data:

Refeição	Alimento	Marca / fabricante
Hora / Local	Quantidade em gramas e/ou medidas caseiras	

## ANEXO V – ORIENTAÇÕES PARA OS TESTES

### Atenção aos cuidados antes de cada procedimento:

#### **Avaliação da composição corporal:**

Não realizar nenhum exercício pelo menos 4h antes da avaliação. Vestir calção ou sunga.

#### **Potência aeróbia máxima ( $VO_{2máx}$ ) - esteira e cicloergômetro**

Comparecer ao local do teste 15 minutos antes do combinado, trajando roupa e tênis adequado, no caso do teste no cicloergômetro trazer sua sapatilha de ciclismo.

Não consumir café ou qualquer tipo de bebidas alcoólicas nas 24h que antecedem os testes.

Não realizar exercícios extenuantes nas 24h que antecedem os testes.

Ingerir suas refeições habituais, cuidando para não realizar o exercício em jejum, ou com intervalo pequeno entre a refeição e o teste, tentando evitar qualquer desconforto gastrointestinal ou mal estar durante o exercício.

#### **Coletas de sangue:**

As coletas de sangue serão realizadas sempre no turno da manhã, entre 6h30min e 7h30min no LAPEX, **EM JEJUM!** Não pode haver nenhum exercício / atividade física e nenhuma refeição até a hora da coleta de sangue.

Deve haver um jejum de pelo menos 6h.

Não ingerir bebidas alcoólicas pelo menos 24h antes das coletas de sangue.

Não realizar exercício intenso nas 24h anteriores a coleta de sangue.

Qualquer dúvida ou dificuldade entrar em contato com Cláudia pelo telefone 9106-2092 ou cds\_nut@hotmail.com.

## ANEXO VI – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**CARTA DE APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

**Número :** 2005474

**Título :** Efeitos da dieta rica em antioxidantes sobre parâmetros de estresse oxidativo em triatletas

**Pesquisador (es) :**

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
ALVARO REISCHAK DE OLIVEIRA	PESQ RESPONSÁVEL	aroliveira@esef.ufrgs.br	33165869
CLAUDIA DORNELLES SCHNEIDER	PESQUISADOR	claudiadschneider@ig.com.br	33165591

O mesmo foi aprovado , com recomendações, especificadas abaixo, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, na reunião nº 3 , ata nº 69 , de 13/04/2006 .

**Recomendação(ões):**

A amostragem é do tipo intencional, não probabilística, em função do número de atletas que praticam Ironman ser reduzido. A amostra contara com 13 triatletas residentes em Porto Alegre. O problema do projeto é ter realizado um estudo piloto com 12 atletas em 2003 e 2004. Segundo o pesquisador responsável o estudo piloto teria sido sequencia de um outro projeto (200024) aprovado por este Comitê. O projeto anterior previa avaliar marcadores de estresse oxidativo e capacidade antioxidante total em indivíduos saudáveis atletas e não atletas comparando-os com variáveis fisiológicas como: VO<sup>2</sup>, quociente respiratório, lactacidemia e frequência cardíaca, obtidas a partir de teste de esforço. Os indivíduos considerados atletas escolhidos pelo VO<sup>2</sup>>50ml/Kg-1, não mencionava triatletas e nem intervenção na dieta. Recomendada aprovação do projeto em função da utilização de metodologia já testada anteriormente sem prejuízo aos participantes. Entretanto, este Comitê ressalva que a realização do projeto piloto ocorreu indevidamente, uma vez que não tinha autorização prévia.

Porto Alegre, quarta-feira, 17 de maio de 2006

LUIZ CARLOS BOMBASSARO

Coordenador do CEP-UFRGS

**ANEXO VII – VALORES INDIVIDUAIS DOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS****Tabela 1 – Valores individuais de compostos fenólicos (equiv. ácido tânico.mL plasma<sup>-1</sup>).**

sujeitos	Dieta controle		Dieta Antioxidante		Suplemento Antioxidante		
	antes	depois	antes	depois	antes	depois	8 semanas
1	65,10	63,91	95,82	78,50	73,94	81,33	68,93
2	74,12	69,47	72,39	64,73	60,99	69,93	59,26
3	65,37	60,81	66,10	76,95	73,94	67,19	63,09
4	71,75	81,05	101,02	61,91	68,47	66,37	
5	129,01	103,30	91,45	82,42	73,12	77,77	67,83
6	65,19	79,14	65,28	65,92	67,29	62,27	53,52
7	71,84	61,72	76,22	109,23	72,57	67,01	63,09
8	54,52	74,40	101,48	73,30	78,41	56,07	66,28
9	62,00	82,06	68,74	80,14	91,17	81,87	65,74
10	79,78	67,74	84,70	65,74	79,87	68,65	68,84
11	89,08	62,45	93,18	75,86	73,85	81,69	91,17
12	78,32	80,51	84,52	72,48	78,41	83,51	85,43
13	73,12	57,17	73,94	75,58	72,48	72,30	78,32

