

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Erika Lima Rodrigues

O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINAS  
ANTIOXIDANTES NO EQUILÍBRIO PRÓ E ANTIOXIDANTE DE  
RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO DE NATAÇÃO A 80%  
DA CARGA MÁXIMA

São José dos Campos - SP  
2005

**Erika Lima Rodrigues**

**O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINAS  
ANTIOXIDANTES NO EQUILÍBRIO PRÓ E ANTIOXIDANTE DE  
RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO DE NATAÇÃO A 80%  
DA CARGA MÁXIMA**

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos Créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Aléxis Lazo Osorio

São José dos Campos - SP  
2005

R612e

Rodrigues, Érika Lima de  
O Efeito da Suplementação de Vitaminas Antioxidantes no  
Equilíbrio Pró e Antioxidante de Ratos Submetidos ao  
Treinamento de Natação a 80% da Carga Máxima /Érika Lima  
Rodrigues. São José dos Campos: UniVap, 2005.  
92 f.: il. ;30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e  
Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2005.

1. Estresse Oxidativo 2. Condicionamento físico animal  
3. Vitaminas 4. Natação 5. Antioxidantes I. Osorio, Rodrigo Aléxis  
Lazo, Orient. II. Título

CDU:612.015.6

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total  
ou parcial desta Dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:  \_\_\_\_\_

São José dos Campos, 04 de março de 2005.

**“O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES NO EQUILÍBRIO PRÓ E ANTIOXIDANTE DE RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO DE NATAÇÃO A 80% DE CARGA MÁXIMA”**

Érika Lima Rodrigues

Banca Examinadora:

Prof. Dr. JOSÉ CARLOS COGO (UNIVAP)

Prof. Dr. RODRIGO ALEXIS LAZO OSORIO (UNIVAP)

Prof. Dr. JÚLIO ORLANDO TIRAPEGUI TOLEDO (USP)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D - UniVap  
São José dos Campos, 04 de março de 2005.

## **DEDICATÓRIA**

“Dedico este trabalho aos meus pais Rilza Maria Macedo Lima Rodrigues e Antonio Luiz Manfioli Rodrigues e aos meus irmãos Estevão Lima Rodrigues e Ícaro Lima Rodrigues, pelo imenso amor, confiança, e total apoio, indispensáveis para a concretização de mais uma etapa da minha vida.”

“ Onde há uma vontade forte não pode haver grandes dificuldades”

Maquiavel (1469-1527) Pensador Italiano

## AGRADECIMENTOS

À minha Família

Ao Prof. Dr. Rodrigo Aléxis Lazo Osório, pela orientação e incentivo.

À amiga Andréa Dellú Franco pelo grande apoio técnico em todas as etapas desse trabalho e pela grande amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio pesquisa.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do IP&DII que colaboraram diretamente para a realização desse estudo: Luciano Ramos, Gustavo Pinelli, Carly Faria Coelho, Maria Roberta, Tatiana, Karina Bortolin, Rafaela França.

Ao Prof. Dr. Ivan da Cruz Piçarro do departamento de fisiologias da UNIFESP, pelo empréstimo do material utilizado no treinamento.

À Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Vânia D´Almeida e seus orientandos, Fernanda Souza, Karen, Adelmo, Paulo, Bruno e todos do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UNIFESP que nos receberam com grande carinho e atenção e nos ensinaram todas as técnicas utilizadas na dosagem do estresse oxidativo;

Ao Prof<sup>o</sup>.Dr. Wellington Ribeiro e Prof<sup>o</sup>.Dr. José Carlos Cogo pela confiança e livre acesso ao laboratório.

Aos professores: Prof. Dr<sup>a</sup>. Cristina Pacheco e Prof. Dr. Newton Soares do Laboratório de Cultura de Células; Prof. Dr. Marcelo Pelisson e Prof. Dr. Milton Beltrame do Laboratório de Química; Prof. Dr. Francisco Nóbrega e Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Marina Nóbrega do Laboratório de Genoma; Prof. Dr. Luis Vicente Franco; Prof. Dr. Daniel Acosta; Prof. Dr. Paulo Renato e Prof. Mcs. Flávio Aimbire do Laboratório de Experimentação Animal.

As pessoas que fizeram parte da minha vida nesse período e contribuíram direta ou indiretamente: Maria Roberta Veneziani, Lilian, Renato Gomes de Magalhães, André Rodrigues Esteves e Linda Esteves, pela amizade, incentivo e apoio;

Funcionários do IP&D, Dona Ivone, Anderson, Ricardo, Cláudio, Márcio, Cláudia;

Todas as bibliotecárias da UNIVAP;

Todos os Professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas.

## RESUMO

A elevada formação das espécies reativas do oxigênio (EROs) em decorrência de um maior consumo de oxigênio, assim como a ativação das vias metabólicas específicas durante ou após o exercício de alta intensidade e/ou longa duração, está relacionado a uma opressão do sistema de defesa antioxidante, onde prevalece a formação de oxidantes aos antioxidantes. O consumo dietético de vitaminas antioxidantes, nessas condições, favorece a potencialização da defesa celular antioxidante endógena, reduzindo o risco de dano tecidual e doenças associadas. O objetivo desse estudo consistiu em avaliar os efeitos da suplementação isolada de vitamina C e  $\alpha$ -tocoferol, e da mistura vitamínica (vitamina C,  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno), nas variáveis relacionadas ao equilíbrio pró e antioxidante do sistema biológico de ratos *Wistar*, através de análises bioquímicas, após 17 semanas de treinamento de natação a 80 % da carga máxima, 5 vezes/semana, 30 minutos/dia. Foram analisados o malondialdeído (MDA) plasmático, as concentrações eritrocitárias das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT), as concentrações plasmáticas das vitaminas antioxidantes, além dos níveis séricos da creatina quinase (CK) e da lactato desidrogenase (LDH) como marcadores de lesão muscular. As vitaminas C e E isoladas, apresentaram um efeito protetor contra a peroxidação lipídica comparado ao grupo que consumiu a mistura vitamínica. A mistura vitamínica seguida da vitamina E foram mais eficientes na proteção contra o estresse oxidativo em relação as enzimas antioxidantes, enquanto que a vitamina C isolada não teve o mesmo efeito. A vitamina E significativamente diminuiu os níveis séricos da CK sugerindo um efeito protetor, principalmente, contra lesão muscular, comparado ao grupo controle treinado.

Palavras Chaves: Estresse Oxidativo; Exercício de Alta Intensidade e Vitaminas Antioxidantes

## ABSTRACT

This high formation of reactive oxygen species (ROS) due a bigger oxigen consumption and the activation of specific metabolic ways during and after exercise of high intensity and long duration, has been related to oppression of the antioxidant system, where oxidant formation prevail over antioxidants. The consumption of antioxidants dietetic vitamins on this condition will benefit better antioxidant endogen cell-defense reducing the risk of damaging muscle tissue and association sickness. The object of this studies is to value the effects of an isolated supplementation of vitamin C and a -tocoferol, and the mixture between vitamin C,  $\alpha$ -tocoferol and  $\beta$ -carotene, and those related to the balance pro and antioxidant to the *Wistar* rats biologic system. Through the biochemical analyses, after 17 weeks of swimming training 80 % of maximum load, 5 days/week, 30 minutes/day of malondialdehyde (MDA) plasmatic concentration was analyzed as well as erythrocyte superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT) and plasmatic concentration of antioxidant vitamin, even the seric level of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) with muscle damage indicators were analyzed . The isolated vitamins C and E had shown an effect of protection against peroxidation lipidic compared with another group which had consumed a mixture vitamin. The mixture vitamin followed by vitamin E was more efficient protecting against stress oxidative than enzymes antioxidants, whereas isolated vitamin C did not have the same effect. The vitamin E significantly reduced the seric levels from CK suggesting a protective effects, mainly against muscle damage compared to the group trained control.

Key Words: Oxidative Stress, High Intensity of Exercise, Vitamins Antioxidants

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de Formação da Peroxidação (Alessio, 2000).....	7
Figura 2 – Reação de Fenton (JI, 1995).....	14
Figura 3 – Reação de Haber-Weiss (JI, 1995).....	14

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Evolução do peso corporal dos ratos durante o período de 17 semanas de treinamento.....	36
Tabela 2 – Evolução das porcentagens de cargas máximas atingidas durante o experimento nos 4 testes individuais de carga máxima.....	37
Tabela 3 – Estrutura cardíaca dos ratos obtidas a partir da análise do coração.....	38
Tabela 4 - Níveis Plasmáticos do MDA após três dias da última sessão de treinamento.....	40
Tabela 5 - Concentrações eritrocitárias das enzimas antioxidantes no repouso do grupo sedentário e dos grupos submetidos ao treinamento e suplementados com vitaminas antioxidantes.....	41
Tabela 6 - Concentrações plasmáticas das vitaminas antioxidantes.....	44
Tabela 7 - Concentrações séricas da CK e da LDH após três dias da última sessão de treinamento.....	44

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Peso cardíaco relativo obtido a partir do peso total do coração pelo peso corporal.....	38
Gráfico 2 – Comparação entre os grupos dos índices dos pesos ventriculares esquerdo.	39
Gráfico 3 – Comparação entre os grupos dos índices dos pesos ventriculares direito.....	39
Gráfico 4 – Concentração plasmática em repouso do MDA entre os grupos.....	40
Gráfico 5 - Concentração eritrocitária em repouso da SOD entre os grupos.....	42
Gráfico 6 – Concentração eritrocitária da GPX no repouso.....	42
Gráfico 7 – Concentração eritrocitária no repouso da CAT.....	43
Gráfico 8 – Concentrações da CK sérica no repouso.....	45
Gráfico 9 – Concentrações da LDH sérica no repouso.....	45

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$ : Oxigênio Singlete

8-OhdG: 8-dihydroxideoxiguanosina

AI: Ingestão Adequada

ALT: Alanina Aminotransferase

ATP: Adenosina Trifosfato

$\text{Ca}^{2+}$ : Íon Metal Cálcio

CAT: Catalase

CK: Creatina Quinase

$\text{Cu}^{2+}$ : Íon Metal Cobre

CuZn-SOD: SOD zinco-cobre

ADN: Ácido Desoxirribonucléico

DRI: Ingestão Dietética de Referência

EC-SOD: SOD cobre-zinco

EROs : Espécies Reativas de Oxigênio

$\text{Fe}^{3+}$ : Íon Metal Ferro

GPX: Glutathione Peroxidase

GSH: Glutathione Reduzida

GSSG: Glutathione Oxidada

$\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de Hidrogênio

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance

LDH: Lactato Desidrogenase

MDA: Malondialdeído

Mg: miligramas

mM: milimolar

mmol/l: milimol/litro

Mn-SOD: SOD manganês

NADH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo

NM: Nanômetro

nmol/g: nanomol/mililitro

O<sub>2</sub> : Oxigênio

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Ânion Superóxido

OH: Radical Hidroxil

PUFA: Ácidos Graxos Poliinsaturados

RDA: Recomendações de Doses ou Cotas Alimentares

ARN: Ácido Ribonucléico

SDA: Semidehidroascorbato

SOD: Superóxido Dismutase

TBARS: Ácido Tiobarbitúrico

TGP: Glutamato-Piruvato Transaminase

UI: Unidades Internacionais

VO<sub>2</sub> max : Consumo Máximo de Oxigênio

μl : Microlitros

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	3
2.1 Estresse Oxidativo .....	4
2.1.1 Formação das Espécies Reativas do Oxigênio (EROs).....	4
2.1.2 Peroxidação Lipídica.....	5
2.2 Sistema de Defesa Antioxidante Enzimático e Não Enzimático.....	8
2.2.1 Enzimas Antioxidantes.....	9
2.2.2 Vitaminas Antioxidantes.....	10
2.2.2.1 Carotenóides.....	10
2.2.2.2 Vitamina E.....	11
2.2.2.3 Vitamina C (Ácido Ascórbico).....	13
2.3 Adaptações ao Treinamento Submáximo <i>vs</i> Estresse Oxidativo.....	15
2.4 Suplementação Nutricional com Vitaminas Antioxidantes no Exercício Submáximo.....	17
2.5 Relevância e Aplicabilidade.....	19
3. Objetivo.....	21
4. Material e Métodos.....	23
4.1 Condições Ambientais.....	24
4.2 Animais.....	24
4.3 Adaptação à Natação.....	24
4.4 Grupos Experimentais.....	25
4.4.1 Observações.....	26
4.5 Determinação da Carga Máxima para o Treinamento.....	26
4.5.1 Protocolo para Obtenção da Carga Máxima e Reajuste a 80%.....	26
4.6 Treinamento Físico.....	27
4.7 Controle do Peso Corporal.....	28
4.8 Observação dos Animais.....	28
4.9 Sacrifício.....	28

4.10	Análises Bioquímicas.....	29
4.10.1	Peroxidação Lipídica.....	29
4.10.2	Superóxido Dismutase (SOD).....	30
4.10.3	Glutathione Peroxidase (GPX) .....	30
4.10.4	Catalase (CAT).....	30
4.10.5	Concentrações Plasmáticas de Vitaminas Antioxidantes.....	30
4.10.6	Creatina Quinase (CK).....	31
4.10.7	Lactato Desidrogenase (LDH).....	31
4.11	Considerações Metodológicas.....	31
4.12	Análise da Estrutura Cardíaca.....	32
4.13	Análise Estatística .....	32
5.	Resultados.....	34
5.1	Caracterização do Treinamento.....	35
5.1.1	Evolução do Peso Corpóreo e Comparação entre os Grupos Estudados...	35
5.1.2	Evolução das Porcentagens (%) de Carga máxima Atingidas Durante o Teste Individual.....	36
5.1.3	-Análise da Estrutura Cardíaca .....	37
5.1.3.1	Peso Cardíaco Relativo (PCR).....	38
5.1.3.2	Índice do Peso Ventricular Esquerdo.....	39
5.1.3.3	Índice do Peso Ventricular Direito.....	39
5.2	Análises Bioquímicas.....	40
5.2.1	Biomarcador de Peroxidação Lipídica.....	40
5.2.1.1	Malondialdeído Plasmático (MDA).....	40
5.2.2	Atividade das Enzimas Antioxidantes nos Eritrócitos.....	41
5.2.2.1	Superóxido Dismutase (SOD).....	41
5.2.2.2	Glutathione Peroxidase (GPX).....	42
5.2.2.3	Catalase (CAT).....	43
5.2.3	Concentrações Plasmáticas das Vitaminas Antioxidantes.....	43
5.2.4	Indicadores de Lesão Tecidual.....	44
5.2.4.1	Creatina Kinase (CK).....	45
5.2.4.2	Lactato Desidrogenase (LDH).....	45
6.	Discussão.....	46

6.1 Caracterização e Adaptações ao Treinamento Físico de Natação a 80% da Carga Máxima.....	47
6.2 Biomarcador de Peroxidação Lipídica - Concentrações Plasmáticas de Malondialdeído (MDA).....	49
6.3 Atividade das Enzimas Antioxidantes nos Eritrócitos.....	53
6.4 Concentrações Plasmáticas das Vitaminas Antioxidantes.....	59
6.5 Indicadores de Lesão Tecidual.....	62
6.5.1 Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH).....	62
7. Conclusão.....	65
Referências Bibliográficas.....	67
Anexos .....	89
Anexo A .....	90
Anexo B .....	92

## **1 – INTRODUÇÃO**

## 1 - Introdução

---

Um aumento na formação das espécies reativas do oxigênio (EROs) em decorrência de um maior consumo de oxigênio, assim como a ativação das vias metabólicas específicas durante ou após o exercício, está relacionado a um grande número de doenças como enfisema pulmonar, doenças inflamatórias, aterosclerose, câncer, além do envelhecimento (SCHNEIDEDER; OLIVEIRA, 2004).

Os exercícios de alta intensidade e/ou de longa duração, podem elevar a produção das EROs oprimindo a defesa antioxidante (BOWLES *et al.*, 1991), incorrendo, assim, no chamado estresse oxidativo, onde prevalece a formação dos oxidantes aos antioxidantes (GRANDRA *et al.*, 2004; SCHNEIDEDER; OLIVEIRA, 2004).

As EROs são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos metabólicos normais, porém, sua atividade oxidante é limitada por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, além de outras proteínas e enzimas (AMAYA-FARFAN; DOMENE; PADOVANI, 2001; SEN, 2001; GRANDRA *et al.*, 2004). Os níveis celulares de antioxidantes são influenciados por numerosos fatores fisiológicos, patológicos e nutricionais (HARRIS, 1992).

As vitaminas C, E e os carotenóides são compostos orgânicos disponíveis em grandes quantidades nos alimentos vegetais, especialmente nas frutas (LOPACZYNSKI; ZEISEL, 2001), e são caracterizados como substâncias altamente reativas e facilmente oxidáveis. Em quantidades fisiológicas podem funcionar como parte do sistema de defesa antioxidante não enzimático do organismo humano (SILVA; NAVES, 2001).

Em atletas o consumo dietético desses nutrientes está relacionado ao importante papel na manutenção das concentrações plasmáticas dos antioxidantes em concentrações consideradas normais, e na proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico (GROUSSARD *et al.*, 2003).

## **2- REVISÃO DA LITERATURA**

## 2 - Revisão de Literatura

---

### 2.1 Estresse Oxidativo

---

#### 2.1.1 Formação das Espécies Reativas do Oxigênio (EROs)

A produção das EROs é parte do processo metabólico normal de todos os seres vivos aeróbios, e como benefícios fisiológicos, participam da síntese de componentes biologicamente essenciais para a regulação das funções celulares, tais como sinalização intracelular, transcrição ativação, proliferação celular, inflamação e apoptose (ELSAYED, 2001; LACHANCE; NAKAT; JEONG, 2001; MARLIN *et al.*, 2002).

As EROs são definidas como sendo uma espécie química independente que contém um ou mais elétrons não pareados em sua última órbita (HILL; BURK; LANE, 1987; LITTLE; GLADEN, 1999; MEHTA; LI; MEHTA, 1999; LACHANCE; NAKAT; JEONG, 2001; MARLIN *et al.*, 2002). A presença de um elétron não pareado tende a produzir uma grande reatividade, levando à interação com numerosas moléculas do organismo e, podendo, conseqüentemente, promover inúmeros danos aos sistemas biológicos e praticamente a todos os componentes celulares, incluindo proteínas, ácido nucléicos e lipídios (WITT *et al.*, 1992; MARLIN *et al.*, 2002). Com uma maior frequência, proteínas e DNA são inicialmente atingidos, seguidos da peroxidação lipídica que ocorre mais tardiamente nos processos lesivos (EVANS, 2000; SELMAN *et al.*, 2002).

Sob circunstâncias fisiológicas, a produção das EROs no organismo ocorre via escape de elétrons da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e microssomal, células fagocíticas e sistema enzimático endógeno, como nicotinamidas adenina dinucleotídeo fosfatase oxidase, xantina oxidase, monoamina oxidase e citocromo P-450 oxidase peroxisomal (LACHANCE; NAKAT; JEONG, 2001). Além disso, já está bem documentado que as EROs podem estar relacionadas ao desenvolvimento de doenças como diabetes, doenças cardíacas, câncer, e o envelhecimento (MARLIN *et al.*, 2002). O exercício físico, também, está associado a um aumento na produção das EROs (JI, 1995; JENSKINS, 1993) por diversos fatores que serão descritos adiante.

Quando analisamos mais especificamente o aumento do consumo de oxigênio, como ocorre no exercício, podemos considerar que a maior parte é utilizado na mitocôndria para a formação de ATP através da fosforilação oxidativa, e reduzido posteriormente à água. Entretanto, uma pequena fração desse oxigênio (2 a 5%) é convertida a radicais intermediários, tais como, ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) que podem ser produzidos univalentemente e escoar para fora da cadeia transportadora de elétrons (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979; GOLDFARB, 1999; LOPACZYNSKI; ZEISEL, 2001; SACHECK; BLUMBERG, 2001; BANERJEE *et al.*, 2003).

O  $O_2^-$  e a  $OH^\cdot$  são radicais livres por definição, por conterem um elétron não pareado na sua estrutura atômica. As demais são consideradas espécies intermediárias, que por mecanismos de reações diferentes, originam os radicais. Mas de modo geral, são todos classificados como espécies reativas do oxigênio (BANERJEE *et al.*, 2003).

No músculo esquelético, a alta demanda de oxigênio decorrente do exercício físico ocasiona em uma elevada formação das EROs (GOLDFARB, 1999). É estimado que para cada vinte e cinco moléculas de oxigênio reduzidas pela respiração normal, um radical livre é produzido. Durante o exercício essa taxa de consumo pode aumentar de dez a quinze vezes em todo o corpo e cerca de cem vezes no músculo em atividade (BANERJEE *et al.*, 2003). Hammeren *et al.*, (1993) demonstraram que o aumento das EROs associado ao exercício agudo *in vivo* ou *in vitro* coincide com a lesão tecidual oxidativa.

### **2.1.2 Peroxidação Lipídica**

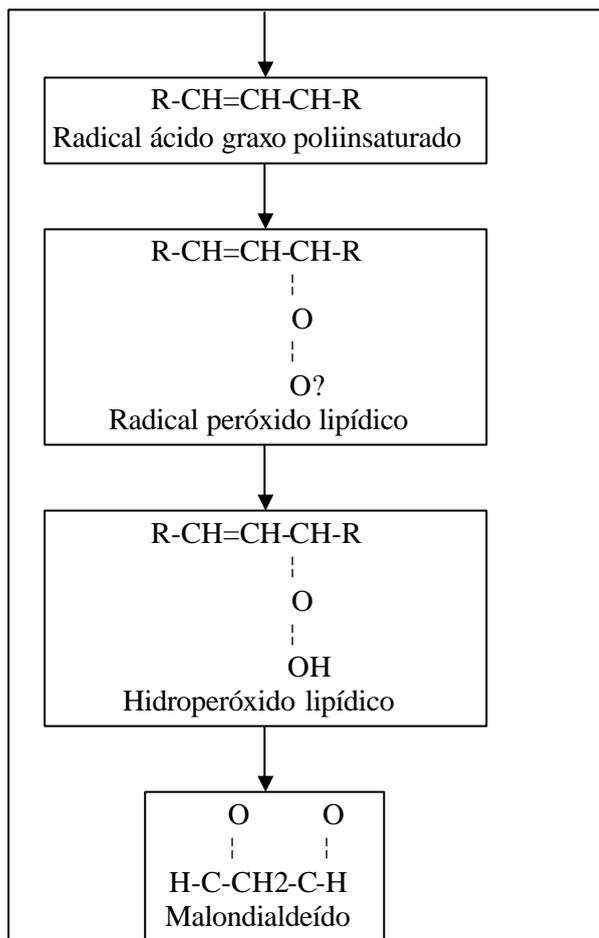
A peroxidação lipídica é um processo fisiológico que ocorre em baixas concentrações em todos os seres humanos (LITTLE; GLADEN, 1999). É definida como a deterioração oxidativa dos componentes celulares, principalmente, dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), incorrendo na formação das EROs, que podem ser tóxicas e ocasionar danos a outros componentes celulares (STARNES *et al.*, 1989; DIPLOCK, 1991; IBRAIN *et al.*, 1997; JACKSON, 1999).

Na literatura, os dados indicam uma elevação da peroxidação lipídica durante o exercício físico moderado a extremo, em vários tecidos, como músculo esquelético e cardíaco, fígado, cérebro e eritrócitos (VENDITTI; MEO, 1997).

Os indicadores de peroxidação lipídica incluem o pentano expirado, malondialdeído (MDA), hidroperóxidos lipídicos, isoprostanos e dienos conjugados. Os gases hidrocarbonos (etano e pentano) são formados a partir da oxidação dos ácidos graxos (WITT *et al.*, 1992; URSO; CLARKSON, 2003).

