

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

**MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO: ESTUDO DA
ABSORÇÃO E EFEITO ANTIOXIDANTE EM JOGADORES
DE FUTEBOL DE ELITE**

CAMILA SOUSA CAMPOS DA COSTA

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO: ESTUDO DA ABSORÇÃO E
EFEITO ANTIOXIDANTE EM JOGADORES DE FUTEBOL DE ELITE**

Camila Sousa Campos da Costa

Dissertação de Mestrado a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci

Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª. Cristiana Pedrosa Melo Porto

**Rio de Janeiro
Novembro, 2009**

COSTA, Camila S.C. da

Micropartículas de ácido ascórbico: estudo da absorção e efeito antioxidante em jogadores de futebol de elite. Rio de Janeiro: UFRJ, Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2009.

Número de páginas: 82

Orientadoras: Anna Paola Trindade Rocha Pierucci e Cristiana Pedrosa Melo Porto

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ INJC/ Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2009.

Referências Bibliográficas: f. 72-80

1. Microencapsulamento; 2. *Spray Drying*; 3. Vitamina C; 4. Proteínas de ervilha; 5. Futebol; 6. Estresse oxidativo.

I. Pierucci, Anna Paola Trindade Rocha; Pedrosa, Cristiana Melo Porto. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro. III. Título

Camila Sousa Campos da Costa

MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO: ESTUDO DA ABSORÇÃO E EFEITO
ANTIOXIDANTE EM JOGADORES DE FUTEBOL DE ELITE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto Josué de Castro. Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Nutrição.

Rio de Janeiro, 23 de novembro de 2009.

Aprovado por:

.....
Prof^a Dr^a Anna Paola Trindade Rocha Pierucci – Orientadora
Instituto de Nutrição Josué de Castro/ UFRJ

.....
Prof Dr Alexandre Palma de Oliveira
Escola de Educação Física e Desportos/ UFRJ
Membro da banca e revisor

.....
Prof^a Dr^a Eliane de Abreu Soares
Instituto de Nutrição Josué de Castro/ UFRJ
Membro da banca

.....
Prof^a Dr^a Adriana Farah
Instituto de Química/ UFRJ
Membro da banca

.....
Prof^a Dr^a Marta Citelli dos Reis
Instituto de Nutrição Josué de Castro/ UFRJ
Suplente

.....
Prof Dr Alexandre Guedes Torres
Instituto de Química/ UFRJ
Suplente

.....
Prof^a Dr^a Cristiana Pedrosa Melo Porto
Instituto de Nutrição Josué de Castro/ UFRJ
Co-orientadora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Manoel e Monica ao meu irmão Bruno e ao Tiago que me apoiaram e me incentivaram durante toda esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cada dia...

As professoras Anna Paola Pierucci e Cristiana Pedrosa pela orientação, amizade, apoio e incentivo compartilhado ao longo de tantos anos de trabalho juntas. Obrigada por me ajudarem no meu crescimento pessoal e intelectual com tanto carinho e dedicação.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Instituto de Nutrição Josué de Castro pela oportunidade de realização do curso.

A querida Rê, secretária da pós-graduação, pela paciência e pelo carinho em todos os momentos.

A Alessandra Rangel e Heloisa Pereira, pela amizade incondicional, pelos conselhos, e por tudo que me ensinaram.

Ao André Mesquita, pelo apoio, paciência e pela ajuda nas análises realizadas no trabalho.

A todos que pertencem ao laboratório DAFFE, em especial, Luciana Linhares, Natasha Kelber, Priscilla Sóla, Letícia Azen e Marta Citelli pelo carinho e apoio e por todos os momentos compartilhados dentro e fora do laboratório.

Ao CENPES/Petrobrás, por conceder o uso do *spray dryer* e aos seus funcionários, em especial ao Edivan, pelo auxílio no uso do equipamento.

A indústria Corn Products Brasil, BASF – Human Nutrition, pelo fornecimento de matéria-prima necessária para a realização deste trabalho.

Ao Fluminense *Football Club*, pelo apoio na realização deste trabalho, em especial aos sujeitos da pesquisa, ao gerente Bruno Costa e ao supervisor Antonio Garcia, aos fisiologistas, Márcio Assis, Ricardo Abrantes e Juliano Spinetti, e as nutricionistas Renata Faro e Jamilce Araújo por toda a ajuda durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos farmacêuticos José Augusto e Eduardo e ao enfermeiro Felipe pela realização das coletas de sangue.