**Tabela 2 – Valores individuais de TRAP ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).**

sujeitos	Dieta controle		Dieta Antioxidante		Suplemento Antioxidante		
	antes	depois	antes	depois	antes	depois	8 semanas
1	198,13	228,68	244,18	174,01	126,68	192,66	402,35
2	206,93	182,77	96,20	194,80	113,48	137,23	293,09
3	220,73	84,98	100,78	149,63	126,68	134,60	248,00
4	185,54	266,80	295,22	230,66	145,15	215,21	
5	168,30	275,17	142,02	285,15	153,07	174,18	315,64
6	107,66	180,69	234,52	230,66	139,87	135,92	107,66
7	292,46	356,11	160,34	220,21	176,82	137,23	103,08
8	186,68	151,04	231,76	271,13	163,63	269,19	153,47
9	253,84	287,31	171,79	145,40	240,16	126,68	155,76
10	137,43	162,31	240,04	232,68	171,54	153,07	114,53
11	273,15	230,66	139,72	220,73	216,41	205,85	219,89
12	177,52	252,46	267,08	250,89	205,85	213,77	226,77
13	254,94	250,89	142,02	277,29	190,02	139,87	256,54

Tabela 3 – Valores individuais de catalase (pmol.mg proteína<sup>-1</sup>).

Sujeitos	Dieta controle		Dieta Antioxidante		Suplemento Antioxidante		
	antes	depois	antes	depois	antes	depois	8 semanas
1	32,51	28,05	40,48	30,32	33,54	32,06	30,79
2	27,27	27,61	26,09	24,06	31,51	35,08	21,92
3	34,91	34,17	30,34	25,01	33,11	38,22	29,26
4	22,22	29,72	32,94	30,35	31,26	28,86	
5	39,03	33,26	30,44	25,31	29,66	36,38	31,55
6	25,66	36,62	32,38	32,75	35,72	39,02	24,51
7	26,69	29,66	23,44	24,65	22,65	32,44	22,25
8	28,37	28,45	25,71	31,5	31,31	35,38	22,09
9	34,56	30,43	26,64	32,38	35,59	31,93	22,00
10	27,39	31,68	29,46	31,98	27,90	25,53	32,33
11	29,02	30,01	26,67	22,74	30,48	39,15	29,00
12	25,03	26,71	23,83	32,03	32,63	33,27	27,95
13	30,94	38,73	25,72	28,42	33,24	39,83	30,89

Tabela 4 – Valores individuais de superóxido dismutase (U SOD.mg proteína<sup>-1</sup>).

sujeitos	Dieta controle		Dieta Antioxidante		Suplemento Antioxidante		
	antes	depois	antes	depois	antes	depois	8 semanas
1	14,73	30,38	13,89	35,81	42,41	33,11	26,54
2	17,27	31,24	16,59	28,94	30,84	29,59	19,71
3	8,55	36,42	15,79	36,14	29,56	33,76	30,02
4	12,24	37,97	20,54	29,12	51,10	36,58	
5	15,86	21,76	17,31	18,80	48,21	31,55	30,31
6	18,73	27,45	19,77	35,54	43,72	34,01	25,78
7	20,41	32,23	15,47	38,16	32,87	36,37	26,88
8	14,07	32,97	15,29	33,99	51,08	38,47	29,82
9	17,77	33,04	15,60	27,55	51,59	34,16	24,15
10	12,82	31,99	13,16	37,38	46,56	38,62	33,95
11	18,68	33,13	18,07	29,21	53,88	37,55	24,87
12	11,89	28,55	15,46	31,51	34,23	35,77	28,30
13	17,70	34,58	22,51	37,29	44,43	37,95	29,45



Tabela 5 – Valores individuais de glutatona peroxidase ( $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ ).