O MDA é o aldeído mais, freqüentemente, utilizado como marcador do estresse oxidativo em reposta ao exercício, pois em condições ácidas e de calor, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (HALLIWELL; CHIRICO, 1993; HUANG *et al.*, 2002). Esse método funciona bem quando aplicado em sistemas de membranas definidos, como os microsossomos *in vitro* (HALLIWELL; CHIRICO, 1993), mas também reage com aldeídos saturados, não saturados não funcionais, carboidratos e prostaglandinas (ALESSIO, 2000).

A Figura 1 representa a cadeia de reações químicas que levam a formação do MDA, mensurado através do HPLC (cromatografia líquida de alta performance), espectrofotômetro, ou espectrofluorescência (HALLIWELL; CHIRICO, 1993; HAN *et al.*, 2000).



**Figura 1** Processo de formação da peroxidação lipídica (Alessio, 2000).

Os dados na literatura sugerem que as vitaminas antioxidantes como a vitamina C, a vitamina E, e o  $\beta$ -caroteno atuam na prevenção ou atenuação da peroxidação lipídica. *In vitro*, a vitamina C mostrou atuar na proteção das biomembranas à lesão oxidativa na fase aquosa (HUANG *et al.*, 2002), e a suplementação com vitamina E elevar os níveis hepáticos de  $\alpha$ -tocoferol, capaz de proteger tanto os compostos solúveis em óleo, como os solúveis em água (IBRAIN *et al.*, 1997).

Em animais, o alto consumo da vitamina C mostrou aumentar a concentração da vitamina E nos tecidos, sugerindo um efeito potencializador da vitamina C na ação antioxidante da vitamina E pela redução do tocoferil radical. Com humanos, há poucos relatos de que isso aconteça (HUANG *et al.*, 2002).

Segundo Ibrain *et al.* (1997), camundongos que ingeriram vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e óleo de peixe (altamente susceptível a oxidação), comparados ao grupo

controle que só consumiu o óleo de peixe, apresentaram um significativo efeito protetor, ao reduzir os níveis hepáticos de TBARS e dienos conjugados, em relação ao grupo não suplementado.

Embora haja adaptação significativa dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos ao treinamento e ao exercício agudo, o consumo em quantidades adequadas de vitamina E é necessário para a manutenção da integridade da membrana celular durante o exercício. No estudo realizado por Sacheck e Blumberg (2001), a deficiência de vitamina E aumentou a lesão tecidual por radicais livres no pós-exercício, confirmando o potente efeito neutralizador a radicais peróxidos e inibitório a peroxidação lipídica desse nutriente (METIN *et al.*, 2002).

Meydani *et al.*, (1993), verificaram que 800 UI/dia de vitamina E, por 48 dias, aumentou, significativamente, a concentração de a-tocoferol no músculo esquelético, diminuindo a lesão oxidativa após o exercício excêntrico. Esse resultado foi indicado por uma menor excreção urinária de TBARS, por proteção do ácido graxo poliinsaturado, e por uma diminuída síntese de dienos conjugados no músculo.

A intensidade e a duração do exercício, bem como, o nível treinamento dos indivíduos, são fatores que também influenciam no aparecimento dos produtos da peroxidação lipídica. Sumida *et al.*, (1989), mostraram que a diminuição na peroxidação lipídica plasmática ocorreu com exercícios a 40 e 70% do VO<sub>2</sub> max e aumentou a 100% (SUMIDA *et al.*, 1989 *apud* WITT *et al.*, 1992).

## **2.2 Sistema de Defesa Antioxidante Enzimático e Não Enzimático**

---

Antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos são as duas maiores categorias de substâncias que podem prevenir a formação das EROs, seqüestrar as espécies radicais e convertê-las a uma menor atividade molecular, além de auxiliarem na reparação da lesão iniciada por esses radicais livres (GOLDFARB,1999).

O organismo humano conta com um eficiente sistema antioxidativo constituído pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutational peroxidase (GPX), e pelos antioxidantes não enzimáticos glutational (GSH), ubiquinona,

flavanóides, ácido úrico e as vitaminas C ou ácido ascórbico, a vitamina E, o  $\beta$ -caroteno, entre outros. O estresse oxidativo pode ser avaliado a partir das mudanças na atividade enzimática antioxidante nos eritrócitos (URSO; CLARKSON, 2003).

Cada um desses sistemas de defesa desempenha um papel único ou complementa funções de outros sistemas. Mas de modo geral, as vitaminas antioxidantes estão envolvidas diretamente com as EROs (YU, 1994; MARLIN *et al.*, 2002), a GSH e outras fontes de tióis desempenham papel importante na manutenção do estado de oxi-redução celular (redox), e as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX, além de catalisarem a redução de um elétron das EROs (CHANCE; SARONIO; LEIGH, 1975), auxiliam outras enzimas envolvidas no poder de redução, como a glutatona redutase (GR) e a glicose-6-fosfato-desidrogenase (VENDITTI; MEO, 1997).

### **2.2.1 Enzimas Antioxidantes**

A SOD tem como função principal converter o ânion superóxido a oxigênio e a peróxido de hidrogênio, sendo considerada uma importantes enzima no sistema de defesa antioxidante (POWERS; LENNON, 1999; NAKAO *et al.*, 2000; LOPACZYNSKI; ZEISEL, 2001). O aumento na atividade enzimática da SOD está relacionado à resistência intensificada ao estresse oxidativo (FIELDING; MEYDANI, 1997).

Foram identificados três tipos de isoenzimas SOD em mamíferos, caracterizadas pelos íons metais protéticos e sua localização celular. São elas, a SOD zinco-cobre (CuZn-SOD) encontrada predominantemente no citoplasma, em altas concentrações nos eritrócitos e fígado; a SOD manganês (Mn-SOD) localizada na mitocôndria, principalmente no coração, rim e fígado; e a SOD cobre-zinco extracelular (EC-SOD) predominante no espaço extracelular, em altas concentrações no tecido pulmonar e no rim (NAKAO *et al.*, 2000).

A GSH é o principal tiol não protéico intracelular e outro importante sistema enzimático antioxidante, utilizado para mensurar o estresse oxidativo (URSO; CLARKSON, 2003). Constituí um ciclo redox, onde participam duas enzimas cruciais, a GPX e a GR (JI; FU; MITCHELL, 1992; LEEUWENBURGH; JI, 1998; SACHECK; BLUMBERG, 2001; METIN *et al.*, 2002).

Dentro da sua função normal, no sistema de defesa antioxidante, a GPX utiliza a glutathiona reduzida (GSH) como substrato para neutralizar o  $H_2O_2$ . Nessa etapa, a GSSG (glutathiona oxidada) é necessária para a conversão do  $H_2O_2$  em GSH, a qual também contribuirá para a eliminação do  $H_2O_2$  (URSO; CLARKSON, 2003).

A GPX é encontrada tanto na mitocôndria quanto no citosol, atuando como um importante protetor celular contra as EROs (POWERS; LENNON, 1999). No exercício sua ativação é decorrente do aumento no consumo de oxigênio, agindo na remoção do  $H_2O_2$  e dos hidroperóxidos orgânicos da célula (WITT *et al.*, 1992; TIDUS; PUSHKARENKO; HOUSTON, 1996). Os estudos têm mostrado que os níveis de GPX e GSSG no plasma ou sangue podem sofrer desequilíbrio por um único episódio de exercício, tanto em ratos, quanto em seres humanos (JI; FU; MITCHELL, 1992).

O terceiro mecanismo redutor do organismo é realizado pela enzima CAT, que atua na decomposição celular do  $H_2O_2$  para formar água e oxigênio. Essa enzima antioxidante é largamente distribuída na célula, com maior atividade nas mitocôndrias e peroxisossomos (POWERS; LENNON, 1999).

## **2.2.2 Vitaminas Antioxidantes**

O consumo dietético de vitaminas antioxidantes e minerais, em condições de elevada formação das EROs, como no exercício físico, favorece a potencialização do sistema de defesa celular antioxidante endógeno, reduzindo assim, o risco de dano tecidual e doenças associadas (CHAO *et al.*, 1999).

### **2.2.2.1 Carotenóides**

Os carotenóides, quanto a estrutura química, dividem-se em dois grupos, os hidrocarbonetos compostos de carotenos ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -carotenos), e derivados oxigenados compostos de xantofilas ou oxicarotenóides (PENTEADO, 2003).

O termo pró-vitamina A é usado como um indicador genérico a todos os carotenóides que tem atividade biológica da vitamina A (PENTEADO, 2003). Carotenóides são substâncias de coloração amarela, laranja e vermelha, encontrados em muitos alimentos vegetais (BITTENCOURT, 2002).

O  $\beta$ -caroteno é o principal carotenóide precursor da vitamina A. Sua função antioxidante é melhor definida por sua capacidade em doar elétrons ao oxigênio singlete, inativando-o, além de participar de outras reações que envolvem as EROs (GROUSSARD *et al.*, 2003). Esse carotenóide causa efeito inibitório na peroxidação lipídica, protegendo os lipídeos teciduais contra radicais livres de oxigênio ou carbono centrado e, também atua em sinergismo com a vitamina E (JI, 1995; SIGNORINI; SIGNORINI, 1993; CORREIA, 2001; PENTEADO, 2003). Além disso, são incorporados em membranas e organelas celulares expostas a baixas pressões parciais de oxigênio, ligando-se a radicais peróxidos, interrompendo a cadeia de oxidação (PENTEADO, 2003).

Alimentos como cenoura, couve, espinafre, pimentão vermelho, tomate e o brócolis são fontes importantes de  $\beta$ -caroteno (BITTENCOURT, 2002).

Ao contrário da vitamina A, os carotenóides ingeridos em grandes quantidades (acima de 30 mg/dia) geralmente não são tóxicos e não causam hipervitaminose A. A razão para isso, é que a eficiência de sua absorção intestinal cai rapidamente conforme a dosagem aumenta, o que leva a uma lenta conversão em vitamina A, não produzindo efeito tóxico. Indivíduos que ingerem muita quantidade de carotenóides podem desenvolver hipercarotenose, caracterizada por uma coloração amarelada da pele e uma alta concentração plasmática de carotenóides. Esses sintomas desaparecem quando o consumo é reduzido (PENTEADO, 2003).

A *Food and Nutrition Board* do Instituto Nacional de Medicina dos Estados Unidos, não emitiram a Ingestão Dietética de Referência (DRI) ou Ingestão Adequada (AI) para homens e mulheres adultos para o  $\beta$ -caroteno e outros carotenóides pró-vitamínicos A, por considerarem insuficiente e divergentes os dados consignados na literatura (AMAYA-FARFAN; DOMENE; PADOVANI, 2001).

### **2.2.2.2 Vitamina E**

Vitamina E é o termo genérico utilizado para designar oito compostos lipossolúveis naturais, sendo quatro derivados do tocol (tocoferóis), e quatro do tocotrienol (tocotrienóis), ambos apresentando-se em quatro formas diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ). Entre eles, o  $\alpha$ -tocoferol é a forma antioxidante mais ativa e mais amplamente

distribuída nos tecidos e no plasma (CORREIA, 2001; PENTEADO, 2003). Os tocoferóis, bem como os tocotrienóis se apresentam como um óleo viscoso, inodoro e amarelo-claro. São solúveis em óleos vegetais e solventes orgânicos como álcool, acetona, clorofórmio, éter e, praticamente insolúveis em água (PENTEADO, 2003).

As principais fontes desta vitamina são os óleos vegetais, e em menores quantidades, tecidos de plantas e alimentos de origem animal como ovos, leite e fígado (PENTEADO, 2003).

A vitamina E é considerada o antioxidante lipossolúvel mais importante nos tecidos, células vermelhas e plasma, principalmente nos tecidos que contém níveis elevados de ácidos graxos poliinsaturados, como as membranas celulares, particularmente mais susceptíveis à oxidação por radicais livres (IBRAIN *et al.*, 1996; CORREIA, 2001; GROUSSARD *et al.*, 2003; PENTEADO, 2003).

Embora presente em praticamente todas as membranas bipolares celulares, a maior porção de vitamina E no tecido está concentrada na membrana intermitocondrial, onde está localizado o sistema respiratório de transporte de elétrons. A sua concentração na membrana plasmática, em relação a milhares de moléculas de fosfolípidos, é pequena, apresentando uma quantidade relativamente constante (60-70 nmol/g) na maioria dos tecidos corpóreos, como fígado, coração, pulmão, tecido adiposo, e mais abundantemente, no tecido adiposo marrom (JI, 1995; EVANS, 2000).

Já no músculo esquelético, dependendo do tipo de fibra, a concentração é de 20-30 nmol/g. Essa diferença na quantidade de vitamina E entre os tecidos, provavelmente se deve ao número de mitocôndrias e o potencial oxidativo desses tecidos (JI, 1995; EVANS, 2000).

Apesar da pequena concentração nos tecidos, a vitamina E é muito estável e dificilmente é depletada de forma aguda. Após a doação de um elétron para uma espécie de radical livre, a mesma é convertida em vitamina E radical (oxidada) ou tocoferilquinona, podendo ser reduzida de volta à vitamina E, pelo ascorbato ou vitamina C, ou ainda pela GSH. Na ausência do ácido ascórbico, ou em quantidades insuficientes, a vitamina E oxidada fica estável e não-regenerável (JI, 1995).

A deficiência de vitamina E está intimamente relacionada a peroxidação lipídica. Evidências sugerem que animais alimentados com uma dieta deficiente em vitamina E apresentam uma perda da fluidez da membrana celular, redução de algumas

mitocôndrias, lesão muscular esquelética e aumento da incidência de cardiomiopatia (JI, 1995; SACHECK; BLUMBERG, 2001).

Em relação à toxicidade, a maioria dos estudos na literatura relata que indivíduos saudáveis que ingeriram doses acima da DRI não produziram efeitos colaterais, efeito teratogênico, de mutagenicidade ou carcinogênese. Porém, é sabido que doses muito acima das recomendações diárias, ou megadoses, podem desenvolver a síndrome da hipervitaminose E, com sintomas característicos de coagulopatia, hepatotoxicidade, fraqueza muscular, alterações da função reprodutora e distúrbios gastrintestinais (BOWRY; INGOLD; STOCKER, 1992; KEANEY *et al*, 1994; MEHTA; LI; MEHTA, 1999; PENTEADO, 2003).

A Recomendações de Doses ou Cotas Alimentares (RDA) para vitamina E para homens adultos e mulheres adultas é de 15 mg/dia (AMAYA-FARFAN; DOMENE; PADOVANI, 2001).

### **2.2.2.3 Vitamina C (Ácido Ascórbico)**

A vitamina C é o termo genérico empregado para descrever todos os compostos que apresentam quantitativamente a atividade biológica do ácido ascórbico. O ácido L-ascórbico é o principal composto natural com atividade da vitamina C. Essa vitamina tem característica hidrossolúvel, e é sintetizada por plantas e por quase todos os animais, com exceção de humanos, primatas, alguns roedores e pássaros, no qual devem adquiri-la por meio da dieta (PENTEADO, 2003).

Nas células, a vitamina C está presente no compartimento citosólico e no fluido extracelular, atuando em conjunto com a vitamina E, mais precisamente, à vitamina E radical, gerada na fase de membrana celular (JI, 1995; EVANS, 2000).

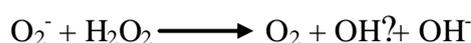
Além de atuar na regeneração do tocoferol, o ácido ascórbico é um potente antioxidante e neutralizador de radicais livres, como o radical hidroxil, e do oxigênio singlete (GROUSSARD *et al.*, 2003). Por seu alto poder redutor, proporciona proteção contra a oxidação descontrolada na fase aquosa da célula (AMAYA-FARFAN; DOMENE; PADOVANI, 2001).

Após a doação de um elétron a vitamina E radical, o ascorbato é oxidado a SDA (semidehidroascorbato) radical, um composto menos reativo. Esse composto pode ser

reciclado pelo dihidrolipoato ou desencadear uma desproporcional reação para formar o ácido dehidroascorbato (forma oxidada). Na presença de GSH, a enzima dehidroascorbato redutase catalisa a regeneração do ascorbato. Em animais o SDA radical pode também ser convertido diretamente para ascorbato pela enzima SDA redutase, usando o NADH como um potente redutor. Na presença dos íons metais ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e ( $\text{Cu}^{2+}$ ) o ascorbato, em altas concentrações (~1mM), pode atuar como pró-oxidante, estimulando a reação de Fenton ou Haber-Weiss (JI, 1995; CORREIA, 2001).



**Figura 2** Reação de Fenton (JI, 1995).



**Figura 3** Reação de Haber-Weiss (JI, 1995).

Alguns indivíduos parecem ser tolerantes a quantidades diárias elevadas de vitamina C, porém os intolerantes apresentam sintomas como náuseas, vômitos, diarreias e alterações na coagulação sanguínea. Esses sintomas foram constatados após a ingestão de doses entre 10 a 40 g/dia, que pode também, levar ao desenvolvimento de cálculo renal e dependência (PENTEADO, 2003).

A RDA para a vitamina C para homens e mulheres adultos é de 90 mg/dia e de 75 mg/dia, respectivamente. Já para os fumantes, em razão do maior estresse oxidativo, deve-se aumentar a ingestão em 35mg/dia (AMAYA-FARFAN; DOMENE; PADOVANI, 2001).

Além desses, outros compostos biológicos de baixo peso molecular também exibem função antioxidante. São eles, o ácido úrico, a glicose, a bilirrubina e a ubiquinona. O ácido úrico, nos últimos anos, mostrou ser um potente antioxidante tanto intracelular quanto extracelular, em função da sua atuação na preservação do ascorbato

plasmático, quelando íons metais de transição como ferro e cobre, e por neutralizar diretamente as EROs (JI, 1995; GROUSSARD *et al.*, 2003).

### **2.3 Adaptações ao Treinamento Submáximo vs Estresse Oxidativo**

---

O termo exercício “prolongado” é em geral utilizado para definir intensidades de exercícios que podem ser sustentadas por períodos de 30 a 180 minutos. Na prática, são intensidades com consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$  max) entre 60 e 85% (MAUGHAN *et al.*, 2000).

Vários estudos tem indicado a possibilidade do exercício de alta intensidade e/ou longa duração, causarem estresse oxidativo ao organismo, por uma maior produção das EROs, devido a fatores como, um elevado consumo de oxigênio aumentando o processo da fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, a produção de superóxido mitocondrial, via reações do oxigênio com os radicais flavina e ubisemiquinona (COOPER, 2002); aumento dos níveis de catecolaminas (COHEN; HEIKKILA, 1974; WITT *et al.*, 1992; SCHRÖDER *et al.*, 2001; TAULER *et al.*, 2002; URSO; CLARKSON, 2003); produção de ácido láctico (DEMOPULOS *et al.*, 1986); elevada taxa de auto-oxidação da hemoglobina (MISTA; FRIDOVICH, 1972; COOPER, 2002); hipertermia (SALO; DONOVAN; DAVIES, 1991); e o processo oxidativo das células inflamatórias recrutadas durante um evento de lesão tecidual (SACHECK; BLUMBERG, 2001; EVANS, 2002; URSO; CLARKSON, 2003).

Outras origens de formação das EROs durante o exercício, incluem a redistribuição do fluxo sanguíneo entre os tecidos, provocando o fenômeno de hipóxia e reoxigenação, e com isso um aumento na produção de superóxido pela xantina oxidase nos músculos, atividade contrátil excessiva, resultando na liberação de prostanoídes e radicais livres intermediários, além da interrupção da homeostase do cálcio (WITT *et al.*, 1992; NAKAO *et al.*, 2000; SACHECK; BLUMBERG, 2001; COOPER, 2002; URSO; CLARKSON, 2003).

Com isso, o equilíbrio entre a produção dessas espécies reativas, a produção de antioxidantes e o reparo, são afetados (MARSHALL *et al.*, 2002; SVENSSON *et al.*,

2002; GROUSSARD *et al.*, 2003), incorrendo em lesão potencial da membrana celular e das organelas nos músculos, fígado, coração, cérebro, sangue e outros tecidos periféricos (WITT *et al.*, 1992; VENDITTI; MEO, 1997; NAKAO *et al.*, 2000; METIN *et al.*, 2002).

Em decorrência de repetições de séries de exercícios durante dias, semanas ou meses, surgem adaptações fisiológicas e bioquímicas, que levam à melhora no desempenho de tarefas específicas. A natureza e a magnitude da resposta adaptativa ao treinamento, dependem da intensidade e da duração, do tipo de treinamento, da frequência de repetições do exercício, das limitações genéticas, o nível anterior de atividade do indivíduo, e o estado nutricional (VENDITTI; MEO, 1997; GOLDFARB, 1999; COYLE, 2000; MAUGHAN *et al.*, 2000).

A maioria dos estudos afirma que o treinamento aeróbico, em particular, reforça a atividade potencial antioxidante, aumentando tanto a atividade antioxidante enzimática, como a não enzimática (SELMAN *et al.*, 2002; TAULER *et al.*, 2002; GROUSSARD *et al.*, 2003). Além disso, proporciona uma diminuição nos níveis de peroxidação lipídica sobre um período relativamente curto de treinamento (10 a 18 semanas) (GROUSSARD *et al.*, 2003).

Um estudo realizado por Viguie *et al.*, (1993), em indivíduos que praticavam corrida por 90 minutos a 65% do VO<sub>2</sub> max, durante 3 dias consecutivos, demonstrou alterações no estado da GSH sanguínea após o exercício, que retornou rapidamente aos níveis basais constatados antes de cada corrida. Porém, os autores não observaram mudanças nos hidroperóxidos lipídicos e ocorrência de lesão celular indicada por alterações do RNA. Concluíram, então, que episódios repetidos de exercícios concêntricos podem resultar em alterações transitórias no estresse oxidativo sem algum indicador de lesão celular.

No entanto, em exercícios extenuantes, como após uma ultramaratona, há ocorrência de lesões oxidativas em atletas treinados, indicados por um aumento plasmático do MDA, dienos conjugados e/ou por um aumento urinário de 8-dihydroxideoxiguanosina (8-OhdG). Nessas situações, as defesas antioxidantes enzimáticas, por si só, não conseguem superar a sobrecarga (TAULER *et al.*, 2002).

Uma relação direta entre a intensidade do exercício e a peroxidação lipídica pode estar associada à lesão e a dor muscular (GOLDFARB, 1999; SCHRÖDER *et al.*,

2001). O aumento plasmático das enzimas musculares como a lactato desidrogenase (LDH) e a creatina quinase (CK) são respostas características ao exercício físico extenuante usadas, freqüentemente, como indicadores de lesão muscular e comparadas aos marcadores de estresse oxidativo no sangue e no músculo (GOLDFARB,1999; SACHECK; BLUMBERG, 2001).

A perda da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  e o seu aumento intracelular, podem ser um importante evento na lesão muscular causada pelo exercício, além da depleção celular de tióis potencializando a geração das EROs, a peroxidação lipídica e o escoamento de enzimas intracelulares (EVANS, 2000).

Em razão da pequena quantidade de antioxidantes enzimáticos no plasma humano, o sistema antioxidante não enzimático têm papel importante em proteger as células e o músculo contra lesões provocadas por EROs atuando na defesa contra o estresse oxidativo, formando menos radicais reativos ou neutralizando a reação (GROUSSARD *et al.*, 2003).

## **2.4 Suplementação Nutricional com Vitaminas Antioxidantes no Exercício Submáximo**

---

A natureza química de alguns antioxidantes é determinada pela solubilidade e sua localização no tecido biológico. Os antioxidantes lipossolúveis são encontrados nas membranas protegendo-as contra danos oxidativos, enquanto os hidrossolúveis no citosol, na matrix mitocondrial ou fluídos extracelulares (SEN, 2001).