sujeitos	Dieta controle		Dieta Antioxidante		Suplemento Antioxidante		
	antes	depois	antes	depois	antes	depois	8 semanas
1	4,10	3,86	3,48	4,65	5,05	4,61	2,82
2	3,12	3,00	3,52	4,34	4,67	5,63	2,93
3	3,09	4,24	4,01	3,68	4,96	5,35	3,09
4	3,62	4,79	3,57	4,04	4,96	5,32	
5	3,62	4,40	3,92	3,68	4,88	4,11	6,63
6	4,19	4,72	3,65	4,23	4,95	4,57	3,90
7	3,22	3,75	3,85	3,68	3,34	4,32	2,78
8	3,57	4,26	3,20	4,05	4,63	4,48	2,19
9	3,18	3,19	4,12	3,63	4,23	4,56	3,34
10	4,70	3,95	3,44	5,26	3,78	5,25	4,45
11	3,11	3,35	4,30	3,97	4,83	5,24	2,37
12	3,79	3,39	3,51	3,32	4,05	5,49	3,58
13	3,45	4,19	3,80	4,25	4,84	5,50	2,80

Tabela 6 – Valores individuais de carbonilas ( $\text{nmol}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ ).

sujeitos	Dieta controle		Dieta Antioxidante		Suplemento Antioxidante		
	antes	depois	antes	depois	antes	depois	8 semanas
1	11,73	6,63	15,48	16,46	11,07	20,89	8,29
2	11,54	15,80	14,69	10,31	10,87	21,18	5,02
3	9,64	15,47	14,08	10,01	10,33	21,25	9,72
4	15,41	9,29	13,29	15,95	11,23	21,90	
5	10,12	15,21	14,32	11,73	10,91	20,75	6,28
6	15,60	10,25	14,93	15,07	11,15	21,36	3,18
7	14,49	14,41	12,03	9,31	10,75	20,30	8,63
8	15,23	11,06	9,16	14,58	11,65	20,31	10,05
9	7,82	15,50	14,08	9,59	11,49	22,10	9,61
10	15,88	8,97	9,72	15,36	11,08	20,08	8,00
11	9,53	15,68	16,56	11,35	10,97	21,51	8,86
12	14,97	12,24	8,17	16,42	11,03	20,89	11,09
13	12,34	16,52	16,38	10,24	11,47	22,08	10,10

Tabela 7 – Valores individuais de ácido úrico ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

sujeitos	Dieta controle		Dieta Antioxidante		Suplemento Antioxidante		
	antes	depois	antes	depois	antes	depois	8 semanas
1	40,96	37,45	46,08	32,78	51,26	55,90	46,91
2	37,57	33,65	34,50	31,37	37,71	45,75	55,53
3	25,61	27,50	31,18	23,06	34,78	38,00	44,77
4	45,02	40,59	61,08	45,43	40,54	45,21	
5	50,46	53,58	55,35	54,98	46,01	49,38	35,94
6	21,22	23,25	25,36	31,23	44,30	37,86	36,59
7	36,77	48,58	40,22	33,58	43,51	33,22	48,76
8	57,38	40,41	56,29	45,86	46,95	45,64	44,45
9	49,05	57,02	46,86	41,33	56,80	49,99	61,11
10	35,06	27,86	38,36	43,25	46,15	67,71	38,04
11	57,63	55,35	44,28	31,55	61,51	51,51	53,79
12	51,85	51,29	65,06	50,24	56,73	69,73	65,71
13	46,98	40,97	38,75	39,85	47,09	50,03	67,16

Tabela 8 - Valores individuais de TBARS ( $\text{pmol.mg proteína}^{-1}$ ).

sujeitos	Dieta controle		Dieta Antioxidante		Suplemento Antioxidante		
	antes	depois	antes	depois	antes	depois	8 semanas
1	3,48	3,55	1,58	1,40	0,79	0,44	0,75
2	1,66	2,01	2,57	3,46	0,99	0,68	0,60
3	2,02	1,37	3,02	3,51	0,60	1,29	0,54
4	3,16	3,54	1,67	1,47	0,67	0,60	
5	1,61	1,99	3,35	3,88	0,95	0,39	0,91
6	3,06	3,01	1,85	1,73	0,52	1,42	1,93
7	1,99	2,71	2,39	3,14	1,27	0,40	0,62
8	2,10	3,54	1,44	1,17	0,67	1,52	0,59
9	1,63	1,32	2,88	4,39	1,36	1,15	1,16
10	2,20	2,92	1,39	2,55	0,95	0,63	1,09
11	1,47	0,87	2,99	3,84	0,50	0,52	0,88
12	3,05	2,53	1,93	1,31	0,88	0,88	0,60
13	1,60	1,69	3,36	3,25	0,87	0,49	0,47