O aumento nas defesas antioxidantes, decorrente do treinamento físico, pode não ser fisiologicamente proporcional às necessidades, em razão de uma elevação nos eventos pró-oxidativos (SACHECK; BLUMBERG, 2001).

A influência da alimentação nessas situações de alterada demanda fisiológica, tem despertado a atenção de pesquisadores, aos efeitos dos suplementos vitamínicos antioxidantes no desempenho e/ou no estresse oxidativo (OLIVEIRA *et al.*, 2002; URSO; CLARKSON, 2003), sugerindo que, particularmente, as vitaminas C, E, e o  $\beta$ -caroteno, oferecem proteção contra lesões causadas por EROs (VENDITTI; MEO,

1997; HEATON *et al.*, 2002; GROUSSARD *et al.*, 2003). As quantidades requeridas vão depender de fatores como a duração, a intensidade do exercício ou programa de treinamento, a idade, a dieta, e o estado de saúde do indivíduo. (SACHECK; BLUMBERG, 2001).

Como as vitaminas antioxidantes não podem ser sintetizadas pelo organismo, a suplementação dietética em situações, como no treinamento físico, onde o consumo de antioxidantes é aumentado, significativamente, sobre um longo período, é a melhor forma de manter o equilíbrio pró e antioxidante contribuindo largamente aos níveis plasmáticos de antioxidantes não enzimáticos no repouso (GROUSSARD *et al.*, 2003).

A vitamina E se destaca por proteger as membranas celulares da peroxidação lipídica, sendo o foco de vários estudos na habilidade da suplementação em reduzir o aumento no estresse oxidativo ou à lesão muscular causada pelo exercício de alta intensidade (URSO; CLARKSON, 2003). Ingerida em conjunto com a vitamina C, parece ser mais efetiva que de forma isolada, já que a vitamina C tem o poder de reciclar a vitamina E, através da redução da vitamina E radical, formada na reação com o radical peróxido (WITT *et al.*, 1992; SACHECK; BLUMBERG, 2001).

Além disso, a suplementação com vitamina E pode reduzir a lesão oxidativa induzida pelo exercício em humanos e ratos e prolongar o tempo de endurance à fadiga (VENDITTI; MEO, 1997).

Um estudo realizado com ratos deficientes em selênio mostrou que a vitamina E em quantidades adequadas na dieta, pode abolir completamente o aumento da síntese do pentano expirado, um indicador do aumento da peroxidação lipídica. Já em ratos deficientes em vitamina E, houve uma elevação de seis vezes no pentano expirado, além da diminuição no tempo até a exaustão na esteira, comparados a animais que ingeriam níveis adequados dessa vitamina. A diminuição na performance é acompanhada de uma forte concentração de radicais livres estáveis e produtos da peroxidação lipídica no músculo e fígado, bem como, um desequilíbrio na função oxidativa na mitocôndria, além de um aumento de vinte vezes nas hemólises nos eritrócitos desses animais. Em relação ao  $VO_2 \max$ , não houve alterações decorrentes da deficiência da vitamina E (WITT *et al.*, 1992)

Mehta, Li e Mehta (1999), mostraram em ratos que receberam 100 mg/kg/dia de vitamina C e 100 mg/kg/dia de vitamina E, isoladas e associadas, por 15 dias, uma

diminuição e um retardo significativos de 30-40% no tempo de formação de trombos, na agregação plaquetária e na geração do ânion superóxido vascular. Na atividade antioxidante endógena da SOD houve um aumento somente nos animais que consumiram a vitamina E isolada, sugerindo que a vitamina C em conjunto, pode ter bloqueado o efeito da vitamina E na atividade da SOD.

Baskin *et al.*, (2000), verificaram o efeito da suplementação dietética (400UI de  $\alpha$ -tocoferol acetato, 3 mg de  $\beta$ -caroteno e 20 mg de luteína), na concentração plasmática de antioxidantes em cachorros *sled* (de trenó) submetidos ao estresse oxidativo induzido por exercício, e constataram que a suplementação resultou em aumento da concentração plasmática das vitaminas no grupo suplementado que realizou exercício, além de diminuir a oxidação do DNA e aumentar a resistência das lipoproteínas à oxidação.

## 2.5 Relevância e Aplicabilidade

---

Inúmeras pesquisas sugeriram que os indivíduos fisicamente ativos envolvidos em programas de exercícios agudos ou crônicos, podem ser beneficiados pelo consumo de nutrientes antioxidantes (AGUILÓ *et al.*, 2003; GIRTEN *et al.*, 1989; MENA *et al.*, 1991; ROBERTSON *et al.*, 1991).

A suplementação nutricional com vitaminas antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol, vitamina C e  $\beta$ -caroteno) pode aumentar as defesas endógenas (PACKER, 1984; DEMOPULOS *et al.*, 1986; SUMIDA *et al.*, 1989; KUMAR *et al.*, 1992; KANTER; NOLTE; HOLLOSZY, 1993; CORNELLI *et al.*, 2001; WEDEKIND *et al.*, 2002), mantendo um equilíbrio entre a produção das EROs e a capacidade de defesa antioxidante, reduzindo, dessa forma, os danos oxidativos associados ao envelhecimento, doenças degenerativas e modelos específicos de exercício físico (MARLIN *et al.*, 2002 ; WEDEKIND *et al.*, 2002).

O uso dessas vitaminas tem sido advogado em diversas condições, desde a suplementação para desportistas até a prescrição para indivíduos idosos, tendo o seu papel, sem dúvida alguma, bem definido no estresse oxidativo. Porém em todas essas

áreas, os trabalhos clínicos randomizados são poucos e conflitantes, e ainda sem uma orientação definida (CORREIA, 2001).

A manipulação dos níveis plasmáticos dessas substâncias por meio de suplemento na dieta pode vir a se constituir como importante tratamento para essas condições no futuro (GALIZIA; WAITZBERG, 2001).

Assim, torna-se importante a realização do presente estudo que nos permitirá avaliar o efeito da suplementação de vitaminas antioxidantes durante o treinamento de natação a 80% da carga máxima, em ratos, uma vez que é necessária a existência de um equilíbrio dos pró-oxidantes e dos antioxidantes para preservar a função celular e tecidual.

Portanto, a padronização em animais, contribuirá e permitirá no futuro, a aplicação segura desse protocolo em pessoas saudáveis sedentárias, atletas, gestantes e em indivíduos portadores de doenças neuro-musculares, cardiovasculares, respiratórias, entre outros.

### **3- OBJETIVO**

### 3 - Objetivo

---

O objetivo do presente trabalho consiste em:

- 1) Avaliar os efeitos da suplementação isolada de vitamina C, a-tocoferol, e da mistura vitamínica (vitamina C, a-tocoferol e  $\beta$ -caroteno), nas variáveis relacionadas ao equilíbrio pró e antioxidante do sistema biológico de ratos da linhagem *Wistar*, através de análises bioquímicas, após treinamento de natação a 80% da carga máxima.

## **4- MATERIAL E MÉTODOS**

## 4 - Material e Métodos

---

### 4.1 Condições Ambientais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UniVap), na cidade de São José dos Campos/São Paulo.

### 4.2 Animais

A amostra experimental foi composta por 30 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*, variação albinos) machos, adultos (60-65 dias e com o peso de aproximadamente 240g), provenientes do Biotério Central do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UniVap).

Os animais tiveram duas semanas de adaptação ao biotério local, onde nos primeiros 3 dias foi realizado o procedimento de vermifugação (15ml de vermífugo – ricobendazole composto, marca *Orurofino* - diluídos em 5 litros de água).

Os ratos foram mantidos em uma condição padrão de temperatura (22-25° C), umidade relativa (40-60 %), ciclo de 12 horas claro-escuro, alimentados com ração para animais de laboratório da marca *Labcil* e água *ad libitum*. Após o período de adaptação à natação, os animais foram randomizados e divididos em grupos de 3 animais por caixa de contenção.

### 4.3 Adaptação à Natação

Após a adaptação ao biotério local, todos os ratos foram submetidos a um período de adaptação à natação para reduzir o estresse sem promover adaptações do treinamento (VOLTARELLI; GOBATO; MELLO, 2002). Essa adequação foi realizada em um tanque (80 x 60 x 60 cm) com capacidade para 250 L de água, mantidos a temperatura de  $34 \pm 1$  °C controlada por um termostato.

A adaptação consistiu em nado livre, em grupos de seis ratos por sessão, sem carga, durante 10 minutos/dia por cinco dias, sempre entre 08:00 e 12:00 horas. A natação em grupo foi utilizada, pois promove um exercício mais vigoroso do que o nado individual, em razão do atrito entre os animais (UENO *et al.*, 1997; NAKAO *et al.*, 2000).

#### **4.4 Grupos Experimentais**

Após a realização do primeiro teste de determinação da carga máxima, os ratos foram distribuídos em 5 grupos experimentais:

**1- Grupo Controle (GC):**

Constituído por 6 ratos machos sedentários com ração e água *ad libitum*.

**2- Grupo Controle Treinado (GCT):**

Constituído por 6 ratos machos treinados a 80 % da carga máxima com ração e água *ad libitum*.

**3- Grupo Treinado e Suplementado com Mistura Vitamínica (MIX):**

Constituído por 6 ratos machos treinados a 80 % carga máxima com ração e água *ad libitum* e suplementados com Mistura Vitamínica (650 mg/kg/dieta de Vitamina C; 270 mg/kg/dieta de Vitamina E e 70 mg/kg/dieta de  $\beta$ -caroteno).

**4- Grupo Treinado e Suplementado com Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) (VIT E):**

Constituído por 6 ratos machos treinados a 80 % carga máxima com ração e água *ad libitum* e suplementados com Vitamina E (270 mg/kg/dieta).

**5- Grupo Treinado e Suplementado com Vitamina C (VIT C):**

Constituído por 6 ratos machos treinados a 80 % carga máxima com ração e água *ad libitum* e suplementado com Vitamina C (650 mg/kg/dieta).

#### **4.4.1 Suplementação Vitamínica**

A quantidade de ração consumida não foi mensurada, sendo oferecido diariamente um adicional de vitaminas em relação às quantidades já presentes na ração (as informações nutricionais da ração estão presentes no anexo A). As doses suplementadas de vitaminas antioxidantes foram utilizadas de acordo com Kraus, Roth e Kirchgessner (1997).

Os suplementos vitamínicos foram fabricados em farmácias de manipulação autorizadas (laudo técnico das vitaminas estão presentes no anexo B) e administrados via oral por gavagem todos os dias antes do treinamento e aos finais de semana. Cada 10 doses de vitaminas, separadas por grupos, eram diluídas em 10 ml de água destilada, misturadas com auxílio de um agitador de tubos, para facilitar a diluição, e administradas imediatamente após a diluição. Cada rato recebia 1 ml da solução correspondente ao seu grupo.

#### **4.5 Determinação da Carga Máxima para o Treinamento**

Após a delimitação dos grupos experimentais, todos os animais foram submetidos ao teste de carga máxima segundo Osorio *et al.*, (2003 a, b), em uma piscina cilíndrica (50 cm x 45 cm), construída em acrílico transparente com a temperatura da água a  $34 \pm 1^\circ\text{C}$ .

##### **4.5.1 Protocolo para Obtenção da Carga Máxima e Reajuste a 80%**

O teste de carga máxima foi realizado individualmente, ou seja, um animal por vez. Foram utilizadas placas de alumínio como carga, as quais eram colocadas em um clipe fixado a um elástico posicionado junto ao tórax do animal (VOLTARELLI; GOBATO; MELLO, 2002), de modo confortável.

Inicialmente os animais eram pesados para que pudessemos calcular os percentuais da carga de trabalho, que foi aumentada a cada três minutos através da colocação das placas no elástico, correspondendo a 1 %, 2 %, 3 %, etc. do peso corporal

total, até que o rato entrasse em exaustão, atingindo a carga máxima. A exaustão foi determinada pela submersão do animal (LEEUWENBURGH; JI, 1998), por aproximadamente 8-10 segundos (DAWSON; HOVARTH, 1970; OSORIO *et al.*, 2003 a, b).

A determinação da carga máxima suportada pelos animais durante o teste nos permitiu o ajuste da carga de trabalho para o treinamento físico a 80 % dessa carga máxima.

O teste de carga máxima foi repetido periodicamente para o reajuste das cargas, com intervalo entre 5 semanas do primeiro para o segundo, 7 semanas do segundo para o terceiro e 5 semanas do terceiro para o quarto, no final do treinamento, ou seja, 3 dias antes da eutanásia.

#### **4.6 Treinamento Físico**

O treinamento dos quatro grupos foram realizados durante 5 dias/semana por 17 semanas, sempre entre às 08:00 e às 12:00 horas, conforme o processo de adaptação, totalizando 18 semanas de natação. Cada sessão teve duração de 30 minutos.

A carga que os animais carregavam durante o treinamento consistia do peso total de pesos de chumbos para pesca envolvidos em uma tira de fita crepe fixada a um elástico posicionado junto ao tórax do animal (VOLTARELLI; GOBATTO; MELLO, 2002), de modo confortável.

Observação: Devido às altas cargas carregadas pelos grupos, esses passaram por um processo de adaptação à carga que consistiu de 10 minutos na primeira semana de treinamento, 20 minutos na segunda semana e 30 minutos até a finalização das 18 semanas do treinamento físico.

Após o término de cada sessão de natação, os elásticos com pesos dos 6 animais eram retirados e em seguida, os ratos eram colocados em uma caixa de contenção por 30 minutos. No fundo dessa caixa existia uma grade de ferro que impedia o contato dos animais com a água que escoava dos seus pêlos, permitindo dessa forma a secagem dos mesmos.

Durante o experimento os animais permaneceram no mesmo Laboratório, sofrendo as mesmas influências ambientais. Todos os animais, independentemente do

grupo a qual pertençam, passaram pelos mesmos procedimentos prévios, ou seja, pelo período de adaptação e pelo teste de carga máxima.

#### **4.7 Controle do Peso Corporal**

Para obtenção do peso corporal dos animais durante o experimento foi utilizada uma balança digital (marca *Bel Engineering*) com precisão de três casas decimais. As mensurações do peso eram realizadas sempre de 7 em 7 dias, antes do treinamento, entre 07:00 e 08:00 horas.

#### **4.8 Observação dos Animais**

Diariamente, eram feitas observações e anotações do comportamento dos animais, principalmente quanto às condições da pele e dos pêlos.

O tratamento dos animais nesses experimentos estava de acordo com a lei nº 6638, de 08 de maio de 1979 e com os princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (ANDERSEN *et al.*, 2004).

#### **4.9 Sacrifício**

O sacrifício foi realizado em uma manhã, após três dias da última sessão de treinamento, para atenuar os efeitos agudos do exercício (NAKAO *et al.*, 2000). O método utilizado foi a decapitação (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979; ADAMO *et al.*, 1989; JI; DILLON; WU, 1990; JI; FU; MITCHELL, 1992; VENDITTI *et al.*, 1996; OH-ISHI *et al.*, 1997; VENDITTI; MEO, 1997; MATAIX *et al.*, 1998; NAVARRO-ARÉVALO; SÁNCHEZ-DEL-PINO, 1998; BEJMA; JI, 1999; NAVARRO-ARÉVALO; CANÃVATE; SÁNCHEZ-DEL-PINO, 1999; VENDITTI; MASULLO; MEO, 1999; KOHNO *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2003; OSORIO *et al.*, 2003 a; OSORIO *et al.*, 2003 b; ANDERSEN *et al.*, 2004).

Em seguida, o sangue total (cerca de 4-5 mL) foi coletado em um tubo de ensaio (marca Vacutainer – 10 mL) contendo anticoagulante (heparina) e em outro tubo de

ensaio (10 mL) sem anticoagulante (seco), ambos mantidos sob refrigeração com gelo. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3000rpm, por 10 minutos, a temperatura ambiente, para obtenção do plasma e soro, respectivamente, que foram congelados a -40°C (RADAK *et al.*, 2000), no freezer localizado no Laboratório de Preparação de Amostras do IP&DI da UniVap.

Além da coleta sanguínea, o coração também foi retirado e armazenado a -40°C, para posterior análise da possível hipertrofia cardíaca (procedimento descrito a seguir).

#### **4.10 Análises Bioquímicas**

Para análise da peroxidação lipídica foi utilizado o plasma obtido do tubo contendo sangue heparinizado. Os eritrócitos desse mesmo tubo foram submetidos ao processo de lavagem, no mesmo dia da coleta, conforme Somani *et al.*, (1995), para posterior análise das atividades das enzimas antioxidantes.

O procedimento de lavagem foi realizado no Laboratório de Cultura de Células do IP&DI da UniVap e a análise das enzimas antioxidantes dos eritrócitos foi feita pelo Laboratório *VITAE* situado em São Paulo.

O soro obtido do tubo seco foi utilizado para análise da enzima creatina quinase e da lactato desidrogenase.

O espectrofotômetro da marca *SHIMADZU UV-1650PC* foi utilizado para as análises bioquímicas da peroxidação lipídica e creatina quinase.

##### **4.10.1 Peroxidação Lipídica**

Para a medida da peroxidação de lipídios em plasma foi utilizada a técnica de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), baseada na formação de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), que ocorre após a peroxidação lipídica das membranas celulares. Estas substâncias produzem uma coloração característica (rosa), que foi

medida no espectrofotômetro com 535 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de TBARS/ml de plasma.

#### **4.10.2 Superóxido Dismutase (SOD)**

Segundo o método de McCord e Fridovich (1969), a transformação da xantina em ácido úrico, catalisada pela xantina oxidase, ativa o  $O_2$  a  $O_2^-$ . A reação é acoplada à redução do citocromo c pelo  $O_2^-$ , que pode ser acompanhada através da absorvância em 550 nm, a 25 °C. Os resultados foram expressos em U/mg de hemoglobina (U/mg hb), onde uma unidade (1U) é definida como a quantidade de enzima na amostra requerida para inibir 50 % da redução do citocromo c por minuto, a 25°C, em um pH de 7,8.

#### **4.10.3 Glutationa Peroxidase (GPX)**

A GPX catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e de outros hidroperóxidos orgânicos, ao mesmo tempo em que oxida a Glutationa Reduzida (GSH).

O método de Sies *et al.*, (1979), mede a velocidade de oxidação de NADPH catalisada pela glutathione redutase (GR), que é proporcional à produção de GSSG, catalisada pela GPX em presença de peróxido de terc-butila, que pode ser acompanhada pelo decréscimo da absorvância em 340 nm, a 30 °C. Os resultados foram expressos em U/mg de hemoglobina (U/mg hb), onde uma 1U é a quantidade de enzima necessária para catalisar a oxidação de 1 mmol NADPH/minuto, a 30°C, em um pH de 7,0.

#### **4.10.4 Catalase (CAT)**

A catalase promove a oxidação de peróxido de hidrogênio a água e hidrogênio molecular. A técnica foi descrita por Beutler (1975), e quantifica a velocidade de decomposição do  $H_2O_2$  pela enzima, através do decréscimo de absorvância em 230 nm, a 30°C. Os resultados foram expressos em U/mg de hemoglobina (U/mg hb), onde 1 U de catalase corresponde à atividade de enzima que hidrolisa 1mmol de  $H_2O_2$  por minuto, a 30°C em um pH de 8,0.

#### **4.10.5 Concentrações Plasmáticas das Vitaminas Antioxidantes**

As análises dos níveis plasmáticos das vitaminas antioxidantes ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -tocoferol e vitamina C) foram feitas pelo Laboratório *VITAE* situado em São Paulo, utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol/l}$ .

#### **4.10.6 Creatina quinase (CK)**

A atividade da enzima creatina quinase foi avaliada através de um kit diagnóstico da marca *Laborlab* (Guarulhos/São Paulo), através do método cinético ultravioleta (340 nm; a 37 °C). Os resultados foram expressos em U/L

#### **4.10.7 Lactato Desidrogenase (LDH)**

A atividade da enzima lactato desidrogenase foi avaliada através de um kit diagnóstico da marca *Labtest diagnostica* (Lagoa Santa/Minas Gerais), através do método cinético de tempo fixo e medição de ponto final (500 nm; a 37 °C). Os resultados foram expressos em U/L

### **4.11 Considerações Metodológicas**

O malondialdeído (MDA), é o marcador de peroxidação lipídica mais utilizado, e freqüentemente avaliado pelo ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBA) (ZWART *et al.*, 1999). Entretanto, outros compostos podem reagir com o TBA, tais como, a bilirrubina (KNIGHT; PIEPER; MCCLELLAN, 1988), aldeídos saturados e não saturados não funcionais, carboidratos e prostaglandinas (ALESSIO, 2000 *apud* URSO; CLARKSON, 2003). Por essa razão os níveis de peroxidação lipídica são usualmente expressos como TBARS, ou seja, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (DRAPER *et al.*, 1993).

Os níveis de MDA, no presente estudo, foram medidos para indicação da produção das EROs. A análise foi feita no plasma, devido quantidade suficiente de ácidos graxos poliinsaturados, e a reflexão do estado sistêmico da peroxidação lipídica (NISHIYAMA *et al.*, 1998).

Como a medida das TBARS sozinha não reflete o aumento do estresse oxidativo devido à falta de especificidade, foram avaliadas, também, as mudanças nos sistemas antioxidantes dos eritrócitos (NISHIYAMA *et al.*, 1998).

Evidências experimentais demonstram que os eritrócitos são importantes durante o exercício, pois contêm milhões de moléculas de hemoglobina capazes de transportarem as moléculas de O<sub>2</sub> necessárias para o suprimento constante de energia aos músculos ativos (WILMORE; COSTILL, 2003), além disso, a hemoglobina está sujeita à auto-oxidação com a produção das EROs (COOPER *et al.*, 2002).

#### **4.12 Análise da Estrutura Cardíaca**

Após o sacrifício, foi realizado rapidamente uma toracotomia para retirada do coração que foi lavado em solução salina (0,9 %) para a remoção de coágulos e congelado em freezer a - 45 ° C até o momento da análise. Após o descongelamento, os corações foram pesados (balança digital da marca *Bel Enginerring*) e dissecados, os átrios removidos e os ventrículos pesados. Desta forma obtivemos o peso cardíaco total (PCT), em mg e o peso dos ventrículos.

Em seguida, foi retirado o ventrículo direito, e o tecido remanescente foi pesado, obtendo-se assim o peso ventricular esquerdo (PVE), em mg. Através da diferença entre o peso cardíaco total e o peso ventricular esquerdo obtivemos o peso ventricular direito (PVD) em mg.

Estes valores foram corrigidos em função do peso corpóreo obtido no dia do sacrifício, e assim foram finalmente expressos como peso cardíaco relativo (PCR = PCT/peso corpóreo); índice do peso ventricular esquerdo (IPVE = PVE/peso corpóreo); e o índice do peso ventricular direito (IPVD = PVD/peso corpóreo), todos valores dado em mg/g (SANTOS *et al.*, 1999; MEDEIROS *et al.*, 2000).

#### **4.13 Análise Estatística**

Foi utilizada uma abordagem estatística adequada ao delineamento experimental proposto, que nos permitiu observar os possíveis efeitos isolados ou combinados da suplementação dietética com vitaminas antioxidantes e do exercício a 80 % da carga máxima.

Os dados das amostras foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do teste “Tukey”, quando necessário. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa de informática GraphPad InStat<sup>®</sup>. Os resultados foram expressos com a média  $\pm$  erro padrão da média (Média  $\pm$ E.P.M.), sendo que os valores de  $p < 0,05$  (5 %) foram considerados significativos.



## **5- Resultados**

---

### **5.1 Caracterização do Treinamento**

---

Os resultados abaixo foram expressos em tabelas e gráficos através da média e do erro padrão da média e caracterizaram algumas variáveis analisadas durante e após o período de 18 semanas de experimento.

Os animais que apresentaram algum tipo de intercorrência, nesse período, foram impedidos de nadar ou foram acompanhados, até que estivessem plenamente recuperados.

No grupo composto pelos animais que consumiram o a-tocoferol (VIT E), dois ratos morreram durante o período de experimento. Não foi investigado a causa da morte, finalizando o grupo com quatro animais.

#### **5.1.1 Evolução do Peso Corpóreo e Comparação entre os Grupos Estudados**

A tabela 1 descreve a evolução do peso corporal dos animais durante as 18 semanas. Os pesos foram obtidos antes de cada teste de carga máxima. No peso 1 houve diferença estatisticamente significativa do grupo GC em relação ao GCT e ao MIX. No peso 2 as diferenças foram estatisticamente significantes do grupo GC em relação ao GCT, ao MIX, ao VIT E e ao VIT C. No peso 3 houve diferenças estatisticamente significantes do grupo GC em relação ao GCT, ao MIX e ao VIT E, e no peso 4 as diferenças foram estatisticamente significantes entre o grupo GC em relação ao GCT, ao MIX, ao VIT E e ao VIT C.

**Tabela 1** Evolução do peso corporal dos ratos durante o período de 17 semanas de treinamento

Grupos	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Peso 3 (g)	Peso 4 (g)
	Semana 1	Semana 5	Semana 13	Semana 18
GC	273,33 ± 9,75	360,67±10,42	427,83 ± 9,75	452,67 ± 9,5
GCT	244,67±4,75 <sup>a</sup>	300,83 ± 6,0 <sup>a</sup>	377,33±7,18 <sup>a</sup>	385,5 ± 8,87 <sup>a</sup>
MIX	240 ± 6,59 <sup>a</sup>	301 ± 7,57 <sup>a</sup>	368 ± 8,23 <sup>a</sup>	379,33±8,71 <sup>a</sup>
VIT E	249,75 ± 4,33	307,25±7,15 <sup>a</sup>	368,5±13,07 <sup>a</sup>	378 ± 15,08 <sup>a</sup>
VIT C	249,67 ± 2,8	317 ± 7,41 <sup>a</sup>	393,33 ± 9,81	395,5 ± 9,33 <sup>a</sup>

N = 6 (exceto VIT E, N = 4). GC, controle sedentário; CGT, controle treinado a 80% da carga máxima; MIX, treinado a 80% da carga máxima e suplementado com mistura vitamínica (α-tocoferol, β-caroteno e vitamina C); VIT E treinado a 80% da carga máxima e suplementado com α-tocoferol; VIT C treinado a 80% da carga máxima e suplementado com vitamina C. Os valores representam a média ± erro-padrão dos grupos. <sup>a</sup> p < 0,05 em relação ao GC.

### **5.1.2 Evolução das Porcentagens (%) de Carga Máxima Atingidas durante o Teste Individual**

A tabela 2 representa os resultados das cargas máximas atingidas nos 4 testes individuais realizados para o reajuste das cargas de treinamento. No primeiro teste de carga máxima (CM 1) houve diferença estatisticamente significativa entre o GC e o GCT. No segundo teste (CM 2), não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Já no teste 3 (CM 3) as diferenças foram estatisticamente significantes entre o grupo GC em relação ao GCT, ao VIT E e ao VIT C. E no quarto e último teste de carga máxima (CM 4), houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo GC em relação ao GCT, ao MIX, ao VIT E e ao VIT C.

**Tabela 2** Evolução das porcentagens de cargas máximas atingidas durante o experimento nos 4 testes individuais de carga máxima.

Grupos	CM 1 (%)	CM 2 (%)	CM 3 (%)	CM 4 (%)
GC	4,83 ± 0,16	4,5 ± 0,34	5 ± 0,26	5,33 ± 0,21
GCT	6 ± 0,26 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,21	8 ± 0,38 <sup>a</sup>	9 ± 0,26 <sup>a</sup>
MIX	5,67 ± 0,21	5,67 ± 0,21	7,17 ± 0,4	8,5 ± 0,22 <sup>a</sup>
VIT E	5,5 ± 0,29	5,75 ± 0,25	9,5 ± 0,64 <sup>a</sup>	8,5 ± 0,64 <sup>a</sup>
VIT C	5,5 ± 0,34	5,67 ± 0,33	9,6 ± 1,14 <sup>a</sup>	8,17 ± 0,48 <sup>a</sup>

N = 6 (exceto VIT E, N = 4). GC, controle sedentário; CGT, controle treinado a 80% da carga máxima; MIX, treinado a 80% da carga máxima e suplementado com mistura vitamínica (α-tocoferol, β-caroteno e vitamina C); VIT E treinado a 80% da carga máxima esuplementado com α-tocoferol; VIT C treinado a 80% da carga máxima e suplementado com vitamina C. Os valores representam a média ± erro-padrão dos grupos. **a** p < 0,05 em relação ao GC.

### 5.1.3 Análise da Estrutura Cardíaca

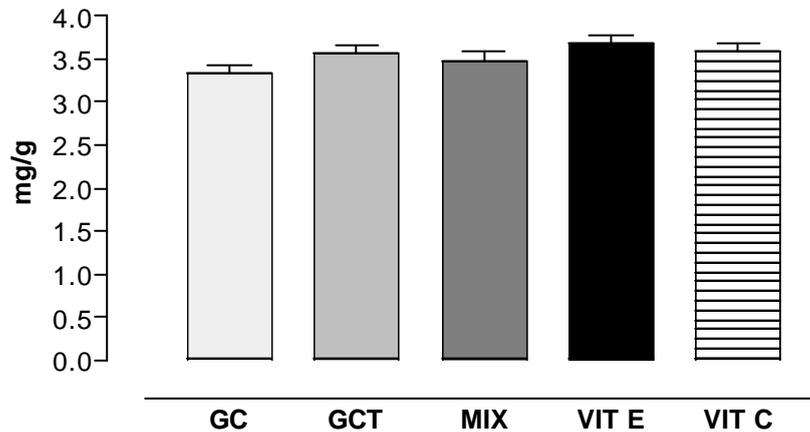
A tabela 3 e os gráficos 1, 2 e 3 representam a estrutura cardíaca dos animais. No gráfico 1, representando o peso cardíaco do coração (PCR), não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos. Já no gráfico 2 (IPVE) a diferença significante ocorreu entre o GC e o VIT C, indicando hipertrofia do ventrículo esquerdo. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com relação ao índice do peso ventricular direito (IPVD) representado no gráfico 3.

**Tabela 3** Peso cardíaco dos ratos obtidos a partir da análise do coração

Grupos	PCR (mg/g)	IPVE (mg/g)	IPVD (mg/g)
GC	3,33 ± 0,09	2,12 ± 0,05	0,72 ± 0,03
GCT	3,56 ± 0,10	2,35 ± 0,05	0,66 ± 0,04
MIX	3,47 ± 0,11	2,22 ± 0,05	0,79 ± 0,06
VIT E	3,68 ± 0,10	2,33 ± 0,05	0,74 ± 0,05
VIT C	3,58 ± 0,09	2,37 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,07

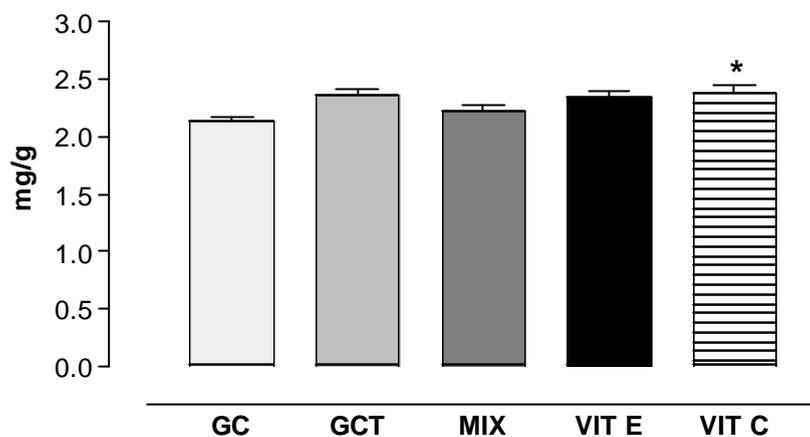
N = 6 (exceto VIT E, N = 4). GC, controle sedentário; CGT, controle treinado a 80% da carga máxima; MIX, treinado a 80% da carga máxima e suplementado com mistura vitamínica ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno e vitamina C); VIT E treinado a 80% da carga máxima esuplementado com  $\alpha$ -tocoferol; VIT C treinado a 80% da carga máxima e suplementado com vitamina C. Os valores representam a média  $\pm$  erro-padrão dos grupos. **a**  $p < 0,05$  em relação ao GC.

### 5.1.3.1 Peso Cardíaco Relativo (PCR)



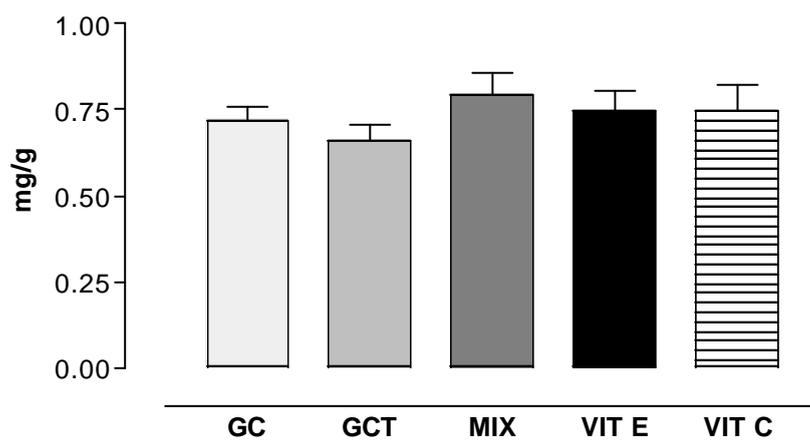
**Gráfico 1** Peso cardíaco relativo obtido a partir do peso total do coração pelo peso corporal. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

### 5.1.3.2 Índice do Peso Ventricular Esquerdo



**Gráfico 2** Comparação entre os grupos dos índices dos pesos ventriculares esquerdo. \*  $p < 0,05$  em relação ao GC

### 5.1.3.3 Índice do Peso Ventricular Direito



**Gráfico3** Comparação entre os grupos dos índices dos pesos ventriculares direito. Não houve diferenças significantes entre os grupos.

## 5.2 Análises Bioquímicas

### 5.2.1 Biomarcador de Peroxidação Lipídica

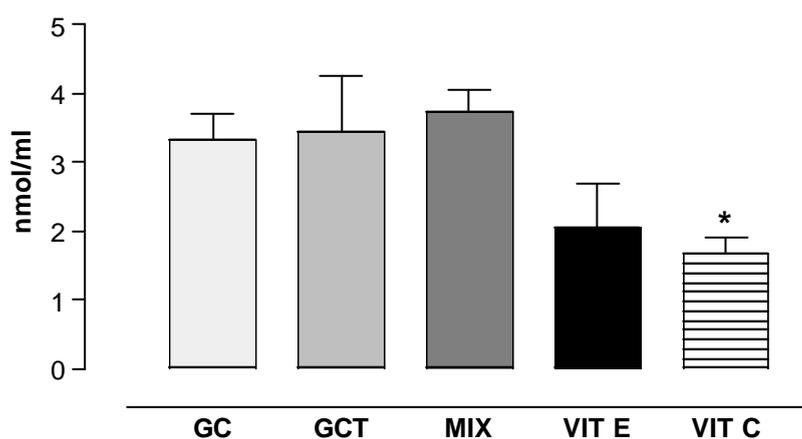
#### 5.2.1.1 Malondialdeído Plasmático (MDA)

A tabela 4 e o gráfico 4 representam as concentrações plasmáticas em repouso do MDA do grupo sedentário e dos grupos submetidos ao treinamento e suplementados, mostrando diferenças significantes entre o MIX e o VIT C.

**Tabela 4** Níveis Plasmáticos do MDA (mmoles/ml) após três dias da última sessão de treinamento

	GC	GCT	MIX	VIT E	VIT C
Média	3,319	3,457	3,745	2,059	1,675 <sup>a</sup>
E.P.M.	0,391	0,801	0,305	0,627	0,245

N = 6 (exceto VIT E, N = 4). GC, controle sedentário; CGT, controle treinado a 80% da carga máxima; MIX, treinado a 80% da carga máxima e suplementado com mistura vitamínica (α-tocoferol, β-caroteno e vitamina C); VIT E treinado a 80% da carga máxima e suplementado com α-tocoferol; VIT C treinado a 80% da carga máxima e suplementado com vitamina C. **a** p < 0,05 em relação ao MIX



**Gráfico 4** Concentração plasmática em repouso do MDA entre os grupos. \* p < 0,05 em relação ao MIX

## 5.2.2 Atividade das Enzimas Antioxidantes nos Eritrócitos

A tabela 5 descreve as concentrações eritrocitárias das três enzimas antioxidantes após três dias da última sessão de treinamento.

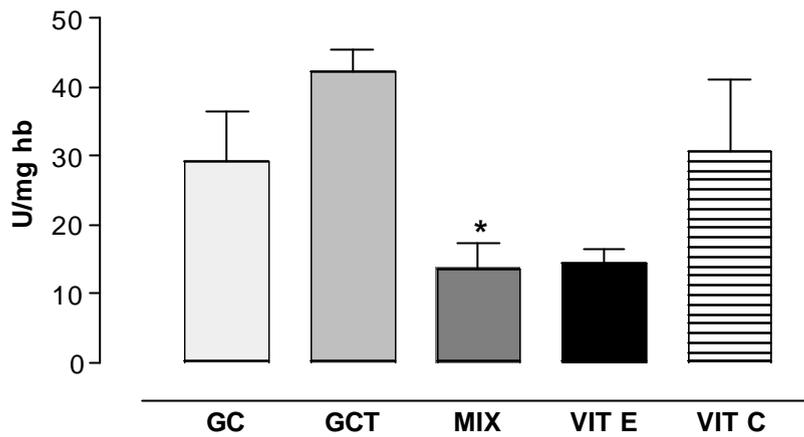
**Tabela 5** Concentrações eritrocitárias das enzimas antioxidantes no repouso do grupo sedentário e dos grupos submetidos ao treinamento e suplementados com vitaminas antioxidantes

Grupos	SOD (U/mg hb)	GPX(U/mg hb)	CAT(U/mg hb)
GC	29,23 ± 7,23	59,78 ± 6,43 <sup>b</sup>	122,55 ± 15,86 <sup>c</sup>
GCT	42,16 ± 3,34	76,59 ± 8,66	117,05 ± 13,9 <sup>c</sup>
MIX	13,73 ± 3,61 <sup>a</sup>	41,25 ± 5,30 <sup>b</sup>	64 ± 6,18 <sup>c</sup>
VIT E	14,47 ± 2,01	55,4 ± 10,36 <sup>b</sup>	104,05 ± 22,80 <sup>c</sup>
VIT C	30,68 ± 10,36	149,16 ± 37,13	240,61 ± 42,48

N = 6 (exceto VIT E, N = 4). GC, sedentário; CGT, treinado a 80% da carga máxima; MIX, treinado a 80% da carga máxima e suplementado com mistura vitamínica (α-tocoferol, β-caroteno e vitamina C); VIT E treinado a 80% da carga máxima e suplementado com α-tocoferol; VIT C treinado a 80% da carga máxima e suplementado com vitamina C. **a** p < 0,05 em relação ao GCT; **b** p < 0,05 em relação ao VIT C; **c** p < 0,05 em relação ao VIT C

### 5.2.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)

O gráfico 5 representa os resultados das concentrações da SOD nos eritrócitos dos ratos em repouso, indicando diferença significativa entre o GCT e o MIX.

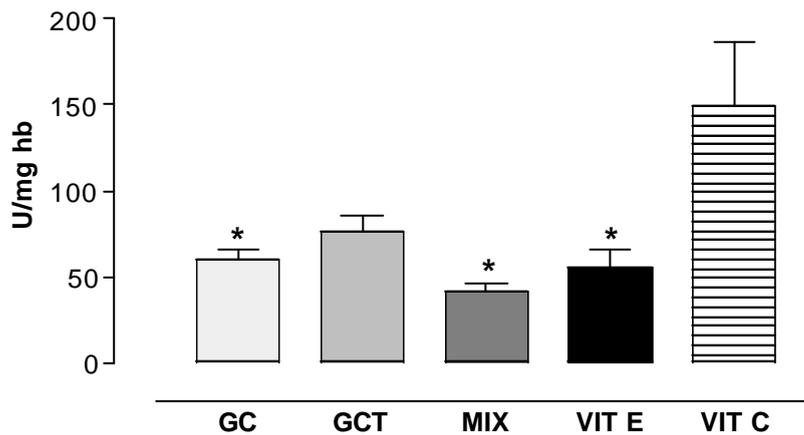


**Gráfico 5-** Concentração eritrocitária em repouso da SOD entre os grupos.

\*  $p < 0,05$  em relação ao GCT

### 5.2.2.2 Glutationa Peroxidase

O gráfico 6 registra as concentrações eritrocitárias da GPX no repouso, mostrando diferenças estatisticamente significantes do VIT C em relação ao GC, ao MIX e ao VIT E.

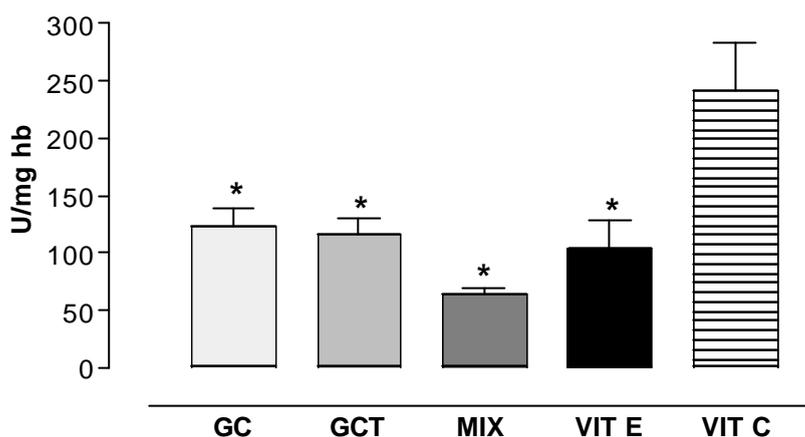


**Gráfico 6** Concentração eritrocitária da GPX no repouso.

\*  $p < 0,05$  em relação ao VIT C

### 5.2.2.3 Catalase (CAT)

A CAT em nossos resultados mostrou níveis bem heterogêneos de um grupo para o outro. Os resultados foram estatisticamente significantes entre o grupo VIT C em relação ao GC, ao GCT, ao MIX e ao VIT E, representado no gráfico 7.



**Gráfico 7** Concentração eritrocitária no repouso da CAT.

\*  $p < 0,05$  em relação ao VIT C

### 5.2.3 Concentrações Plasmáticas das Vitaminas Antioxidantes

A tabela 6 refere-se as concentrações plasmáticas dos nutrientes antioxidantes (a-tocoferol, vitamina C e  $\beta$ -caroteno) entre os grupos, e mostra diferenças estatisticamente significantes no grupo que consumiu o a-tocoferol entre o GC e o MIX e entre o MIX e o VIT C. No grupo que consumiu vitamina C, os resultados foram estatisticamente significantes no grupo GC em relação ao MIX, ao VIT E e ao VIT C; no GCT em relação ao MIX, ao VIT E e ao VIT C. As concentrações plasmáticas de  $\beta$ -caroteno não foram estatisticamente significantes.

**Tabela 6** Concentrações plasmáticas das vitaminas antioxidantes

Grupos	a-tocoferol ( $\mu\text{mol/L}$ )	Vitamina C ( $\mu\text{mol/L}$ )	$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{mol/L}$ )
GC	$3,9 \pm 0,82^a$	$0 \pm 0^{a,b,c}$	Não detectado
GCT	$4,38 \pm 0,95$	$0,38 \pm 0,38^{a,b,c}$	$0,02 \pm 0,02$
MIX	$8,42 \pm 1,54^b$	$15,18 \pm 2,79$	Não detectado
VIT E	$8,2 \pm 0,60$	$10,25 \pm 4,77$	$0,05 \pm 0,05$
VIT C	$3,47 \pm 1,02$	$9,42 \pm 1,39$	Não detectado

N = 6 (exceto VIT E, N = 4). GC, sedentário; CGT, treinado a 80% da carga máxima; MIX, treinado a 80% da carga máxima e suplementado com mistura vitamínica (a-tocoferol,  $\beta$ -caroteno e vitamina C); VIT E treinado a 80% da carga máxima e suplementado com a-tocoferol; VIT C treinado a 80% da carga máxima e suplementado com vitamina C. Os valores representam a média  $\pm$  erro-padrão dos grupos. **a**  $p < 0,05$  em relação ao MIX; **b**  $p < 0,05$  em relação ao VIT C; **c**  $p < 0,05$  em relação ao VIT E.

## 5.2.4 Indicadores de Lesão Tecidual

A tabela 7 representa as concentrações séricas no repouso da CK e da LDH, como indicadores de lesão muscular.

**Tabela 7** Concentrações séricas da CK e da LDH após três dias da última sessão de treinamento

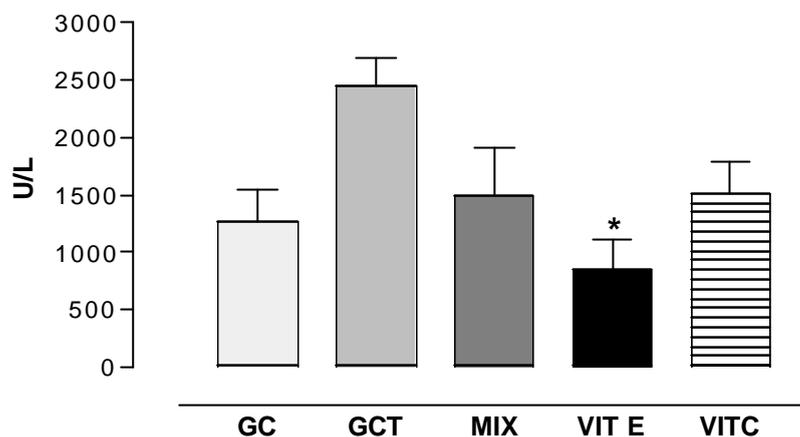
Grupos	CK (U/L)	LDH (U/L)
GC	$1269,11 \pm 283,66$	$1491,58 \pm 161,92$
GCT	$2448,73 \pm 240,47$	$1534,22 \pm 179,84$
MIX	$1493,07 \pm 416,26$	$1451,47 \pm 219,91$
VIT E	$851,99 \pm 255,52^a$	$1858,96 \pm 146,52$
VIT C	$1512,86 \pm 277,13$	$1616,72 \pm 90,39$

N = 6 (exceto VIT E, N = 4). GC, sedentário; CGT, treinado a 80% da carga máxima; MIX, treinado a 80% da carga máxima e suplementado com mistura vitamínica (a-tocoferol,  $\beta$ -caroteno e vitamina C); VIT E treinado a 80% da carga máxima e suplementado com a-tocoferol; VIT C treinado a 80% da carga máxima e suplementado com vitamina C.