Tabela 9 – Valores individuais de sulfidril (thiol.mg proteína<sup>-1</sup>).

sujeitos	Dieta controle		Dieta Antioxidante		Suplemento Antioxidante		
	antes	depois	antes	depois	antes	depois	8 semanas
1	2,24	4,47	5,62	3,33	2,31	2,74	2,97
2	4,01	3,41	2,28	3,92	4,61	4,12	2,37
3	2,86	2,62	1,95	3,30	3,35	2,54	4,5
4	1,35	2,83	3,57	3,40	2,65	4,55	.
5	9,56	1,75	1,66	3,73	1,84	1,97	2,09
6	1,83	2,56	6,41	4,03	2,61	2,51	1,77
7	8,15	4,48	1,57	3,31	2,18	3,85	4,66
8	1,85	3,68	7,53	2,25	4,32	3,53	3,82
9	2,72	3,18	1,60	2,53	3,86	3,15	1,32
10	2,18	3,02	9,48	5,62	3,66	0,83	1,27
11	3,19	1,75	2,02	3,90	2,58	1,72	2,98
12	3,11	4,13	4,44	1,71	4,37	1,63	2,75
13	2,92	2,7	2,5	3,17	4,3	3,2	3,41

Tabela 10 – Valores individuais de creatina quinase (U.L<sup>-1</sup>).

sujeitos	Antes suplementação	Depois suplementação	8 semanas suplementação
1	576,77	803,43	710,74
2	535,48	547,63	1041,83
3	1191,58	1093,23	1752,97
4	1013,09	867,38	
5	892,88	1234,89	1098,90
6	847,95	1268,08	1751,35
7	621,29	724,91	545,20
8	3079,74	719,65	1984,08
9	468,30	841,07	737,05
10	1688,21	858,07	1115,49
11	621,29	577,98	565,44
12	1127,23	1309,37	2121,70
13	545,60	640,31	885,19

**ANEXO VIII – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS AO LONGO DO ESTUDO****Tabela 1 – Valores hematológicos antes da intervenção dietética 1**

Atleta	Eritroc. ( $10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Hb ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	RDW (%)	Reticul. (%)	Reticul. (uL)	Ferritina ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
1	4,39	14,6	43,8	99,7	33,2	33,3	13,1	0,82	35998	51
2	4,93	16,0	47,4	96,1	32,4	33,7	14,0	0,85	41905	130
3	5,20	15,1	45,5	87,5	29	33,1	13,8	1,06	55120	96
4	4,62	14,2	42,5	91,9	30,7	33,4	12,7	0,74	34188	36
5	4,98	14,6	42,5	85,3	29,3	34,3	12,9	1,45	72210	114
6	5,13	15,9	46,3	90,2	30,9	34,3	13,7	1,06	54378	32
7	5,07	16,0	45,7	90,1	31,5	35,0	12,3	1,79	90753	134
8	5,05	15,3	45,5	90,0	30,2	33,6	13,2	0,95	47975	248
9	5,19	15,8	47,1	90,7	30,4	33,5	12,4	0,99	51381	218
10	5,05	15,4	44,9	88,9	30,4	34,2	12,6	1,25	63125	144
11	5,24	15,6	46,4	88,5	29,7	33,6	14,3	1,30	68120	75
12	5,48	16,3	48,3	88,1	29,7	33,7	13,0	1,16	63568	18
13	5,10	14,7	43,5	85,2	28,8	33,7	13,0	1,24	63240	74