**a**  $p < 0,05$  em relação ao GCT.

### 5.2.4.1 Creatina Quinase (CK)

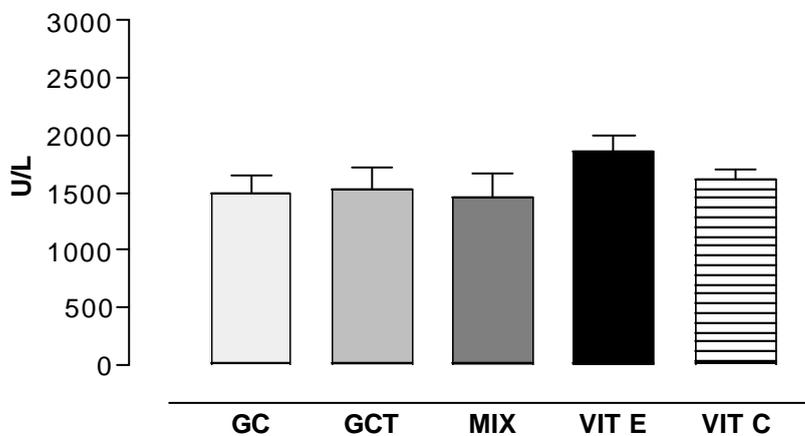
O gráfico 8 representa as concentrações séricas em repouso da CK mostrando diferença estatisticamente significativa entre o GCT e o VIT E.



**Gráfico 8** Concentrações da CK sérica no repouso. \*  $p < 0,05$  em relação ao GCT

### 5.2.4.2 Lactato Desidrogenase (LDH)

Os resultados da LDH estão representados no gráfico 9. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no repouso.



**Gráfico 9** Concentrações da LDH sérica no repouso. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

## **6- DISCUSSÃO**

## 6 - Discussão

---

Apesar de contraditórios e diversificados em razão dos inúmeros e distintos protocolos utilizados nos estudos, os resultados na literatura mostram dados relevantes e sugestivos que foram associados ao tema discutido neste trabalho.

### **6.1 Caracterização e Adaptações ao Treinamento Físico de Natação a 80% da Carga Máxima**

As adaptações ao treinamento físico são dependentes de fatores como a carga de trabalho, duração e frequência do esforço. Respostas ao treinamento incluem um aumento da capacidade cardiovascular associado a uma menor frequência cardíaca submáxima e em repouso, um aumento do volume e do peso ventricular, além de hipertrofia dos miócitos. A natação é reconhecida por ser eficiente na indução da hipertrofia miocárdica e causar significativo aumento no ventrículo esquerdo e volume diastólico final em ratos (EVANGELISTA; BRUM; KRIEGER, 2003; MEDEIROS *et al.*, 2004).

Nossos resultados apontam diferenças estatisticamente significantes do GC em relação ao GCT indicando um aumento no peso ventricular esquerdo representado pelo índice do peso ventricular, do grupo submetido ao treinamento de natação. Quanto ao ventrículo direito e o peso cardíaco relativo não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Esses resultados estão de acordo com a literatura mostrando que a adaptação ao treinamento é dependente de fatores como a carga de trabalho, duração e a frequência do treinamento, além da eficiência da natação na indução da hipertrofia do miocárdio, indicado por um aumento considerável do ventrículo esquerdo dos ratos.

Evangelista, Brum e Krieger (2003), realizaram um estudo em camundongos e natação com o objetivo de reproduzir uma hipertrofia cardíaca. Utilizaram dois protocolos diferentes, o primeiro com duração de 60 minutos/dia e o segundo com

duração de 90 minutos/dia. As cargas de trabalho foram de 2 e 4% do peso corpóreo, respectivamente, com sessões de treinamento de 1 e 2 vezes por dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas. Após 24 horas da última sessão de treinamento os camundongos foram sacrificados e os corações retirados, pesados e dissecados, para a remoção das câmaras atriais, do ventrículo direito e esquerdo, no qual foram medidos posteriormente. Concluíram que a duração e a frequência controlada do treinamento, mas não as cargas de trabalho controladas, induziram a um condicionamento de resistência substancial e hipertrofia miocárdial nos camundongos.

Medeiros *et al.*, (2004) observaram em seu estudo, em ratos, que 8 semanas de natação (5 dias/semana, 60 minutos/dia, com uma carga de trabalho de 5% do peso corporal) foram suficientes para que houvesse uma diminuição da frequência cardíaca no repouso associada a um aumento no efeito cardíaco vagal, além da indução da hipertrofia cardíaca nos animais treinados comparados ao grupo controle.

Diferenças nas respostas hemodinâmicas agudas e crônicas à natação, em ratos, tais quais, hipercapnemia e acidose, comparadas a outros tipos de exercício físico, como a corrida, são decorrentes possivelmente do papel adrenal simpático, observado às adaptações cardíacas, podendo se estender, da mesma forma, a outros tecidos como a musculatura locomotora (NAKAO *et al.*, 2000).

A natação desenvolve uma ampla diferença na resposta física e estresse mecânico por motivos como efeitos de pressão hidrostática, utilização de diferentes músculos durante a atividade, e um reduzido efeito da gravidade. Nakao *et al.*, (2000), sugerem em seu estudo que o treinamento de natação é capaz de elevar a capacidade oxidativa, verificada através de um aumento significativo da atividade da Citrato Sintase (CS) no músculo gastrocnêmio (NAKAO *et al.*, 2000).

A evolução das porcentagens de cargas máximas, observadas nos testes realizados em quatro períodos, durante as 17 semanas de treinamento, indica em nossos resultados, diferenças estatisticamente significantes no primeiro teste de carga máxima entre os grupos GC e o GCT. Esse resultado, provavelmente, está associado a fatores individuais, já que os animais ainda não haviam começado, de fato, o programa treinamento, estando todos, provavelmente, na mesma condição física.

A partir da 13ª semana do início do treinamento, quando foi realizado o terceiro teste de carga máxima, houve diferenças estatisticamente significantes do grupo GC em

relação ao GCT, ao VIT E, e ao VIT C. Esses resultados indicam que os animais com treze semanas de natação apresentavam as adaptações do treinamento, expressadas pelo aumento significativo da carga de trabalho.

Os resultados do peso comparativo entre os grupos demonstram diferenças estatisticamente significantes na primeira semana de treinamento, do grupo GC em relação ao GCT e ao MIX. Mas a partir da 5ª semana até o término do treinamento, as diferenças de peso são estatisticamente significantes do grupo GC em relação ao GCT, ao MIX, ao VIT E e ao VIT C, indicando uma manutenção do peso corpóreo inferior ao dos ratos sedentários, provavelmente por um maior gasto energético e maior utilização de gordura como substrato energético, característico de exercícios de endurance.

Esse resultado está de acordo com a literatura que relata benefícios do treinamento físico em intensidades elevadas, no controle do peso corporal (MILLER, 2004).

Um estudo realizado por Ribeiro, Mello e Gobatto (2004), comparou o efeito de 12 semanas de exercício de natação contínuo e intermitente, na perda de peso e na composição corporal de ratos induzidos a obesidade e verificaram que ambos os protocolos de treinamento, reduziram o ganho de peso corpóreo durante o experimento, comparados ao grupo controle sedentário.

## **6.2 Biomarcador de Peroxidação Lipídica – Concentrações Plasmáticas de Malondialdeído (MDA)**

O uso de nutrientes antioxidantes como as vitaminas C, E e o  $\beta$ -caroteno em atletas que treinam e competem em intensidades elevadas ou submáximas, tem sido avaliado por pesquisadores com intuito de reduzir ou minimizar o estresse oxidativo e os seus efeitos deletérios, muitas vezes limitantes ao desempenho.

Em nossos resultados não houve diferenças estatisticamente significantes nos níveis plasmáticos do MDA em repouso entre o GCT, treinado a 80 % da carga máxima e o GC, após as 17 semanas do treinamento de natação, provavelmente por uma adaptação da atividade antioxidante endógena ao treinamento.

Venditti e Meo (1997), em seu estudo realizado com ratos e natação mostraram que 10 semanas de treinamento físico foram suficientes para aumentar, significativamente, a capacidade de endurance dos animais, documentado a partir da bradicardia em repouso, comparado aos animais sedentários. A extensão das reações peroxidativas foi aumentada pelo exercício exaustivo indicado por um aumento da quantidade de MDA e dos hidroperóxidos em diferentes tecidos em ambos os grupos. Houve aumento, também na atividade das enzimas antioxidantes (GPX e GR), principalmente, no músculo e no fígado.

Miyazaki *et al.*, (2001) em seu estudo não constataram mudanças no MDA eritrocitário após um programa de 12 semanas de treinamento. Já no estudo de Santos-Silva *et al.*, (2001) foi demonstrado níveis plasmáticos do MDA, em repouso, mais elevados nos nadadores treinados do que nos indivíduos sedentários. Em contraste, Niess *et al.*, (1996) relataram níveis de MDA plasmáticos mais elevados em indivíduos não treinados comparados a indivíduos treinados.

Muitos estudos relatam que um episódio de exercício agudo aumenta as concentrações sanguíneas do MDA em situações de treinamento (DAVIES *et al.*, 1982; HARTMANN *et al.*, 1995; LOVLIN *et al.*, 1997; KOSKA *et al.*, 2000; MIYAZAKI *et al.*, 2001). Marzatico *et al.*, (1997) verificaram que as concentrações do MDA plasmáticas estavam aumentadas após 48 horas do término do exercício de velocidade, em corredores, e imediatamente após o endurance em maratonistas. Kanter *et al.*, (1988) relataram um aumento no MDA plasmático (~70%) em atletas de elite, após 80 km de prova, que posteriormente foi correlacionado com um aumento plasmático da CK e da LDH. Similarmente, Child, Wilkinson e Fallowfield (2000) encontraram um aumento de 40% no MDA imediatamente após uma meia maratona.

Indivíduos do sexo masculino não treinados que realizaram um período agudo de bicicleta num ciclo-ergômetro antes e depois de 12 semanas de um programa de treinamento intenso, apresentaram um menor aumento no MDA eritrocitário, no período de exercício pós-treino, comparado ao pré-treino. Semelhantemente, concentrações diminuídas do MDA em resposta ao exercício, também foram encontradas em esquiadores e corredores altamente treinados, imediatamente após um teste de exercício até exaustão (HUBNER-WOZNIAK *et al.*, 1994; ROKITZKI *et al.*, 1994a).

Ookawara *et al.* (2003), realizaram um teste de exercício agudo antes e no final do período de 3 meses de treinamento de natação e de corrida, em homens que se exercitavam 5 dias por semana a uma intensidade de 80 a 90 % da frequência cardíaca máxima, 2 horas por dia, e não verificaram em seus resultados mudanças nos níveis de peroxidação lipídica no repouso avaliados pelo TBA (ácido tiobarbitúrico) a partir do MDA como avaliador padrão. Entretanto, os indivíduos submetidos ao teste, avaliados logo após o exercício, apresentaram aumento nesse biomarcador de estresse.

Em nossos resultados os níveis plasmáticos do MDA em repouso foram estatisticamente significantes entre os grupos MIX e o VIT C, mostrando uma redução nas concentrações desse biomarcador nos animais que receberam a vitamina C. Esse resultado sugere um efeito antioxidante sistêmico da vitamina C a peroxidação lipídica. Apesar de não estatisticamente significativa o grupo suplementado com a-tocoferol (VIT E) também apresentou redução do MDA em relação ao grupo controle treinado (GCT) e o grupo controle (GC) sugerindo um possível efeito antioxidantes sistêmico da vitamina E contra a peroxidação lipídica.

A vitamina C por estar presente no fluido extracelular e no citosol interage diretamente com o superóxido e o radical hidroxil na fase aquosa, prevenindo lesão à membrana eritrocitária. Na membrana celular age na regeneração da vitamina E via ciclo redox vitamina C-GSH, sendo esperado que os níveis desses últimos dois antioxidantes, tenham um maior impacto na vitamina E tecidual em resposta ao treinamento (ASHTON *et al.*, 1999; JI, 1999).

O ácido ascórbico tem sido descrito como um excepcional antioxidante no plasma humano. Frei, England e Ames (1989), tem sugerido que um simples controle da suplementação com ácido ascórbico pode prevenir a formação de LH (hidroperóxidos lipídicos), responsáveis por causarem lesão aos tecidos alvos.

Em modelos animais sugere-se uma complexa relação entre o exercício, GSH e o estresse oxidativo. Liu *et al.*, (2000), mostraram em ratos que o treinamento está associado a um aumento do MDA em fibras rápidas e lentas, ao passo que, essa concentração diminui em associação com elevadas concentrações de vitamina C.

A maioria dos estudos avaliando a suplementação de vitamina E no exercício de alta intensidade relatam redução do estresse oxidativo a partir da redução do aumento de

biomarcadores (SUMIDA *et al.*, 1989; GOLDFARB *et al.*, 1994; GOLDFARB,1999; TAULER *et al.*, 2002).

Jessup *et al.*, (2003) examinaram os efeitos do exercício e da suplementação com vitamina E no estresse oxidativo em idosos. Sugeriram que o exercício em combinação com a vitamina reduziu o estresse oxidativo, melhorou a resistência aeróbia, reduziu a pressão arterial e o peso nessa população. Além disso, os participantes sedentários que foram suplementados com a vitamina E, também, apresentaram reduções significativas na pressão arterial e no estresse oxidativo.

Oliveira, Diniz e Amaya-Farfan (2003), investigaram a interação entre restrição energética crônica e suplementação com  $\alpha$ -tocoferol, em ratos *Wistar* por 5 meses, seguido do exercício exaustivo. Concluíram que o aumento do estresse oxidativo promovido pelo exercício tendeu a melhorar com as duas dietas experimentais.

Nossos resultados sugerem que a redução das concentrações do MDA no repouso do VIT C caracteriza um efeito antioxidante dessa vitamina a peroxidação lipídica no treinamento a 80 % da carga máxima. Já em associação, como no grupo que recebeu a mistura vitamínica (MIX) os valores plasmáticos permaneceram semelhantes aos grupos GC e GCT.

Kanter, Nolte e Holloszy (1993), estudaram em indivíduos do sexo masculino saudáveis, o efeito da ingestão, por 6 semanas de uma mistura de vitaminas antioxidantes (592 mg/dia de  $\alpha$ -tocoferol, 1000 mg/dia de ácido ascórbico e 30 mg/dia de  $\beta$ -caroteno), antes e após dois períodos de exercícios (30 minutos de caminhada na esteira a 60% do  $VO_2$  máx, seguido de 5 minutos de corrida em, aproximadamente 90% do  $VO_2$  máx.). Concluíram que a suplementação vitamínica não impediu o aumento na peroxidação lipídica induzida pelo exercício, mas diminuiu os níveis séricos do MDA e do pentano expirado tanto no repouso quanto depois do esforço, caracterizando um menor nível total de estresse oxidativo.

Chao *et al.*, (1999) observaram redução do pentano expirado decorrente da suplementação com antioxidantes isolados (440mg de vitamina E, 2000  $\mu$ g equivalentes de retinol (RE), 500 mg de vitamina C) ou combinados, com um adicional de selênio e zinco, administrados 2 semanas antes e durante as 2 semanas de treinamento em altitude moderada. Observaram que os peróxidos de lipídios, o MDA séricos, a

capacidade de absorvência do oxigênio radical e o 8-OHdG na urina aumentaram após o treinamento, e que a suplementação não teve efeito nesses biomarcadores.

Maxwell *et al.*, (1993) investigaram o efeito da suplementação com vitamina E e C (ambas 400 mg/dia por 3 semanas) na primeira hora após terminado o exercício. Mostraram um aumento na capacidade antioxidante e no MDA plasmático, tanto no grupo placebo, quanto no grupo tratado.

Porém, nem todos os estudos relatam aumento no MDA em resposta ao exercício. Um estudo avaliando a peroxidação lipídica em corredores após 10 a 14 minutos de exercício exaustivo no ciclo ergômetro, não verificou mudança do TBARS no soro imediatamente e após 30 minutos do fim do exercício (VIINIKKA; VUORI; YLIKORKALA, 1984 *Apud* SACHECK; BLUMBERG, 2001). Niess *et al.*, (1996) mediram as concentrações plasmáticas de MDA, no repouso, em indivíduos treinados e não treinados, antes e após um período intenso de exercício e não encontraram aumentos significativos no MDA em nenhum dos grupos avaliados, imediatamente após o teste de esteira à exaustão, 15 minutos após o teste e 24 horas depois. Indivíduos moderadamente treinados que correram por 2,5 horas em esteira, também não apresentaram alterações no MDA plasmático (DUFAUX *et al.*, 1997; DUTHIE *et al.*, 1990). Semelhantemente, não houve mudanças documentadas no repouso, nos níveis plasmáticos do MDA de atletas, antes e após 4 semanas de treino com remos em alta intensidade (DERNBACH *et al.*, 1993). Alessio *et al.*, (2000) também não relataram mudanças no MDA plasmático depois de repetidas sessões de contrações isométricas.

### **6.3 Atividade das Enzimas Antioxidantes nos Eritrócitos**

Os eritrócitos quando expostos ao incomum estresse oxidativo, sofrem modificações que podem alterar as propriedades químicas e físicas das membranas, reduzindo a sua fluidez, por modificação da composição, organização e da distribuição dos lipídeos (CAZZOLA *et al.*, 2003). Por outro lado, as defesas antioxidantes parecem ser moduladas pelo treinamento físico (MOLLER; WALLIN; KNUDSEN, 1996; BALAKRISHNAN; ANURADHA, 1998; CLARKSON ; THOMPSON, 2000) e a sua manutenção em concentrações intracelulares adequadas, contribuí para a neutralização

do aumento das EROs produzidas, incorrendo em diminuição da lesão oxidativa (SENTÜRK *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2000).

Os resultados do nosso estudo revelam diferença estatisticamente significativa nas concentrações eritrocitárias da SOD entre os grupos GCT e o MIX, indicando que a suplementação com a mistura vitamínica provavelmente, foi responsável pela redução da atividade dessa enzima no repouso, sugerindo uma maior atividade antioxidante não enzimática, capaz de proteger contra o estresse oxidativo, sem haver a necessidade de um maior aumento da SOD. Nos grupos suplementados com vitamina E e mais discretamente o VIT C, também houve diminuições nas concentrações da SOD.

Esses resultados destacam que o consumo de vitaminas antioxidantes, nesse caso, a mistura vitamínica, na atividade da SOD, em exercícios de alta intensidade foi essencial para uma maior proteção contra a formação ou contra a neutralização das EROs.

A GPX mostrou resultados estatisticamente significantes do grupo VIT C em relação ao GC, ao MIX e ao VIT E. Esses resultados sugeriram que a vitamina C sozinha não foi capaz de combater as EROs, havendo a necessidade de um aumento na atividade da GPX frente ao estresse oxidativo proposto pelo exercício. Em relação aos grupos VIT E e o MIX, os resultados foram semelhantes aos GC e ao GCT.

Esses resultados sugeriram que as vitaminas associadas (MIX) e a vitamina E (VIT E) isolada, foram capazes de diminuir o estresse oxidativo mostrado a partir de uma redução da atividade da GPX.

Os resultados da CAT foram estatisticamente significantes no grupo VIT C em relação ao GC, ao GCT, ao MIX e ao VIT E. Esses resultados indicam que o grupo que ingeriu a vitamina C apresentou valores significativamente aumentados da CAT comparados a todos os outros grupos, sugerindo um aumento na atividade dessa enzima, mais uma vez, por menor capacidade da vitamina C em neutralizar sozinha as EROs nos eritrócitos. Já a mistura vitamínica foi relacionada, como na SOD, a uma redução das concentrações da CAT no repouso, comparada aos outros grupos.

Sugere-se uma menor atividade da CAT por maior atuação das vitaminas associadas. Apesar de discretamente, a vitamina E, também foi relacionada a uma diminuição das concentrações eritrocitárias da CAT em relação ao GCT.

Os resultados indicam que após 72 horas da última sessão de treinamento os valores de todos os grupos estavam próximos ou menores que o GC, com exceção do grupo que ingeriu a vitamina C (VIT C), demonstrando uma rápida recuperação dos ratos decorrente, possivelmente, da adaptação ao treinamento de natação.

O treinamento parece ter o efeito de induzir as enzimas antioxidantes e talvez estimular a síntese de GSH, facilitando, teoricamente, a remoção das EROs durante o exercício. De qualquer modo, o exercício parece aumentar o consumo de vitamina E, e talvez de GSH, além de reduzir a concentração tecidual desses antioxidantes se o consumo dietético não for alterado. Assim, a suplementação de certos nutrientes antioxidantes parece ser justificada em indivíduos fisicamente ativos (JI, 1995; JI, 1999).

Segundo Kraus, Roth e Kirchgessner (1997), o enriquecimento da dieta com antioxidantes em combinação (Vitamina C, Vitamina E e  $\beta$ -caroteno), previne a elevada fragilidade osmótica dos eritrócitos em ratos com deficiência de zinco. A lesão oxidativa é responsável por um prejuízo na estabilidade do eritrócito, e esse quadro é piorado na deficiência desse mineral (SENTURK *et al.*, 2001).

Robertson *et al.*, (1991) compararam o estado antioxidante de corredores altamente treinados, corredores moderadamente treinados e indivíduos sedentários e mostraram uma atividade eritrocitária aumentada da vitamina E, GSH e da CAT nos corredores, e uma significativa relação entre a distância treinada semanalmente, e a atividade antioxidante enzimática. Toskulkao e Glinsukon (1996), também mostraram que corredores treinados obtiveram alta atividade enzimática eritrocitária da SOD, GPX e da CAT comparado a indivíduos não treinados.

Toskulkao e Glinsukon (1996), mostraram em indivíduos sedentários que realizaram exercício no ciclo ergômetro a 70 % das frequências cardíacas máxima, que a atividade eritrocitária da SOD e da GPX estavam diminuídas após 5 minutos, e permaneceram baixas por 48 horas, após a finalização do esforço. Já a atividade da CAT diminuiu 5 minutos após o esforço e retornou aos valores basais em 24 horas. O MDA plasmático aumentou 5 min após o exercício e permaneceu elevado por 48 horas.

Myiazaki *et al.*, (2001) examinaram a atividade eritrocitária da SOD, CAT e GPX em homens não treinados que participaram de um programa de treinamento de endurance por 12 semanas. Os indivíduos realizaram antes e após o treinamento, um

teste incremental no ciclo-ergômetro até a exaustão. Foi observado uma elevação no repouso da SOD e da GPX, mas não da CAT.

Marzatico *et al.*, (1996) relataram uma maior atividade da GPX eritrocitária no repouso em corredores de velocidade e maratonistas treinados, comparados a indivíduos sedentários. Ortenblad, Madsen e Djurhuus (1997) embora não tivessem observado diferenças significativas na GPX eritrocitária ou na atividade da GR entre os indivíduos treinados e não treinados, verificou que as atividades musculares dessas enzimas estavam mais altas nos indivíduos treinados.

Um programa de treinamento físico por 40 semanas, realizado para condicionar meio-maratonistas, resultou em um aumento significativo da atividade da GR eritrocitária (EVELO *et al.*, 1992). Uma abordagem mais modesta (5 km/dia, 6 vezes / semana por 10 semanas) resultou em aumentos significativos semelhantes (OHNO *et al.*, 1988).

Em atletas maratonistas e ciclistas foi mostrado pouca ou nenhuma mudança nas medidas da atividade da GPX eritrocitária pré e pós-corrida (ROKITZKI *et al.*, 1994b; TAULER *et al.*, 1999). Atletas treinados em intensidades moderadas diminuíram a atividade da GPX imediatamente depois de uma maratona (DUFAUX *et al.*, 1997; DUTHIE *et al.*, 1990) e retornaram aos valores basais após 1 hora do término do exercício (DUFAUX *et al.*, 1997). Os estudos acima utilizaram numerosos métodos diferentes para identificar as atividades da GPX e da GR, o que torna difícil a comparação entre os seus resultados (JENKINS, 2000).

Brites *et al.*, (1999) observaram uma maior atividade da SOD plasmática em jogadores de futebol em repouso, similar a indivíduos controles. Já Marzatico *et al.*, (1997) observaram esse aumento nos eritrócitos em corredores de velocidade e maratonistas, imediatamente após o exercício.

Alguns resultados de estudos sugerem que níveis aumentados nas atividades da SOD eritrocitária e muscular em repouso são mais freqüentes em indivíduos treinados em resposta às intervenções do exercício. Entretanto, nem todos estudos são consistentes com essas conclusões. Indivíduos sedentários não mostraram um aumento na atividade da SOD muscular após completarem um programa de ciclismo em intensidade moderada por 8 semanas (TIDUS; PUSHKARENKO; HOUSTON, 1996). Tauler *et al.*, (1999), também não encontraram mudanças na atividade da SOD

eritrocitária seguido de um duatlon de intensidade moderada em indivíduos treinados. Além disso, esquiadores de longa distância treinados que participaram de um teste progressivo na esteira até exaustão, revelaram uma diminuição nos níveis da SOD eritrocitária (HUBNER-WEZNIAK *et al.*, 1994).

A atividade da CAT em resposta a um período agudo de exercício é conflitante. Rokitzki *et al.*, (1994a) não encontraram diferenças significativas, nas concentrações da CAT eritrocitária seguida de uma maratona. Entretanto, em uma população de ciclistas treinados, após um período de exercício submáximo por 90 minutos, Aguilo *et al.*, (2000), descreveram uma diminuição na atividade da CAT eritrocitária de aproximadamente 20%. Além disso, Marzatico *et al.*, (1997) relataram que corredores de velocidade que realizavam exercícios de potência não mostraram alterações na atividade da CAT eritrocitária, mas os corredores de distância que realizaram exercício de resistência aumentaram a sua atividade em 24 e 48 h após o exercício.

Em corredores, foram documentadas relações positivas entre o treino semanal de distância e os níveis de repouso da atividade da CAT eritrocitária (OHNO *et al.*, 1988; ROBERTSON *et al.*, 1991). Com o aumento dos treinos, a produção de peróxido de hidrogênio excedeu a capacidade de seqüestro da GPX, havendo um aumento na produção da CAT como forma compensatória à sua inabilidade. Entretanto, 8 semanas de treinamento aeróbico não mostraram mudanças na sua atividade (TIDUS; PUSHKARENKO; HOUSTON, 1996).

Cazzola *et al.*, (2003) em seu estudo avaliaram no repouso diferentes marcadores de estresse oxidativo em jogadores de futebol comparados a controles. Foram medidos os lipoperóxidos plasmáticos, estimulados por cobre juntamente com antioxidantes séricos hidrossolúveis (albumina, ácido úrico e vitamina C), lipossolúveis (vitamina E e bilirrubina) e enzimáticos (SOD, GPX). A atividade da SOD estava, significativamente maior (aproximadamente 80 %) nos indivíduos treinados, comparados aos controles, enquanto que o aumento da GPX (aproximadamente 12%) não foi estatisticamente significativo. A fluidez da membrana eritrocitária foi significativamente maior no grupo treinado. Houve elevação plasmática da vitamina C e do a-tocoferol. O estresse oxidativo decorrente do maior consumo de oxigênio durante a atividade física, foi compensado pelo aumento plasmático da atividade antioxidante, provavelmente pela

alta ingestão de vitamina C e a redistribuição dos antioxidantes do tecido ao plasma, induzido pelo exercício, e a conseqüente interação entre eles.

Tauler *et al.*, (2002) analisaram em atletas jovens, os efeitos de um coquetel de vitamina E (500 mg/dia) e  $\beta$ -caroteno (30 mg/dia), além da vitamina C (1 g/dia) nos últimos 15 dias, durante 90 dias, na defesa antioxidante basal de neutrófilos. Verificaram que a suplementação aumentou significativamente a taxa de glutathione versus a glutathione dissulfida, além de intensificar a atividade da SOD e da CAT, proporcionando um aumento nas defesas antioxidantes dos neutrófilos contra auto oxidação pelo aumento na produção das EROs

Em um estudo realizado por Metin *et al.*, (2002) relataram que ratos submetidos ao treinamento de natação durante 8 semanas por 30 minutos/dia, 5 vezes por semana e suplementados com 30 mg/kg/dia de vitamina E, 5 dias na semana, 3 horas antes do exercício, comparados ao grupo controle, obtiveram valores de TBARS teciduais menores que os grupos que não receberam a vitamina, exceto no fígado. A GSH estava aumentada nos tecidos dos grupos tratados e treinados, exceto no tecido muscular. Sugeriram que a vitamina E não somente reduz a peroxidação lipídica, mas também mantém os níveis altos de GSH nesses tecidos, tendo um papel protetor e modulador ao sistema antioxidante endógeno.

Omaye *et al.*, (1996), avaliaram 9 mulheres que consumiram uma dieta pobre em carotenóides, seguido pela mesma dieta suplementada com 15mg de  $\beta$ -caroteno diariamente por 28 dias, e mostraram uma positiva correlação entre as atividades da CAT e da GPX, concluindo que a deficiência desse nutriente teve efeito no estado antioxidante dos eritrócitos. Dixon *et al.*, (1994) relataram que a atividade da SOD nos eritrócitos foi diminuída em mulheres com depleção de carotenóides. Esse quadro foi revertido após a reposição do nutriente. Em um outro estudo, Delmas-Beauvieux *et al.*, (1996) suplementaram 60mg de  $\beta$ -caroteno diariamente por 12 meses e não observaram diferenças na atividade da SOD comparada aos valores basais. Já as atividades da GPX e da GSH foram ligeiramente aumentadas comparadas aos níveis basais. Evidenciando que o  $\beta$ -caroteno pode influenciar na atividade das enzimas antioxidantes.

Castenmiller *et al.*, (1999) observaram que após 3 semanas de intervenção dietética com carotenóides, a atividade da GR foi aumentada no grupo suplementado, comparado ao grupo controle. Uma diminuída degradação das enzimas antioxidantes e

um relativo aumento na sua atividade foram vistos em decorrência do papel protetor dos carotenóides, atuando na desativação do oxigênio singlete.

#### **6.4 Concentrações Plasmáticas das Vitaminas Antioxidantes**

O resultado no repouso da concentração plasmática de  $\alpha$ -tocoferol do grupo suplementado com mistura vitamínica (MIX), mostrou aumento estatisticamente significativo em relação ao GC e ao VIT C. O VIT E apresentou concentrações plasmáticas da vitamina E aumentados em relação ao GC, ao GCT e ao VIT C, com valores bem próximos aos do MIX.

O mecanismo de aumento do  $\alpha$ -tocoferol no plasma, segundo Aguiló *et al.*, (2003) pode ser devido a sua mobilização de estoques teciduais (tecido adiposo, fígado, músculo esquelético, baço e outros tecidos) à circulação plasmática, o que reflete a sua importância na proteção contra lesão oxidativa.

Um estudo realizado com indivíduos que praticaram exercício intenso em bicicleta ergométrica e ingeriram vitamina E 12 horas antes da atividade física, mostrou que os níveis plasmáticos da vitamina E, aumentaram, significativamente, no plasma e nos eritrócitos no pós-exercício, alcançando um pico de concentração na metade do tempo do esforço, quando foi atingido o consumo máximo de oxigênio. Esses valores retornaram aos níveis controles basais, 10 minutos após a finalização do exercício e no repouso (ELSAYED, 2001).

A concentração plasmática da vitamina C apresentou menor diminuição, estatisticamente significativa nos grupos GC e no GCT em relação ao MIX, ao VIT E e ao VIT C.

Para o grupo que somente recebeu a vitamina E (VIT E), os resultados sugeriram que a vitamina C ingerida através da ração consumida diariamente, tenha tido um efeito sinérgico com a vitamina E, aumentando as suas concentrações teciduais, uma vez que, o GCT e o GC que não receberam qualquer tipo de suplemento e, portanto, não mostraram valores plasmáticos significantes, confirmando, também, que não houve produção endógena de vitamina C.

Alguns autores na literatura relatam que o exercício físico pode diminuir o *pool* tecidual de nutrientes antioxidantes como a vitamina E e a vitamina C, por transferência de um compartimento corpóreo para outro, enquanto outros, tem mostrado que a concentração plasmática de ácido ascórbico e da vitamina E são aumentadas seguido do exercício intenso

Aguiló *et al.*, (2003) em seu estudo mostraram que ciclistas profissionais bem treinados aumentaram as concentrações plasmáticas de ácido ascórbico após o exercício de endurance, comparados aos amadores que mantiveram os níveis iniciais do pré-exercício, sugerindo um efeito do exercício no aumento da concentração plasmática desse nutriente.

Em um outro estudo, foi relatado em corredores um aumento na concentração plasmática do ácido ascórbico e uma diminuição na excreção urinária de ascorbato, comparado a indivíduos sedentários. Depois de 21km de uma prova de corrida, houve um aumento de aproximadamente 27%. Após uma etapa de 170 km de ciclismo em montanha, os níveis plasmáticos de vitamina C alcançaram um aumento de 32,4% nos atletas profissionais. O aumento plasmático do ácido ascórbico após um episódio de exercício, observado após 20 e 40 minutos de recuperação foi sugerido por Rokitzki *et al.*, (1994).

O ácido ascórbico é estocado, principalmente na glândula adrenal e o seu aumento plasmático pode ser explicado pela sua liberação da glândula à corrente sanguínea, mediada pelo aumento do cortisol plasmático pós-exercício. De fato, é bem conhecido que o exercício intenso resulta em um demorado, mas significativo, aumento no cortisol plasmático. Além disso, a elevação na concentração plasmática de vitamina C, também pode ser atribuída, parcialmente a sua liberação de outros tecidos como leucócitos e eritrócitos (MASTALLOUDIS; LEONARD; TRABER, 2001; AGUILÓ *et al.*, 2003).

Gleeson, Robertson e Maughan (1987), demonstraram uma positiva correlação entre o aumento no cortisol e o aumento nos níveis de ácido ascórbico em resposta ao exercício no plasma.

O aumento plasmático do ácido ascórbico no pós-exercício, pode proteger o organismo contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício intenso, por neutralizar primariamente as EROs (radical hidroxil, anion superóxido e oxigênio singlete) ou pela

prevenção da formação das EROs formadas pelo íons metais de transição. Já as concentrações plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno, diminuem em resposta a sua ação as EROs, ou pela neutralização secundária aos radicais lipídicos (GROUSSARD *et al.*, 2003).

Gleeson, Robertson e Maughan (1987), relataram que a concentração plasmática do ácido ascórbico aumentou de 52,7mmol/L para 67mmol/L imediatamente após uma corrida de 21km. Entretanto, 24h depois da prova essa concentração diminuiu para 20% abaixo dos valores pré-exercício e permaneceram baixas nas próximas 48h. Duthie *et al.*, (1990) também mostraram que a concentração plasmática do ácido ascórbico aumentou nos 5 minutos após uma meia maratona, mas os valores retornaram ao normal 24h depois. A diminuição de 6% do volume plasmático após 5 minutos do término do exercício é questionada no aumento da concentração da vitamina.

Maxwell *et al.*, (1993) avaliaram se 400mg de vitamina C por 3 semanas poderiam alterar a resposta do MDA plasmáticos e antioxidantes no exercício. A suplementação e o exercício resultaram em um aumento na quantidade sanguínea de vitamina C, bem como na capacidade antioxidante total do grupo suplementado, comparado ao grupo controle. Não houve mudanças nos níveis de MDA decorrentes do exercício, e todos os valores foram ajustados para mudanças no volume plasmático. Os autores concluíram que a suplementação resultou em maiores concentrações teciduais da vitamina C, que são durante o exercício são liberadas na circulação.

Em relação aos níveis plasmáticos de  $\beta$ -caroteno não foi relatado diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no repouso, sugerindo que não houve necessidade de mobilização desse nutriente de outros compartimentos teciduais.

Segundo Tauler *et al.*, (2002) a suplementação dietética com mistura vitamínica (500mg de vitamina E, 30mg de  $\beta$ -caroteno e 1g de vitamina C), em atletas, durante 3 meses aumentou significativamente a concentração plasmática dessas vitaminas, enquanto que o placebo manteve os valores basais. O  $\beta$ -caroteno foi o antioxidante que mais aumentou no plasma após o período de suplementação, provavelmente por sua natureza lipossolúvel, responsável pelo seu acúmulo no organismo. Altos níveis plasmáticos de  $\beta$ -caroteno são explicados, em parte, pelo seu efeito sinérgico com a vitamina E, que age na prevenção da oxidação do  $\beta$ -caroteno. O aumento plasmático da vitamina C foi menor em relação as outras vitaminas. A natureza hidrossolúvel dessa

vitamina e a existência de mecanismos homeostáticos para regular os seus níveis plasmáticos, podem ser responsáveis por esta queda. Porém, os valores suplementados atingiram 16 vezes a recomendação diária, o que, também, pode explicar essa redução, já que valores muito acima da RDA saturam e são rapidamente excretados.

## **6.5 Indicadores de Lesão Tecidual**

### **6.5.1 Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH)**

Tem sido hipotetizado que o exercício intenso causa inflamação e pode contribuir para níveis aumentados de peroxidação lipídica, presumivelmente devido às reações dos macrófagos teciduais (URSO; CLARKSON, 2003). Indivíduos com maior aumento nos marcadores de lesão muscular (CK e LDH), apresentam maiores níveis nas concentrações de MDA sérico. Essa relação entre as enzimas musculares liberadas e os biomarcadores de estresse oxidativo podem resultar de um aumento na permeabilidade da membrana em razão da peroxidação lipídica (SACHECK; BLUMBERG, 2001).

Na literatura, os estudos tem demonstrado aumento nos níveis circulantes de CK até 4 dias após exercício excêntrico em humanos (BOYERE;GOLDFARB, 1995, KROTKIEWSKI; BRZEZINSKA, 1996; SACHECK; BLUMBERG, 2001).

Em exercícios de alta intensidades e/ ou longa duração a suplementação com antioxidantes tem demonstrado reduzir o aumento da CK e da LDH induzida pelo esforço (JACKSON, JONES E EDWARDS, 1983; THOMPSON *et al.*, 2001; MARLIN *et al.*, 2002), além de diminuir a taxa de peroxidação lipídica à capacidade total antioxidante, sugerindo uma redução no estresse oxidativo (SCHHRODER *et al.*, 2000).

Em nossos resultados houve diferença estatisticamente significativa, no repouso, entre o GCT e o VIT E. Esse resultado indica que a vitamina E reduziu as concentrações séricas da CK sugerindo um efeito protetor, principalmente, contra lesão muscular, quando comparado ao GCT. Os outros grupos suplementados apesar de não serem estatisticamente significantes, apresentaram o mesmo perfil de redução da enzima, sugerindo um efeito antioxidante das vitaminas contra lesão muscular, decorrente do

aumento da produção das EROs, induzido pelo exercício submáximo. Os resultados da LDH não foram estatisticamente significantes no repouso, mostrando níveis séricos homogêneos entre os grupos. Esse resultado indica que não havia presença de lesão muscular entre os grupos exercitados 3 dias após a última sessão de treinamento, possivelmente, pela própria adaptação ao treinamento físico, que ocasionou em uma rápida recuperação e melhora das defesas antioxidantes, provavelmente, potencializada pela suplementação com as vitaminas antioxidantes.

Cannon, Orencole e Fielding (1990), utilizaram por 48 dias a suplementação diária de 400UI de vitamina E em homens jovens (22-24 anos) comparados a homens mais velhos (55-74 anos) e verificaram que o uso do nutriente foi eficiente na redução da quantidade de CK após uma corrida de *downhill* e no período de recuperação, nos dois grupos.

Rokiitzki *et al.*, (1994a), suplementaram corredores de longa distância com 400 IU de vitamina E e 200 mg de vitamina C (ou placebo) por 4,5 semanas e verificaram uma diminuição significativa no aumento da CK comparado com o grupo placebo após a maratona, indicando menor lesão muscular em indivíduos que fizeram uso da suplementação com antioxidantes. Já no estudo de Petersen *et al.*, (2001) não foi mostrado benefícios com a combinação de 500 mg de vitamina C e 400 mg de vitamina E por 14 dias.

Sumida *et al.*, (1989) e Rokitzki *et al.*, (1994), verificaram que a suplementação prolongada com aproximadamente 300 mg/dia de vitamina E reduziu, significativamente, a atividade sérica do MDA e da CK após o exercício exaustivo.

Em exercício de resistência intenso, McBride *et al.*, (1998) suplementaram 1200 UI/dia de vitamina E e observaram uma redução da CK, 24 horas após o término do exercício, mas não observaram diferenças em relação ao MDA.

Itoh *et al.*, (2000) administraram 1200 UI/dia de vitamina E 4 semanas antes de uma prova de corrida e mostraram que a suplementação diminuiu as concentrações séricas de TBARS e da CK pré-exercício, além de reduzir o aumento da LDH no pós-exercício, comparado ao grupo placebo. Embora as atividades da CK e da LDH tenham aumentado no soro no dia seguinte a corrida, esse aumento foi menor no grupo suplementado com vitamina E. O efeito protetor da vitamina E contra as EROs,

provavelmente inibiu a lesão muscular induzida por esses radicais, decorrentes do exercício de corrida intenso.

Viguie, Packer e Brooks (1989), relataram que uma mistura vitamínica com 10 mg de  $\beta$ -caroteno, 1000 mg de vitamina C e 800 UI de vitamina E por 8 semanas ajudaram a manter a GSH plasmática e atenuar a elevação sérica da CK no pós exercício.

Palazzetti *et al.*, (2004) mostraram que a suplementação durante 4 semanas com mistura vitamínica (vitamina E, vitamina C e selênio) no treinamento normal e no exercício exaustivo, avaliadas no repouso e após o exercício, reduziu significativamente a atividade da CK em relação ao grupo placebo, confirmando, mais uma vez, o efeito da mistura antioxidante em minimizar lesões musculares.

## **7- CONCLUSÃO**

## 7 - Conclusão

---

A partir da análise dos dados do presente estudo e dos objetivos estabelecidos, pôde-se concluir que o programa de treinamento de 17 semanas de natação a 80% da carga máxima, 30 minutos por dia, 5 vezes por semana, proporcionou adaptações caracterizadas pela hipertrofia cardíaca dos grupos submetidos ao exercício e pelo aumento significativo da carga de trabalho com 13 semanas de treinamento em relação ao grupo controle. Além disso, houve manutenção do peso corporal inferior, comparado ao grupo sedentário, favorecendo o controle de peso em treinamentos com cargas de trabalho mais elevadas.

A suplementação nutricional com a vitamina C apresentou um efeito protetor contra a peroxidação lipídica, mostrado através da redução dos níveis do MDA plasmático no repouso.

Já em relação aos sistemas de defesa antioxidantes a suplementação com a mistura vitamínica seguido do a-tocoferol foi mais eficiente na proteção contra o estresse oxidativo nos eritrócitos, verificado a partir de uma redução das atividades enzimáticas da SOD, da GPX e da CAT no repouso.

A vitamina C administrada isoladamente não foi eficiente em combater as EROs nos eritrócitos como as outras vitaminas, já que houve um aumento na atividade enzimática da GPX e da CAT.

A vitamina E diminuiu os níveis séricos da CK sugerindo um efeito protetor, principalmente, contra lesão muscular, quando comparado ao grupo controle treinado.

Não houve mudanças nos níveis séricos da LDH entre os grupos exercitados, possivelmente por uma rápida recuperação e melhora das defesas antioxidantes, em decorrência do programa de treinamento, potencializado pela suplementação vitamínica.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## Referências Bibliográficas

ADAMO, A.M.; LLESUY, S.F.; PASQUINI, J.M.; BOVERIS, A. Brain Chemiluminescence and oxidative stress in hyperthyroid rats. **Biochem. J.** v.263, p.273-277, 1989.

AGUILÓ, A.; TAULER, P.; GUIX, M.P.; VILLA, G.; CÓRDOVA, A.; TUR, J.A.; PONS, A. Effect of exercise intensity and training on antioxidants and cholesterol profile in cyclists. **J. Nutr. Biochem.** v.14, p.319-325, 2003.

ALESSIO, H.M.; IN:HANNINEN, O.; PACKER, L.; SEN, C.K. **Handbook of oxidants and antioxidants in exercise.** Amsterdam: Elsevier, 2000. p.115-128.

AMAYA-FARFAN, J.; DOMENE, S.M.A.; PADOVANI, R.M. DRI: síntese das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. **Rev. Nutr.** v.14, n.1, p.71-78, 2001.

ANDERSEN, M. L.; D´ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E., TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação.** São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2004. Apoio: AFIP, FAPESP-CEPID e COBEA.

ASHTON, T.; YOUNG, I.S.; PETERS, J.R.; JONES, E.; JACKSON, S.K.; DAVIES, B.; ROWLANDS, C.C. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. **J. Appl. Physiol.** v.87, n.6, p. 2032-2036, 1999.

BALAKRISHNAN, S.D.; ANURADHA, C.V. Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. **Cell. Biochem. Funct.** v.16, n.4, p.269-275, 1998.

BANERJEE, A.K.; MANDAL, A.; CHANDA, D.; CHAKRABORTI, S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Mol. Cell. Biochem.** v.253, p.307-312, 2003.

BASKIN, C.R.; HINCHCLIFF, K.W.; DISILVESTRO, R.A.; REINHART, G.A.; HAYER, M.G.; CHEW, B.P.; BURR, J.R.; SWENSON, R.A. Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs. **Am. J. Vet. Res.** v.61, n.8, p.886-891, 2000.

BEJMA, J.; JI, L.L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** v.87, n.1, p.465-470, 1999.

BEUTLER E. Catalase In: red cell metabolism. A manual of biochemical methods.

Beutler E. (ed) New York: Grune and Stratton, 1975, 2nd ed, p.89-90.

BIOQUÍMICA DO EXERCÍCIO E TREINAMENTO. In: MAUGHAN, R.; GLEESON, M.; GREENHAFF, P.L. **Adaptação metabólica ao treinamento.** São Paulo: Manole, p.179-209, 2000.

BOYER, B.T.; GOLDFARB, A.H. Effect of eccentric exercise on DOMS, CK levels and TBARS in blood. (Unpublished data), 1995.

BOWLES, D.K.; TORGAN, C.E.; EBNER, S.; KEHRER, J.P.; IVY, J.L.; STARNES, J.W. Effects of acute, submaximal exercise on skeletal muscle vitamin E. **Free Radic. Res. Commun.** v.14, n.2, p.139-143, 1991.

BOWRY, V.W.; INGOLD, K.U.; STOCKER. Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. **R. Biochem J.** v.288, n.1, p.341-344, 1992.

BRITES, F.D.; EVELSON, P.A.; CRISTIENSEN, M.G.; NICOL, M.F.; BASILICO, M.J.; WIKINSKI, R.W.; LLESUY, S.F. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. **Clin. Sci. (Lond).** v.96, p.318-385, 1999.

CANNON, J.; ORENCOLE, S.; FIELDING, R. Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. **Am. J. Physiol.** v.259, p.R1214, 1990.

CASTENMILLER, J.J.M.; LAURIDSE, S.T.; DRAGSTED, L.O.; HOF, K.H.; LINSSEN, J.P.H.; WEST, C.E.  $\beta$ -caroteno does not change markers of enzymatic and nonenzymatic antioxidant activity in human blood. **J. Nutr.** v.129, p.2162-2169, 1999.

CAZZOLA, R.; RUSSO-VOLPE, S.; CERVATO, G.; CESTARO, B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in Professional soccer players and sedentary controls. **Eur. J. Clin. Investigation.** v.33, p.924-930, 2003.

CHANCE, B.; SARONIO, C.; LEIGH Jr, J.S. Functional intermediates in the reaction of membrane bound cytochrome oxidase with oxygen. **J. Biol. Chem.** v.250, p.9226-9237, 1975.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** v.59, p.527-605, 1979.