**Tabela 2 – Valores hematológicos depois da intervenção dietética 1**

Atleta	Eritroc. ( $10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Hb ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	RDW (%)	Reticul. (%)	Reticul. (uL)	Ferritina ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
1	4,32	14,0	43	99,5	32,4	32,5	12,8	0,66	28512	86
2	5,05	16,0	47,5	94	31,6	33,6	12,8	0,91	45955	163
3	5,35	15,5	45,8	85,6	28,9	33,8	13,2	0,92	49220	108
4	4,92	14,8	44,5	90,4	30,0	33,2	12,3	0,95	46740	39
5	5,06	14,6	43,1	85,1	28,8	33,8	12,3	1,26	63756	132
6	5,16	15,5	46,2	89,5	30,0	33,5	13,3	1,06	54696	26
7	5,04	16,0	45,4	90	31,7	35,2	12,2	1,67	84168	103
8	5,07	15,3	45,9	90,5	30,1	33,3	12,7	0,86	43602	200
9	5,22	15,7	47,2	90,4	30,0	33,2	12,1	0,80	41760	258
10	5,32	16,1	47,4	89	30,2	33,9	12,3	0,81	43092	163
11	5,21	15,4	46,3	88,8	29,5	33,2	13,1	1,15	59915	104
12	5,66	16,3	49,5	87,4	28,7	32,9	12,5	1,05	59430	29
13	5,28	14,9	45	85,2	28,2	33,1	12,9	0,96	50688	67

Tabela 3 – Valores hematológicos antes da intervenção dietética 2

Atleta	Eritróc. ( $10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Hb ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	RDW (%)	Reticul. (%)	Reticul. (uL)	Ferritina ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
1	4,20	13,2	41,0	97,6	31,4	32,1	13,1	1,02	42840	100
2	5,43	17,3	52,7	97,0	31,8	32,8	13,4	1,25	67875	154
3	5,17	14,7	44,7	86,4	28,4	32,8	12,8	0,80	41360	208
4	4,92	15,1	44,4	90,2	30,6	34	12,4	1,05	51660	65
5	5,28	14,9	44,6	84,4	28,2	33,4	12,5	1,08	57024	192
6	5,01	15,2	45,0	89,8	30,3	33,7	13,4	1,01	50601	26
7	5,11	16,0	45,7	89,4	31,3	35	11,7	1,73	88403	191
8	5,26	15,3	47,2	89,7	29	32,4	12,6	0,85	44710	239
9	4,75	14,4	43,0	90,5	30,3	33,4	12,5	0,91	43225	277
10	5,41	16,2	48,3	89,2	29,9	33,5	12,3	0,95	51395	206
11	5,13	15,2	44,7	87,1	29,6	34	13,0	1,09	55917	113
12	5,83	16,8	49,6	85,0	28,8	33,8	12,8	1,03	60049	46
13	5,36	15,4	46,0	85,8	28,7	33,4	12,8	0,95	50920	96

Tabela 4 – Valores hematológicos depois da intervenção dietética 2

Atleta	Eritróc. ( $10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Hb ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	RDW (%)	Reticul. (%)	Reticul. (uL)	Ferritina ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
1	4,54	14,0	44,3	97,5	30,8	31,6	13,4	0,79	35866	113
2	5,13	15,9	49,5	96,4	30,9	32,1	13,5	0,78	40014	133
3	5,13	14,5	44,9	87,5	28,2	32,2	14,0	1,18	60534	110
4	4,72	14,9	42,3	89,6	31,5	35,2	12,3	0,87	41064	64
5	5,17	14,7	42,9	82,9	28,4	34,2	12,7	1,50	77550	123
6	5,40	15,7	47,7	88,3	29,0	32,9	13,4	1,02	55080	29
7	4,97	15,2	43,9	88,3	30,5	34,6	12,3	1,37	68089	130
8	5,08	15,1	45,3	89,1	29,7	33,3	12,8	0,93	47244	213
9	4,94	14,6	44,2	89,4	29,5	33,0	12,8	1,13	55822	313
10	5,03	15,5	44,9	89,2	30,8	34,5	12,5	1,05	52815	151
11	5,04	15,1	44,4	88	29,9	34,0	13,1	1,28	64512	84
12	5,62	16,3	48,4	86,1	29,0	33,6	13,2	1,28	71936	50
13	5,10	14,3	43,6	85,4	28,0	32,7	13,3	0,90	45900	85