CHAO, W.H.; ASKEW, E.W.; ROBERTS, D. E.; WOOD, S.M.; PERKINS, J.B.

Oxidative stress in humans during work at moderate altitude. **J. Nutr.** v.129, p.2009-2012, 1999.

CHILD, R.B.; WILKINSON, D.M.; FALLOWFIELD, J.L. Effects of a training taper on tissue damage indices, serum antioxidant capacity and half-marathon running performance. **Int. J. Sports Med.** v.21, p.325-331, 2000.

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am. J. Clin. Nutr.** v.72, p.637S-646S, 2000.

COHEN, G.; HEIKKILA, H. The generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid and related cytotoxic agents. **J. Biol. Chem.** v.249, p.2447-2450, 1974.

COOPER, C.E.; VOLLAARD, N.B.; CHOUEIRI, T.; WILSON, M.T. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.** v.30, n.2, p.280-285, 2002.

CORNELLI, U.; TERRANOVA, R.; LUCA, S.; CORNELLI, M.; ALBERTI, A. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the d-ROMs test as a marker of oxidative stress. **J. Nutr.** v.131, p.3208-3211, 2001.

CORREIA, M.I. Antioxidação – O papel das vitaminas. **Rev. Bras. Nutr. Clin.** v.16, n.2, p.74-78, 2001.

COYLE, E.F. Physical activity as a metabolic stressor. **Am. J. Clin. Nutr.** v.72, p.512S-520S, 2000.

DAVIES, K.J.A.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G.A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.107, p.1198-1205, 1982.

DAWSON, C.A.; HOVARTH, S.M. Swimming in small laboratory animals. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.2, p.51-78, 1970.

DELMAS-BEAUVIEUX, M.C.; PEUCHANT, E.; COUCHOURON, A.; CONSTANS, J.; SERGEANT, C.; SIMONOFF, M.; PELLEGRIN, J.L.; LENG, B.; CONRI, C.; CLERC, M. The enzymatic antioxidant system in blood and glutathione status in human immunodeficiency virus (HIV)- infected patients: effects of supplementation with selenium or beta-carotene. **Am. J. Clin. Nutr.** v.64, p.101-107, 1996.

DEMOPULOS, H. B.; SANTOMIER, J. P.; SELIGMAN, M. L.; PIETRONIGRO, D.

D. Free radical pathology: rationale and toxicology of antioxidants and

other supplements in sports medicine and exercise science. Katch, F. I., (ed). **Sports, Health and Nutrition. Champaign, IL: Human Kinetics Publishers.** p.139-189, 1986.

DERNBACH, A.R.; SHERMAN, W.M.; SIMONSEN, J.C.; FLOWERS, K.M.; LAMB, D.R. No evidence of oxidant stress during high intensity rowing training. **J. Appl. Physiol.** v.74, n.5, p.2140-2145, 1993.

DIPLOCK, A.T. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. **Am. J. Clin. Nutr.** v.53, p.189S-193S, 1991.

DIXON, Z.R.; BURRI, B.J.; CLIFFORD, A.; FRAKEL, E.N.; SCHNEEMAN, B.O.; PARKS, E.; KEIM, N.L.; BARBIERI, T.; WU, M.M.; FONG, A.K.H.; KRETSCH, M.J.; SOWELL, A.L.; ERDMAN, J.W.Jr. Effects of a carotene-deficient diet on measures of oxidative susceptibility and superoxide dismutase activity in adult women. **Free Radic. Biol. Med.** v.17, p.537-544, 1994.

DRAPER, H.H.; SQUIRES, E.J.; MAHMOOCH, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid method for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Rad. Biol. Med.** v.15, p.353-363, 1993.

DUFAUX, B.; HEINE, O.; KOTHE, A.; PRINZ, U.; ROST, R. Blood glutathione status following distance running. **Int. J. Sports Med.** v.18, p.89-93, 1997.

DUTHIE, G.G.; ROBERTSON, J.D.; MAUGHAN, R.J.; MORRICE, P.C. Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. **Arch. Biochem. Biophys.** v.282, p.78-83, 1990.

ELSAYED, N.M. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. **Nutrition.** v.17, p.828-834, 2001.

EVANGELISTA, F.S.; BRUM, P.C.; KRIEGER, J.E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.36, p.1751-1759, 2003.

EVANS, W. Vitamin E, vitamin C, and exercise. **Am. J. Clin. Nutr.** v.72, p.647S-652S, 2000.

EVELO, C.T.; PALMEN, N.M; ARTUR, Y.; JANSSEN, G.M. Changes in blood glutathione concentrations and in erythrocyte glutathione reductase and glutathione S-transferase activity after running training and after participation in contests. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.64, p.354-358, 1992.

FIELDING, R.A.; MEYDANI, M. Exercise, free radical generation, and aging. **Aging Clin. Exp. Res.** v.9, p.12-18, 1997.

FREI, B.L.; ENGLAND, L.; AMES, B. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.86, p.6377-6381, 1989.

GALIZIA, M.S.; WAITZBERG, D.L. Mecanismos de ação dos radicais livres e antioxidantes. **Rev. Bras. Nutr. Clin.** v.16, n.2, p.79-89, 2001.

GIRTEN, B., C. OLOFF, P. PLATO, E. EVELAND, A.J. MEROLA and L.KAZARIAN. Skeletal muscle antioxidant enzyme levels in rat after simulated weightlessness, exercise and dobutamine. **Physiologist.** v.32, p.S59-S60, 1989.

GANDRA, P.G.; ALVES, A.A.; MACEDO, D.V.; KUBOTA, L.T. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Quim. Nova.** v.27, n.6, p.980-985, 2004.

GLEESON, M.; ROBERTSON, J.D.; MAUGHAN, R.J. Influence of exercise on Ascorbic acid status in man. **Clin. Sci.** v.73, p.501-505, 1987.

GOLDFARB, A.H.; McINTOSH, M.K.; BOYER, B.T.; FATOUROS, J. Vitamin E Effects on indexes of lipid peroxidation in muscle from DHEA-treated and exercised rats. **J. Appl. Physiol.** v.76, p.1630-1635, 1994.

GOLDFARB, A.H. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. **Can. J. Appl. Physiol.** v.24, n.3, p.249-266, 1999.

GROUSSARD, C.; MACHEFER, G.; RANNOU, F.; FAURE, H.; ZOUHAL, H.; SERGENT, O.; CHEVANNE, M.; CILLARD, J.; GRATAS-DELAMARCHE, A. Physical fitness and plasma non-enzymatic antioxidant status at rest and after a wingate test. **Can. J. Appl. Physiol.** v.28, n.1, p.79-92, 2003.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **Am. J. Clin. Nutr.** v.57, n.5, p.715S-724, 1993.

HAMMEREN, J.; POWERS, S.; LAWLER, J.; CRISWELL, D.; LOWERNTHAL, D.; POLLOCK, M. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle oxidative and antioxidant enzyme activity in senescent rats. **Int. J. Sports Med.** v.13, p.412-416, 1993.

HAN, D.; LOUKIANOFF, S.; McLAUGHLIN, L.; IN:HANNINEN, O.; PACKER, L.; SEN, C.K.; **Handbook of oxidants and antioxidants in exercise.** Amsterdam: Elsevier, 2000. p.433-484.

HARRIS, E.D. Regulation of antioxidant enzymes. **FASEB J.** v.6, p.2675-2683, 1992.

HARTMANN, A.; NIESS, A.M.; GRUNERT-FUCHS, M.; POCH, B.; SPEIT, G.

Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. **Mutat. Res.** v.346, n.4, p.195-202, 1995.

HEATON, P.R.; REED, C.F.; MANN, S.J.; RANSLEY, R.; STENVENSON, J., CHARLTON, C.J.; SMITH, B.H.E.; HARPER, E.J.; RAWLINGS, J.M. Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs. **J. Nutr.** v.132, p.1720S-1724S, 2002.

HILL, K.E.; BURK, R.F.; LANE, J.M. Effect of selenium depletion and repletion on plasma glutathione and glutathione-dependent enzymes in the rat. **J. Nutr.** v.117, p.99-104, 1987.

HUANG, H.; APPEL, L.J.; CROFT, K.D.; MILLER III, E. R.; MORI, T.A.; PUDDEY, I.B. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. **Am. J. Clin. Nutr.** v.76, p.549-55, 2002.

HUBNER-WOZNIAK, E.; PANCZENKO-KRESOWKA, B.; LERCZAK, K.; POSNIK, J. Effects of graded treadmill exercise on the activity of blood antioxidant enzymes, lipid peroxides and nonenzymatic anti-oxidants in long-distance skiers. **Biol. Sport.** v.11, n.4, p.217-226, 1994.

IBRAHIM, W.; LEE, U.; YEH, C.; SZABO, J.; BRUCKNER, G.; CHOW, C. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron. **J. Nutr.** v.127, p.401-1406, 1997.

ITOH, H.; OHKUWA, T.; YAMAZAKI, Y.; SHIMODA, T.; WAKAYAMA, A.; TAMURA, S.; YAMAMOTO, T.; SATO, Y.; MIYAMURA, M. Vitamin E supplementation attenuates leakage of enzymes following 6 successive days of running training. **Int. J. Sports Med.** v.21, n.5, p.369-374, 2000.

JACKSON, M.J. Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation? **Proc. Nutr. Soc.** v.58, n.3, p.673-676, 1999.

JACKSON, M.J.; JONES, D.A.; EDWARDS, R.H.T. Biology of vitamin E. In: R. Porter and J. Wheelan (Eds). Proceedings of a ciba foundation symposium.

**London:Pittman Medical Ltd.** p.224-239, 1983.

JENKINS, R.R. Exercise, oxidative stress and antioxidant: a review. **Int. J. Sports Nutr.** v.3, p.356-375, 1993

JESSUP, J.V.; HORNE,C.; YARANDI, H.; QUINDRY, J. The effects of endurance exercise and vitamin E on oxidative stress in the elderly. **Biol Res. Nurs.** v.5, n.1, p.47-55, 2003.

Jl, L.L.; Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. **Free Radic. Biol. Med.** v.18, n.6, p.1079-1086, 1995.

Jl, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **P.S.E.B.M.** v.222, p.283-292, 1999.

Jl, L.L.; DILLON, D.; WU, E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. **Am. J. Physiol.** v.258, p.R918-R923, 1990.

Jl, L.L.; FU, R.; MITCHELL, E.W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. **American Physiol. Society.** v.1854-1859, 1992.

KANTER, M.M.; LEMES, G. R.; KAMISKY, L.A.; HAM-SAEGER, J.L.; NEQUIM, N.D. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.57, p.60-63, 1988.

KANTER, M.M.; NOLTE, L.A.; HOLLOSZY, J.O. Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. **Appl. Physiol.** v.74, n.2, p.965-969, 1993.

KEANEY, J.F.JR.; GAZIANO, J.M.; XU, A.; FREI, B.; CURRAN-CELENTANO, J.; SHWAERY, G.T.; LOSCALZO, J.; VITA, J.A. Low-dose alpha-tocopherol improves

and high-dose alpha-tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbits. **J. Clin. Invest.** v.93, n.2, p.844-851, 1994.

KNIGHT, J.A.; PIEPER, R.K.; McCLELLAN, L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. **Clin Chem.** v.34, p.2433-2438, 1988.

KOHNO, H.; FURUKAWA, S.; NAITO, H.; MINAMITANI, K.; OHMORI, D.; YAMAKURA, F. Contribution of nitric oxide, angiotensin II and superoxide dismutase to exercise-induced attenuation of blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Heart J.** v.43, p.25-34, 2001.

KOSKA, J.; BLAZICEK, P; MARKO, M.; GRNA, J.D.; KVETNANSKY, R.; VIGAS, M. Insulin, catecholamines, glucose and antioxidant enzymes in oxidative damage during different loads in healthy humans. **Physiol. Res.** v.49, p.S95-S100, 2000.

KRAUS, A.; ROTH, H.-P.; KIRCHGESSNER, M. Supplementation with vitamin C, vitamin E or  $\beta$ -carotene influences osmotic fragility and oxidative damage of erythrocytes of zinc-deficient rats. **J.Nutr.** v.127, p.1290-1296,1997.

KROTKIEWSKI, M.; BRZEZINSKA, Z. Lipid peroxides production after strenuous exercise and in relation to muscle morphology and capillarization. **Muscle Nerve.** v.19, p.1530, 1996.

KUMAR, C. T., V. K. REDDY, M. PLASAD, K. THYAGARAJU, and P.

REDDANNA. Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. **Mol. Cell. Biochem.** v.111, p.109-115,1992.

LACHANCE, P.A.; NAKAT, Z.; JEONG, W. Antioxidants: an integrative approach.

**Nutrition.** v.17, p.835-838, 2001.

LEEUWENBURGH, C; HEINECKE, W. Oxidative stress and antioxidants in exercise.]

**Current Med. Chem.** v.8, p.829-838, 2001.

LEEUVENBURGH, C.; JI, L.L. Glutathione and glutathione ethyl ester supplementation of mice alter glutathione homeostasis during exercise. **J. Nutr.** v.128, p.2420-2426, 1998.

LITTLE, R.E.; GLADEN, B.C. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. **Reprod.Toxicol.** v.13, p.347-352, 1999.

LIU, J.; YEO, H.C.; ÖVERVIK-DOUKI, E.; HAGEN, T.; DONIGER, S.J.; CHU, D.W.; BROOKS, G.A.; AMES, B.N. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **J. Appl. Physiol.** v.89 p.21-28, 2000.

LOPACZYNSKI, W.; ZEISEL, S.H. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. **Nutr. Res.** v.21, p.295-307, 2001.

LOVLIN, R.; COTTLE, W.; PYKE, I.; KAVANAGH, M.; BELCASTRO, AN. Are indices of free radical damage related to exercise intensity. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.** v.56, n.3, p.313-316, 1997.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein Measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v.193, p.265-275, 1951.

MARLIN, D.J.; FENN, K.; SMITH, N.; DEATON, C.D.; ROBERTS, C.A.; HARRIS, P.A.; DUNSTER, C.; KELLY, F.J. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. **J. Nutr.** v.132, p.1622S-1627S, 2002.

MARSHALL, R.J.; SCOTT, K.C.; HILL, R.C.; LEWIS, D.D.; SUNDSTROM, D.; JONES, G.L.; HARPER, J. Supplemental vitamin C appears to slow racing greyhounds. **J. Nutr.** v.132, p.1616S-1621S, 2002

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, p. 235-239, 1997.

MASTALOUDIS, A.; LEONARD, S.W.; TRABER, M.G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. **Free Radic. Biol. Med.** v.31, n.7, p. 911-922, 2001.

MATAIX, J.; QUILES, J.L.; HUERTAS, J.R.; BATTINO, M.; MAÑAS, M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. **Free Radic. Biol. Med.** v.24, n.4, p.511-521, 1998.

MAXWELL, S.R.J., JAKEMAN, P.; THOMASON, H.; LEGUEN, C.; THORPE, G.H.G. Changes in plasma antioxidant status during eccentric exercise and the effect of vitamin supplementation. **Free Radic. Biol. Med.** v.19, p.191-202, 1993.

McBRIDE, J.M.; KRAEMER, W.J.; TRIPLETT-McBRIDE, T.; SEBASTIANELLI, W. Effect of resistance exercise on free radical production. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.30, n.1, p.67-72, 1998.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. **J. Biol. Chem.** v.224, p.6049-6055, 1969.

MECANISMOS DA AÇÃO *SCAVENGER* – A PROTEÇÃO ANTIOXIDANTE. In: SIGNORINI, J.L.; SIGNORINI, S.L. **Atividade física e radicais livres: aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos.** São Paulo: Ícone, 1993. p.95-116.

MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E.M.; GIANOLLA, R.; CASARINI, D.E.; NEGRÃO, C.E.; BRUM, P.C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.37, p.1909-1917, 2004.

MEHTA, J.; LI, D.; MEHTA, J.L. Vitamins C and E prolong time to arterial thrombosis in rats. **J. Nutr.** v.129, p.109-112, 1999.

MENA, P., M. MAYNAR, J. M. GUTIERREZ, J MAYNAR, J. TIMON, and J. E.

CAMPILLO. Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers.

Adaptation to training. **Int. J. Sports Med.** v.12, p.563-566, 1991.

METIN, G.; ATUKEREN, P.; GÜMÜSTAS, M.K.; BELCE, A.; KAYSERILIOGLU, A. The effect of vitamin E treatment on oxidative stress generated in trained rats. **J. Exp. Med.** v.198, p.47-53, 2002.

MEYDANI, M.; EVANS, W.J.; HANDELMAN, G.; BIDDLE, L.; FIELDING, R.A.; MEYDANI, S.N.; BURRILL, J.; FIATARONE, M.A.; BLUMBERG, J.B.; CANNON, J.G. Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. **Am. J. Physiol.** v.264, p.R992-R998, 1993.

MILLER, W.C. Exercise as a treatment for obesity. **Health At Every Size.** p.51-53, 2004.

MISTA, H.L.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. **J. Appl. Physiol.** v.247, p.6960-6964, 1972.

MIYAZAKI, H.; OH-ISHI, S.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; TOSHINAI, K.; HA, S.; HAGA, S.; JI, L.L.; OHNO, H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.84, n.1-2, p.1-6, 2001.

MOLLER, P.; WALLIN, H.; KNUDSEN, L.E. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. **Chemico-Biological Interactions.** v.102, p.17-36, 1996.

NAKAO, C.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; OH-ISHI, S.; MIYAZAKI, H.; HAGA, S.; SATO, Y.; JI, L.L.; OHNO, H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. **J. Appl. Physiol.** v.88, p.649-654, 2000.

NAVARRO-ARÉVALO, A.; SANCHEZ, P.M.J. Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and soleus muscle tissues of rats. **Mech. Ageing Dev.** v.104, p.91-102, 1998.

NAVARRO-ARÉVALO, A.; CAÑAVATE, C.; SÁNCHEZ-DEL-PINO, M.J. Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training. **Mech. Ageing Dev.** v.108, p.207-217, 1999.

NISS, A.M.; HARTMANN, A.; FUCHS-GRUNERT, M.; POCH, B.; SPEIT, G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. **Int. J. Sports Med.** v.17, p.397-403, 1996.

NISHIYAMA, Y.; IKEDA, H.; HARAMAKI, N.; YOSHIDA, N.; IMAIZUMI, T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. **Am. Heart J.** v.135, n.1, p.115-120, 1998.

NUTRIÇÃO E SAÚDE: COMO FAZER ESCOLHAS SENSATAS EM DIETAS E NUTRIÇÃO. In: BITTENCOURT, J.A. **Antioxidantes e radicais livres.** São José dos Campos: J.A. Bittencourt, 2002. p.143-153.

OH-ISHI, S.; KIZAKI, T.; NAGASAWA J.; IZAWA, T.; KOMABAYASHI, T.; NAGATA, N.; SUZUKI, N.; TANIGUCHI, N.; OHNO, H. Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. **Clin. Exp. Pharmacol.Physiol.** v.24, p.326-332, 1997.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Analytical Biochem.** v.95, p.351-358, 1979.

OHNO, H.; YAHATA, T.; SATO, Y.; YAMAMURA, K.; TANIGUCHI, N. Physical training and fasting erythrocyte activities of free radical scavenging enzyme systems in sedentary men. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.57, p.173-176, 1988.

OLIVEIRA, S.L.; DINIZ, D.B.; AMAYA-FARFAN, J. Carbohydrate-energy restriction may protect the rat brain against oxidative damage and improve physical performance. **British J. Nutr.** v.89, n.1, p.89-96, 2003.

OMAYE, S.T.; BURRI, B.J.; SWENDSEID, M.E.; HANNING, S.M.; BRIGGS, L.A.; BOWEN, H.T.; OTA, R.B. Blood antioxidant changes in young women following beta-carotene depletion and repletion. **J. Am. Coll. Nutr.** v.15, p.469-474, 1996.

OOKAWARA, T; HAGA, S.; HA, S.; OH-ISHI, S.; TOSHINAI, K.; KIZAKI, T.; JI, L.L.; SUZUKI, K.; OHNO, H. Effects of endurance training on three superoxide dismutase isoenzymas in human plasma. **Free Radic. Res.** v.37, n.7, p.713-719, 2003.

ORTENBLAD, N.S.; MADSEN, K.; DJURHUUS, M.S. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. **Am. J. Physiol.** v.272, n.41, p.R1258-R1263, 1997.

OSORIO, R.A.L.; CHRISTOFANI, J.S.; D'ALMEIDA, V.;RUSSO, A.K.; PIÇARRO, I.C. Free Radicals in Pregnant Rats: Effects of Exercise and Thermal Stress. **Comp. Biochem. Physiol.** v.135, n.1, p.89-95, 2003 a.

OSORIO, R.A.L.; SILVEIRA, V.L.F.; MALDJIAN, S.; MORALES JR, A.; CHRISTOFANI, J.S.; RUSSO, A.K.; PIÇARRO, I.C. Swimming of pregnant rats at different water temperatures. **Comp. Biochem. Physiol.** v.135, n.4, p.605-611, 2003 b.

PACKER, L. Vitamin E, physical exercise, and tissue damage in animals. **Med. Biol. Helsinki.** v.62, p.105-109, 1984.

PALAZZETTI, S.; ROUSSEAU, A.S.; RICHARD, M.J.; FAVIER, A.; MARGARITIS, I. Antioxidant supplementation preserves antioxidant response in physical training and low antioxidant intake. **Br. J. Nutr.** v.91, n.4, p.655-656, 2004.

PENTEADO, M.D.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e Analíticos.** Barueri, SP: Manole, 2003.

PETERSEN, E.W.; OSTROWSKI, K.; IBFELT, T.; RICHELLE, M.; OFFORD, E.;

HALKJAER-KRISTENSEN, J.; PEDERSEN, B. Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise. **Am. J. Physiol.** v.280, p.C1570-C1575, 2001.

POWERS, S.K.; LENNON, S.L. Analysis of cellular response to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. **Proc. Nutr. Soc.** v.58, p.1025-1033, 1999.

REEVES, P.G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76 A diet. **J. Nutr.** v.127, p.838S-841S, 1997.

RIBEIRO, B.L.; MELLO, M.A.; GOBATTO, C.A. Continuous and intermittent exercise: effects of training and detraining on body fat in obese rats. **Arch. Latinoam. Nutr.** v.54, n.1, p.58-65, 2004.

ROBERTSON, J. D.; MAUGHAN, R. J.; DUTHIEP, G.C.; MORRICE, C. Increase blood antioxidant systems of runners in response to training load. **Clin. Sci.** v.80, p.611-618, 1991.

RODRIGUES, H.G.; DINIZ, Y.S.; FAINE, L.A.; ALMEIDA, J.A.; FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração de colesterol-HDL. **Rev. Nutr. Campinas.** v.16, n.3, p.315-320, 2003.

ROKITZKI, L.; LOGEMANN, E.; SAGREDOS, A.N.; MURPHY, M.; WETZEL-ROTH, W.; KEUL, J. Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress. **Acta Physiol. Scand.** v.151, p.149-158, 1994(a).

ROKITZKI, L.; LOGEMANN, E.; HUBER, G.; KECK, E.; KEUL, J.  $\alpha$ -Tocoferol supplementation in racing cyclists during extreme endurance training. **Int. J. Sport Nutr.** v.4, p.253-264, 1994 b.

SACHECK, J.M.; BLUMBERG, J.B. Role of vitamin E and oxidative stress in exercise. **Nutrition**. v.17, p.809-814, 2001.

SALO, D.C.C.; DONOVAN, M.; DAVIES, K.J.A. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart and liver, during exercise. **Free Radic. Biol. Med.** v.11, p.239-246, 1991.