Tabela 5 – Valores hematológicos antes da suplementação antioxidante

Atleta	Eritróc. ( $10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Hb ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	RDW (%)	Reticul. (%)	Reticul. (uL)	Ferritina ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
1	4,64	14,8	45,9	98,9	31,8	32,2	14,1	1,28	59392	108
2	4,98	15,8	46,5	93,3	31,7	33,9	13,0	0,67	33366	192
3	5,44	15,5	47,7	87,6	28,4	32,4	14,4	1,07	58208	55
4	4,71	14,0	42,3	89,8	29,7	33,0	12,8	1,05	49455	57
5	5,00	14,4	41,7	83,4	28,8	34,5	12,9	1,05	52500	135
6	5,27	15,9	46,5	88,2	30,1	34,1	13,6	0,91	47957	32
7	4,76	14,8	41,9	88,0	31,0	35,3	12,8	1,55	73780	130
8	5,00	14,9	44,6	89,2	29,8	33,4	13,0	0,95	47500	231
9	5,09	15,2	45,2	88,8	29,8	33,6	12,9	1,02	51918	312
10	5,15	15,6	45,8	88,9	30,2	34,0	12,5	0,77	39655	223
11	5,06	14,8	43,4	85,7	29,2	34,1	13,4	1,30	65520	78
12										
13	5,26	14,8	44,3	84,2	28,1	33,4	13,2	0,83	43658	69

Tabela 6 – Valores hematológicos depois de 14 dias da suplementação antioxidante

Atleta	Eritróc. ( $10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Hb ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	RDW (%)	Reticul. (%)	Reticul. (uL)	Ferritina ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
1	4,45	14,4	43,8	98,4	32,3	32,8	13,6	1,03	45835	96
2	5,29	16,9	50,1	94,7	31,9	33,7	13,3	0,74	39146	174
3	5,34	15,0	47,4	88,7	28,0	31,6	14,3	0,68	36312	194
4	4,94	15,0	44,8	90,6	30,3	33,4	12,9	1,16	57304	61
5	5,12	14,7	44,1	86,1	28,7	33,3	13,0	1,52	77824	98
6	5,03	15,3	44,8	89,0	30,4	34,1	13,8	0,98	49294	36
7	5,13	15,9	46,0	89,6	30,9	34,5	12,7	1,40	71820	120
8	5,04	15,2	44,9	89,0	30,1	33,8	13,1	0,99	49896	236
9	4,90	14,8	44,4	90,6	30,2	33,3	13,0	1,06	51940	274
10	4,92	15,0	44,6	90,6	30,4	33,6	12,4	0,96	47232	176
11	5,06	15,0	44,5	87,9	29,6	33,7	13,4	1,38	69828	77
12	5,09	15,2	44,7	87,8	29,8	34,0	13,4	1,13	57517	38
13	5,21	14,7	44,7	85,7	28,2	32,8	13,3	0,99	51579	60

Tabela 7 – Valores hematológicos após 8 semanas de suplementação antioxidante

Atleta	Eritróc. ( $10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Hb ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM ( $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	RDW (%)	Reticul. (%)	Reticul. (uL)	Ferritina ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
1	4,28	13,8	42,4	99,0	32,2	32,5	13,4	1,04	44512	65
2	4,77	15,5	45,0	94,3	32,4	34,4	13,3	0,90	42930	171
3	5,50	16,0	48,2	87,6	29,0	33,1	14,4	0,99	54450	69
4										
5	4,77	13,9	41,1	86,1	29,1	33,8	13,0	1,50	71550	102
6	4,81	14,6	42,9	89,1	30,3	34,0	14,0	1,61	77441	20
7	4,71	14,8	42,4	90,0	31,4	34,9	12,5	1,75	82425	85
8	4,71	14,2	42,9	91,0	30,1	33,1	12,9	1,15	54165	255
9	4,86	15,0	44,0	90,5	30,8	34,0	12,6	0,74	35964	194
10	5,06	15,4	45,0	88,9	30,4	34,2	12,5	0,98	49588	175
11	5,09	15,2	44,5	87,4	29,8	34,1	13,0	1,15	58535	69
12	5,57	16,5	48,6	87,2	29,6	33,9	13,3	1,47	81879	39
13	5,01	14,3	43,3	86,4	28,5	33,0	13,6	1,12	56112	64

**ANEXO IX – SUBMISSÃO DE ARTIGO – ESTUDO 1****De:** RBME [mailto:rbme@rbme.org.br]**Enviada em:** segunda-feira, 21 de maio de 2007 14:50**Para:** Álvaro**Assunto:** RBME - Confirmação do recebimento de artigo

Prezado(a) Autor(a):

Comunicamos o recebimento do artigo de sua autoria intitulado "EFEITO DO EXERCÍCIO DE ULTRA-RESISTÊNCIA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO", código 102/2007, para publicação na Revista Brasileira de Medicina do Esporte. O referido artigo foi enviado para o processo de revisão pelos pares (peer-review) e solicitamos a sua atenção para os comentários dos revisores que lhe serão enviados oportunamente.