SCHIPPINGER, G.; WONISCH, W.; ABUJA, P.M.; FANKHAUSER, F.; WINKLHOFER-ROOB, B.M.; HALWACHS, G. Lipid peroxidation and antioxidant status in professional american football players during competition. **Eur. J. Clin. Investigation**, v.32, p.686-692, 2002.

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.

SCHRÖDER, 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.** v.21, p.146-150, 2000.

SCHRÖDER, E.; NAVARRO, E.; MORA, J.; GALIANO, D.; TRAMULLAS, A. Effects of  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -caroteno and ascorbic acid on oxidative, hormonal and enzymatic exercise stress markers in habitual training activity of professional. **Eur. J. Nutr.** v.40, p.178-184, 2001.

SELMAN, C.; McLAREN, J.S.; COLLINST, A.R.; SPEAKMAN, J.R. Voluntary exercise has only limited effects on activity of antioxidant enzymes and does not cause oxidative damage in a small mammal. **J. Nutr.** v.132, p.1784S-1786S, 2002.

SEN, C.K. Antioxidants in exercise e nutrition. **Sports Med.** v.31, n.13, p.891-908, 2001.

SENTÜRK, Ü.K.; G Ü NDÜZ, F.; KURU, O.; AKTEKIN, M.R.; KIPMEN, D.; YALCIN, Ö.; BOR-KÜÇÜKATAY, M.; YESILKAYA, A.; BASKURT, O.K. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. **J. Appl. Physiol.** v.91, p.1999-2004, 2001.

SHARPE, P.C.; DULY, E.B.; MAC AULEY, D.; McCRUM, E.E.; MULHOLLAND, C.; STOTT, G.; BOREHAM, C.A.G; KENNEDY, G.; EVANS, A.E.; TRINICK, T.R. Total radical trapping antioxidant potential (TRAP) and exercise. **Q. J. Med.** v.89, p.223-228, 1996.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters.** v.103, p.287-290, 1979.

SILVA, C.R.M.; NAVES, M.M.V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. **Rev. Nutr.Campinas.** v.14, n.2, p.135-143, 2001.

STARNES, J.W.; CANTU, G.; FARRAR, R.P.; KEHRER, J.P. Skeletal muscle lipid peroxidation in exercise and food-restricted rats during aging. **J. Appl. Physiol.** v.67, p.69-75, 1989.

SUMIDA, S., K. TANAKA, H. KITAO, and F. NAKADOMO. Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. **Int. J. Biochem.** v.21, p.835-838, 1989.

SVENSSON, M.B.; EKBLÖM, B.; COTGREAVE, I.A.; NORMAN, B.; SJÖBERG, B.; EKBLÖM, Ö.; SJÖDIN, B.; SJÖDIN, A. Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. **Acta Physiol. Scand.** v.176, p.43-56, 2002.

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 athlete. **Eur. J. Physiol.** v.443, p.791-797, 2002.

TIIDUS, P.M.; PUSHKARENKO, J.; HOUSTON, M.E. Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle. **Am. J. Physiol.** v.271, p.R832-R836, 1996.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochem.** v.27, p.502-522, 1969.

THOMPSON, D.; WILLIAMS, C.; KINGSLEY, M.; NICHOLAS, C.W.; LAKOMY, H.K.; McARDLE, F.; JACKSON, M.J. Muscle soreness and damage parameters after prolonged intermittent shuttle-running following acute vitamin C supplementation. **Int. J. Sports Med.** v.22, n.1, p.68-75, 2001.

TOSKULKAO, C.; GLINSUKON, T. Endurance exercise and muscle damage: relationship to lipid peroxidation and scavenging enzymes in short and long distance runners. **Jpn J. Phys Fitness Sports Med.** v.45, p.63-70, 1996.

UENO, N.; OH-ISHI, S.; KIZAKI, T.; NISHIDA, M.; OHNO, H. Effects of swimming training on brown-adipose-tissue activity in obese ob/ob mice:GDP binding and UCP m-RNA expression. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** v.95, p.92-104, 1997.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology.** v.189, p.41-54, 2003.

VENDITTI, P.; MEO, D. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. **Int. J. Sports Med.** v.18, p.497-502, 1997.

VENDITTI, P.; MASULLO, P.; DI MEO, S. Effect of exercise duration on characteristics of mitochondrial population from rat liver. **Arch. Biochem. Biophysics.** v.368, p.112-120, 1999.

VENDITTI, P.; PIRO, M.C.; ARTIACO, G.; DI MEO, S. Effect of exercise on tissue anti-oxidant capacity and heart electrical properties in male and female rats. **J. Appl. Physiol.** v.74, p.322-329, 1996.

VIGUIE, C.A.; FREI, B.; SHIGENAGA, M.; AMES, B.N.; PACKER, L.; BROOKS, G.A. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. **J. Appl. Physiol.** v.75, p.566-572, 1993.

VIGUIE, C.; PACKER, L.; BROOKS, G.A. Antioxidant supplementation affects indices of muscle trauma and oxidant stress in human blood during exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.21, p.S16, 1989.

VIINIKKA, L.; VUORI, J.; YLIKORKALA, O. Lipid peroxides, prostacyclin, and thromboxane A2 in runners during acute exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.16, n.3, p.275-277, 1984.

VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R.. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.35, p.1389-1394, 2002.

WEDEKIND, K.J.; ZICKER, S.; LOWRY, S.; PAETAU-ROBINSON, I. Antioxidant status of adult beagles is affected by dietary antioxidant intake. **J. Nutr.** v.132, p.1658S-1660S, 2002.

WILMORE, J.H.; COSTILL, D.L. **Fisiologia do Esporte e do Exercício.** 2 ed. São Paulo: Manole, 2003. P.184-195; 274-303; 616-624.

WITT, E. H.; REZNICK, A.Z.; VIGUIE, C.A.; STARKE-REED, P.; PACKER, L. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. **J. Nutr.** v.122, p.766-773, 1992.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physical Rev.** v.74, p.139-162, 1994.

ZWART, L.L.; MEERMAN, J.H.N.; COMMANDEUR, J.N.M.; VERMEULEN, N.P.E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Rad. Biol. Med.** v.26, n.1/2, p.202-226, 1999.

## **ANEXOS**

## **Anexo A**

Informações nutricionais da ração consumida pelos ratos durante o experimento

S 6504-5

# LABCIL

## RAÇÃO PARA ANIMAIS DE LABORATÓRIO

### Indicação do Produto

Ração para animais de laboratório.

### Níveis de Garantia (por kg do produto)

Umidade (máx).....	12,50%	Extrato Etéreo (mín).....	4,00%
Proteína Bruta (mín).....	22,00%	Cálcio (Ca) (máx).....	1,40%
Matéria Mineral (máx).....	10,00%	Fósforo (P) (mín).....	0,80%
Matéria Fibrosa (máx).....	8,00%		

### Enriquecimento por kg do produto

Antioxidante 100,00mg, colina 600,00mg, cobre 10,00mg, cobalto 1,50mg, ferro 50,00mg, Iodo 2,00mg, Manganês 60,00mg, Selênio 0,05mg, zinco 60,00mg, Vit. A 12000 UI, Vit. B12 20,00mcg, Vit. D3 1800UI, Vit. E 30,00mg, Vit. B1 5,00mg, Vit B6 7,00mg, Vit K3 3,00mg, niacina 60,00mg, Vit. B2 6,00mg, Biotina 0,05mg, ácido pantotênico 20,00mg, ácido fólico 1,00mg, Metionina 300,00mg, Lisina 100mg.

### Composição Básica do Produto

Carbonato Cálcio, milho integral moído, farelo de arroz, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, melão, cloreto de sódio (sal comum), óleo de soja degomado, premix mineral vitamínico.

### Eventuais Substitutos:

Farelo de algodão, farelo de gluten de milho - 60, glúten milho, sorgo integral moído e farinha de carne.

### Modo de Usar

De acordo com a finalidade da criação.

### Modo de Conservação

Armazenar em ambiente seco e arejado sobre estrados, afastados de paredes e devidamente embalado.

**Validade:** 3 (três) meses após a data de fabricação, observadas as condições de conservação.

SGH INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.

### USO PROIBIDO NA ALIMENTAÇÃO DOS RUMINANTES

Rótulo registrado no Ministério da Agricultura sob o nº SP-05055 00237

### Data de Fabricação:

08 JUL 2003

## **Anexo B**

Certificados de análise das vitaminas antioxidantes, fornecidos pelas farmácias de manipulação.

# Certificado de Análise



Material: Vitamina E Po 75 HP  
 Código: 04835673-11  
 Quant: 220 kg

Lote: WB00113471  
 Lote de inspeção: 50000012150  
 Data de manufatura: 30.11.2003  
 Data de validade: 30.11.2006

Teste	Resultado	Limite		Unidade
		Min	Max	
Certificado de Análise	Corresponde	-	-	-
Validade	Corresponde	-	-	-
Inspeção Visual (embalagem)	Corresponde	-	-	-

**Obs.:**

Este lote foi analisado e liberado por nosso Departamento de Controle de Qualidade e se encontra dentro das especificações dadas acima.

**Aprovado**

Edmilson Fernando Caleolari

WB00113471/0001-511  
 30/11/2003  
 05/03/2006

# DRY VITAMIN E 75HP EXPORT

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

Productcode : 0483567  
 Lot No. : WB00113471  
 Analysis No. : 05066063

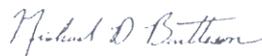
Test	Result	Limits / Specifications	Dimension / Units
<b>APPEARANCE</b> APPEARANCE	SPHERICAL BEADLETS	SPHERICAL BEADLETS	
<b>COLOR</b> COLOR	TAN	WHITE OFF-WHITE TAN GRAYISH	
<b>LOSS ON DRYING</b> LOSS ON DRYING	2	max. 3	%
<b>ASSAY: DL-ALPHA TOCOPHERYL ACETATE</b> ASSAY: DL-ALPHA TOCOPHERYL ACETATE	75	74 to 79	% AS IS
<b>U.S. STD. SIEVE TEST</b> PERCENT THROUGH NO. 20	100	min. 99	%
<b>MICROBIOLOGICAL PURITY</b> MICROBIOLOGICAL PURITY	SATISFACTORY	SATISFACTORY	

This lot was analysed and released by our authorized Quality Control Department and was found to meet the specifications as given above.

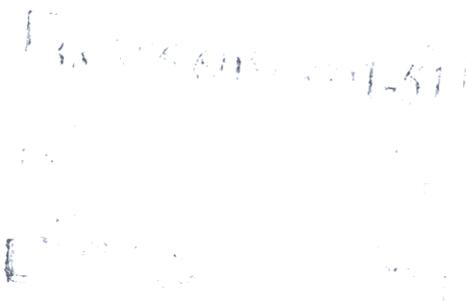
The product meets all requirements of the following valid compendia when tested accordingly:

Ph.Eur. + USP

The Quality Assurance Manager



Michael D Bartleson



# PHARMA NOSTRA

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

MATÉRIA PRIMA:	BETACAROTENO 10%	NF: 011.644
PROCEDÊNCIA:	SUIÇA	DATA DE ANÁLISE: 25/03/2003
LOTE PHARMA NOSTRA:	03030213	LOTE FORNECEDOR: UT02071123
DATA DE FABRICAÇÃO:	JULHO/2002	DATA DE VALIDADE: JULHO/2005
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM: TEMPERATURA NÃO MAIS QUE 25°C		
FM: C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	CAS: 7235407	
PM: 536,87	DCB: 0121.01-0	

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
DESCRIÇÃO*	Pó cristalino ou cristais vermelhos ou marrom avermelhados a marrom violeta.	Pó cristalino marrom avermelhado.
SOLUBILIDADE*	Insolúvel em água, ácidos e alcalinos. Fracamente solúvel em éter. Praticamente insolúvel em metanol e álcool.	Conforme.
PERDA POR DESSECAÇÃO*	≤ 8%	4.17%
PONTO DE FUSÃO*	176°C - 182°C (com decomposição)	176°C (com decomposição)
DENSIDADE APARENTE*	Informativo.	Sem compactação 0.53
INTENSIDADE DA COR EM DISPERSÃO AQUOSA (ABSORBÂNCIA)	≥ 120	126
METAIS PESADOS	≤ 10ppm.	< 10ppm.
ARSÊNIO	≤ 3ppm.	< 1ppm.
CONTEÚDO DE BETA CAROTENO	≥ 10%	11.7%
ANÁLISE GRANULOMÉTRICA		
PASSA NA MALHA-20	100%	100%
PASSA NA MALHA-40	≥ 85%	94%
PASSA NA MALHA-100	≤ 15%	1%
PUREZA MICROBIOLÓGICA*		
CONTAGEM DE BACTÉRIAS	< 1000 UFC/g.	Conforme.
Fungos e leveduras	< 100 UFC/g.	Conforme.
Patógenos	Ausente.	Ausente.

\* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de controle de Qualidade Pharma Nostra.

\*\* Substância Fotossensível f.c=8,54

CONCLUSÃO: Conforme especificações da USP25.



Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade  
Solange Magre B. Gebrim - CRF-GO N° 1796



Responsável Técnico  
Amin Gabriel Gebrim - CRF-GO N° 1829

# Pharma Nostra Comercial Ltda.

### FILIAL CAMPINAS:

RUA ALBANO DE ALMEIDA LIMA, 326 - JD. GUANABARA  
CAMPINAS - SP - CEP 13073-130  
PABX: (5519) 3743-4700 / 3241-3939  
C.N.P.J.: 03.497.220/0003-22  
INSC. EST.: 244.910.175.110

### MATRIZ:

RUA AQUIDABÃ, 1144 - MEIER  
RIO DE JANEIRO - RJ - CEP 20720-290  
TEL: (5521) 2591-1555 - FAX: (5521) 2591-1693  
C.N.P.J.: 03.497.220/0001-60  
INSC. EST.: 77.002.782

### FILIAL ANÁPOLIS:

VIA PRIMÁRIA - 5D - QD. 10 - MOD. 01 - S/Nº  
DAIA - ANÁPOLIS - GO - CEP 75133-600  
TEL / FAX: (5562) 316-5226  
C.N.P.J.: 03.497.220/0002-41  
INSC. EST.: 10.336.118-9

D.D.G. MAGISTRAL 0800-7070706

Produto: **BETACAROTENO - PO REVESTIDO 11,9%**

Data de Fabricação: **22/6/2003**

País de Origem: **CHINA**

Data de Validade: **21/12/2004**

Lote de Fabricação: **030607**

Nota Fiscal: **0574828**

CIQ: **7040112970**

Volumes: **08**

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

FCQ0004084

FÓRMULA MOLECULAR: C40 H56

PESO MOLECULAR: 536,9

CAS: 7235 40-7

ARMAZENAMENTO: À temperatura ambiente, em recipiente perfeitamente fechado e protegido da luz.

Exame/Componentes	Especificação	Resultado dos exames
<b>CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS</b>		
- Descrição*	Pó vermelho escuro de boa fluidez, constituído de partículas esféricas, com leve odor característico. Pode apresentar partículas brancas de amido.	Pó vermelho escuro de boa fluidez, com leve odor característico.
<b>SOLUBILIDADE</b>		
- Solubilidade*	Solúvel em água quente (25 a 40°C), formando uma dispersão estável vermelho-laranja.	Solúvel, formando uma dispersão vermelho-laranja.
<b>PERDA POR DESSECAÇÃO</b>		
- 1 g, 105°C, 4 horas*	No máximo 8,0 %	4,7 %
<b>IDENTIFICAÇÃO</b>		
- Identificação	Positivo	Positivo
<b>GRANULOMETRIA</b>		
- Granulometria	100,0% passa através de 20 mesh; No mínimo 86,0% passa através de 80 mesh; No máximo 15,0% passa através de 100 mesh.	100,0% passa através de 20 mesh; 94,4% passa através de 80 mesh; 4,4% passa através de 100 mesh.
<b>METAIS PESADOS</b>		
- Arsênio	No máximo 3 ppm.	Menor que 3 ppm
- Metais pesados	No máximo 20 ppm	Menor que 20 ppm
<b>DOSEAMENTO</b>		
- Doseamento	No mínimo 10,0%	11,9%
<b>CRISTALINIDADE APARENTE</b>		
- Sem compactação*	Informativo	0,4 g/ml
<b>OPACIDADE</b>		
- Absorbância específica	No mínimo 12%	15%

### Observação

Os testes realizados nos laboratórios de Controle de Qualidade da Galena, em conformidade com o Certificado de Análise de Laboratório.

Referência: Especificação Galena.





Produto: BETACAROTENO - PO REVESTIDO 11,9%

828  
Seq.012-000

Data de Fabricação: 22/6/2003

Pais de Origem: CHINA

Data de Validade: 21/12/2004

Lote de Fabricação: 030607

Nota Fiscal: 0574828

CIQ: 7040112970

Volumes: 08

(Continuação...)

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

FCQ0004084

Resultado: ( X ) Aprovado

Data da Análise: 18/11/2003

**Roberto T. Yoshida**  
Farmacêutico Responsável  
CRF-SP: 18.441





444  
Seq.039-000

Produto: VIT.C REVESTIDA

Data de Fabricação: 1/9/2003

Pais de Origem: CHINA

Data de Validade: 30/8/2004

Lote de Fabricação: 0309021

Nota Fiscal: 0566444

CIQ: 7040304751

Volumes: 04

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

FCQ0005135

FÓRMULA MOLECULAR: C<sub>6</sub> H<sub>8</sub> O<sub>6</sub>  
PESO MOLECULAR: 176.13  
CAS: 50-81-7  
DCB: 0074.01-2  
CLASSE TERAPÊUTICA: Vitamina

ARMAZENAMENTO: À temperatura ambiente, em recipiente perfeitamente fechado, protegido da luz e umidade.

Exame/Componentes	Especificação	Resultado dos exames
<b>CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS</b>		
- Descrição	Pó cristalino branco a amarelado.	Pó cristalino branco.
pH		
- pH (5%) *	de 2,0 a 3,0	2,7
PERDA POR DESSECAÇÃO		
1 g, 105°C, 1 hora *	de máximo 0,2 %	0,2 %
<b>IDENTIFICAÇÃO</b>		
- Identificação	Positivo	Positivo
<b>METAIS PESADOS</b>		
- Metais pesados	de máximo 20 ppm	Menor que 10 ppm
- Arsênico	de máximo 3 ppm	Menor que 3 ppm
<b>DENSIDADE APARENTE</b>		
- Sem compactação *	informativo	0,6 g/ml
<b>DOSEAMENTO</b>		
- Doseamento	de mínimo 98,0 %	99,1 %

### OBSERVAÇÃO

(\*) Testes realizados no Laboratório de Controle da Qualidade Galena. Os demais estão em conformidade com o certificado de análise do fornecedor.

Referência: Especificação Galena

Resultado: ( X ) Aprovado

Data da Análise: 14/02/2004



Roberto T. Yoshida  
Farmacêutico Responsável  
CRF-SP: 18.441



G A R A N T I A Q U A L I D A D E

# Certificado de Análise



*VIT C Revestido*

**Material:** Acido Ascorbico Revestido Tipo EC  
**Código:** 0425117368  
**Quant:** 2.400 kg

**Lote:** TL00305248  
**Lote de inspeção:** 50000010273  
**Data de manufatura:** 13.05.2003  
**Data de validade:** 13.11.2004

Teste	Resultado	Limite		Unidade
		Min	Max	
Certificado de Análise	Corresponde	-	-	-
Validade	Corresponde	-	-	-
Inspeção Visual (embalagem)	Corresponde	-	-	-

**Obs.:**

Este lote foi analisado e liberado por nosso Departamento de Controle de Qualidade e se encontra dentro das especificações dadas acima.

**Aprovado**

*[Handwritten Signature]*  
 Edmilson Fernando Calciolari

38 856 605/0001-51  
 RJR NUTRIENTES E  
 FARMACIA SCS LTDA:  
 AVENIDA OSWALDO COSTA, 472  
 PRESIDENTE ALTINO - CEP 06210-005  
 OSASCO - SP



# COATED ASCORBIC ACID TYPE EC

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

Productcode : 0425117  
 Lot No. : TL00305248  
 Analysis No. : 06069656

Test	Result	Limits / Specifications	Dimension / Units
Appearance	powder		
Colour	white		
Ethyl Cellulose Identity	corresponds		
Specific Rotation 589nm, 20degC, c=2 in Methanol (as dry)	49.2	+48.5 to +50.5	deg.
Loss on Drying	0.02	0 to 0.1	%
Assay (as dry)	98.2	min. 97.5	%

This lot was analysed and released by our authorized Quality Control Department and was found to meet the specifications as given above.

Roche Vitamins (UK) Limited  
 Quality Compliance Specialist

Gellan Elaine

38 856 605/0001-51  
 RJR NUTRIENTES E  
 FARMACIA S.A. LTDA.  
 AVENIDA OSWALDO COSTA, 472  
 PRESIDENTE ALTINO - CEP 06210-005  
 OSASCO - SP



Vitamins

# COATED ASCORBIC ACID TYPE EC

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

Productcode : 0425117  
 Lot No. : TL00309716  
 Analysis No. : 06073507

Test	Result	Limits / Specifications	Dimension / Units
Appearance	powder		
Colour	white		
Ethyl Cellulose Identity	corresponds		
Specific Rotation 589nm, 20degC, c=2 in Methanol (as dry)	49.2	+48.5 to +50.5	deg.
Loss on Drying	0.07	0 to 0.1	%
Assay (as dry)	99.0	min. 97.5	%

This lot was analysed and released by our authorized Quality Control Department and was found to meet the specifications as given above.

Roche Vitamins (UK) Limited  
 Quality Compliance Specialist

Gellan Elaine

38 856 605/0001-517  
 RJA NUTRIENTES E  
 FARMACIA SANCOS LTDA  
 AVENIDA COVA DO PARQUE, 472  
 PRESIDENTE ALTINO SILVA, 213-095  
 OSASUNO, SP

# Certificado de Análise



*Unit c Revestido*

**Material:** Acido Ascorbico Revestido Tipo EC  
**Código:** 0425117368  
**Quant:** 750 kg

**Lote:** TL00309716  
**Lote de inspeção:** 50000013312  
**Data de manufatura:** 30.09.2003  
**Data de validade:** 30.03.2005

Teste	Resultado	Limite		Unidade
		Min	Max.	
Cetificado de Análise	Corresponde	-	-	-
Validade	Corresponde	-	-	/
Inspeção Visual (embalagem)	Corresponde	-	-	-

**Obs.:**

Este lote foi analisado e liberado por nosso Departamento de Controle de Qualidade e se encontra dentro das especificações dadas acima.

**Aprovado**

Edmilson Fernando Calciolari

38 936 608/0001-51  
 R. S. ...  
 FARMACIA ...  
 AVENIDA ... NO. 572  
 PRESIDENTE ... 6215-805  
 OSASCO - SP

# Certificado de Análise



**Material:** Vitamina E Po 75 HP  
**Código:** 0483567341  
**Quant:** 40 kg

**Lote:** WB00093417  
**Lote de inspeção:** 50000011013  
**Data de manufatura:** 30.09.2003  
**Data de validade:** 30.09.2006

Teste	Resultado	Limite		Unidade
		Min	Max	
Certificado de Análise	Corresponde	-	-	-
Validade	Corresponde	-	-	-
Inspeção Visual (embalagem)	Corresponde	-	-	-

**Obs.:**

Este lote foi analisado e liberado por nosso Departamento de Controle de Qualidade e se encontra dentro das especificações dadas acima.

**Aprovado**

*[Handwritten Signature]*  
 Edmilson Fernando Calciolari

38 856 605/0001-51  
 FARMACIA ... LTDA.  
 AVENIDA ...  
 PRESIDENTE ...  
 05401-000