Informações de acesso como autor(a) :

. Login: aroliveira@esef.ufrgs.br

. URL: <http://www.rbme.org.br>

Agradecemos a importante colaboração que seu artigo traz à RBME e lembramos que é fundamental a máxima agilidade na resposta aos revisores, para minimizar o período entre a submissão e a publicação do seu artigo.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio Lucas da Nobrega', written in a cursive style.

Prof. Dr. Antonio Claudio Lucas da Nóbrega

Editor Chefe



## ANEXO X –ANÁLISE ESTATÍSTICA DO EFEITO *CARRYOVER*

Tabela 1 – Resultado da análise estatística do efeito *carryover* sobre os parâmetros de estresse oxidativo em 13 triatletas.

Variável	<i>Carryover</i>	Ef Sequência	Ef Tratamento	Ef Período
CAT 1 e 2	0,1333	0,1198	0,1394	0,3987
GPx 1 e 2	0,2807	0,2222	0,5548	0,7208
SOD 1 e 2	0,4645	0,4641	0,2873	0,0000*
Carbonilas 1 e 2	0,7309	0,7871	0,2957	0,0000*
TBA 1 e 2	0,1276	0,167	0,2846	0,0082*
TRAP 1 e 2	0,5059	0,5608	0,2454	0,0018*
Ác.Úrico 1 e 2	0,9416	0,9575	0,9885	0,0082*
Fenólicos 1 e 2	0,0985	0,1231	0,8034	0,313
Sulfidril 1 e 2	0,6688	0,7313	0,7132	0,0000*
CAT 3 e 4	0,6618	0,6857	0,8784	0,7761
GPx 3 e 4	0,045*	0,077	0,3522	0,0022*
SOD 3 e 4	0,5785	0,5089	0,5999	0,0173*
Carbonilas 3 e 4	0,4683	0,4761	0,5782	0,0002*
TBA 3 e 4	0,617	0,6356	0,9115	0,9043
TRAP 3 e 4	0,8716	0,8877	0,5869	0,5741
Ác.Úrico 3 e 4	0,8703	0,9027	0,074	0,2594
Fenólicos 3 e 4	0,6038	0,6841	0,2759	0,0052*
Sulfidril 3 e 4	0,9494	0,9518	0,6088	0,0155*
delta CAT	0,2545	0,3165	0,3054	0,6858
delta SOD	0,2676	0,3305	0,7216	0,0016*
delta GPx	0,2801	0,2028	0,8565	0,0586
delta Carbonilas	0,3282	0,3528	0,978	0,0000*
delta TBA	0,3868	0,427	0,45	0,0257*
delta TRAP	0,2403	0,253	0,7424	0,0117*
delta ác.úrico	0,1166	0,1355	0,1292	0,4072
delta fenólicos	0,5294	0,5846	0,2626	0,0029*
delta sulfidril	0,6399	0,6526	0,5699	0,0017*

Os números 1 e 2 referem-se aos momentos antes (1) e depois (2) do primeiro momento da intervenção dietética onde metade dos indivíduos fez a dieta controle e metade a dieta antioxidante. Os números 3 (antes) e 4 (depois) correspondem aos momentos após o cruzamento (*crossover*) da amostra.

\*  $p < 0,05$  indica que houve efeito do período e os dados não podem ser agrupados.

**ANEXO XI – SUBMISSÃO DE ARTIGO - ESTUDO 2**

Elsevier Editorial System(tm) for Clinical Nutrition

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: DIETARY MANIPULATION AND ANTIOXIDANT SUPPLEMENTATION IN OXIDATIVE STRESS IN TRIATHLETES

Article Type: Full Length Article

Section/Category:

Keywords: Diet; Supplementation; Antioxidant vitamins; Oxidative stress; Athletes.

Corresponding Author: Dr. Alvaro Reischak Oliveira, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Cláudia D Schneider, M.S.

Order of Authors: Cláudia D Schneider, M.S.; Georgia F Becker, B.S.; Ricardo F Rocha, B.S.; José Cláudio F Moreira, Ph.D.; Adriane Belló-Klein, Ph.D.; Alvaro Reischak Oliveira, Ph.D.