A Prof^a. Priscila Finotelli pelo auxílio na realização da análise referente à distribuição do tamanho das micropartículas.

A técnica Mair, pelo auxílio na análise de morfologia, no uso do microscópio eletrônicas de varredura.

Ao Instituto de Bioquímica Médica, em especial aos laboratórios do Prof. Mauro Pavão e do Prof. Pedro Oliveira, principalmente, pelo empréstimo do HPLC, fundamental para realização deste trabalho.

A todos do laboratório LIFE pelo auxílio em algumas das análises referentes aos biomarcadores de estresse oxidativo, em especial ao Márcio, Fred, Leonardo e à Prof^a. Elis Eleutherio e ao Prof. Marcos Dias, pelo empréstimo do laboratório.

Ao Prof. Alexandre Palma pelo incentivo, pela revisão da dissertação e informações sobre aspectos da fisiologia do exercício.

Ao Tiago pelo amor, carinho, compreensão, paciência e por tudo que fez por mim durante esta trajetória.

A meus pais, Manoel e Monica, pelo amor, apoio, conselhos, enfim, por tudo! Ao meu irmão pelo apoio e momentos de descontração. E a todos da minha família, que sempre incentivam e apoiaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 GERAL.....	4
2.2 ESPECÍFICOS.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Microencapsulamento.....	5
3.1.1 Matrizes encapsulantes.....	6
3.2 Ácido ascórbico.....	7
3.3 Estresse oxidativo, exercício físico e antioxidantes.....	10
3.3.1 Futebol.....	12
3.3.1.1 Dinâmica de esforço no futebol.....	12
3.3.1.2 <i>Loughborough Intermittent Shuttle Test (LIST)</i>	14
4 METODOLOGIA.....	16
4.1 Obtenção e caracterização do isolado protéico de ervilha (IPE) – matriz encapsulante.....	16
4.2 Produção e caracterização das micropartículas de ácido ascórbico.....	16
a) Determinação do teor de umidade.....	17
b) Determinação do teor de AA.....	17
c) Retenção de AA nas micropartículas.....	18
d) Avaliação da distribuição de tamanho de partículas.....	18
e) Avaliação da morfologia das micropartículas.....	19
4.3 Elaboração e caracterização do veículo para administração das micropartículas.....	19
4.4 Seleção e caracterização dos sujeitos da pesquisa.....	19
4.4.1 Avaliação antropométrica e funcional.....	20
4.4.2 Avaliação do consumo alimentar.....	21
4.5 Desenho experimental.....	21

4.6	Protocolo de exercício físico – LIST.....	23
4.6.1	Avaliação da perda de peso.....	26
4.6.2	Monitoramento da frequência cardíaca.....	26
4.7	Coletas sanguíneas.....	26
4.8	Análises bioquímicas.....	27
4.8.1	Hematócrito.....	27
4.8.2	Glicose.....	27
4.8.3	Bilirrubina total.....	27
4.8.4	Lactato.....	28
4.8.5	Uréia.....	28
4.8.6	Ácido úrico.....	29
4.8.7	Creatina quinase (CK).....	29
4.8.8	Ácido ascórbico.....	29
4.8.8.1	Cinética de absorção do AA.....	30
4.8.9	Capacidade antioxidante total.....	30
4.8.10	Grupamentos sulfidrila totais.....	31
4.8.11	Hidroperóxidos.....	32
4.8.12	Peroxidação lipídica.....	33
4.8.13	Catalase.....	33
4.9	Aspectos de bioética.....	34
4.10	Análises estatísticas.....	34
5	RESULTADOS.....	36
6	DISCUSSÃO.....	58
7	CONCLUSÃO.....	70
8	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
10	ANEXOS.....	81
	Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	82

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- 10A – Coleta de sangue 10 minutos após o término do teste físico
- 20A – Coleta de sangue 20 minutos após o término do teste físico
- 40A – Coleta de sangue 40 minutos após o término do teste físico
- 60A – Coleta de sangue 60 minutos após o término do teste físico
- AA – Ácido Ascórbico
- AAL – Grupo Ácido Ascórbico Livre
- AAM – Grupo Ácido Ascórbico Microencapsulado
- ADA – Ácido Desidroascórbico
- ADP – Adenosina Difosfato
- ATP – Adenosina Trifosfato
- CAT - catalase
- CENPES – Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello
- CK – Creatina Quinase
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CT – Centro de Treinamento
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DRI – *Dietary Reference Intake*
- DTNB – 5,5 ditiobis (2-ácido nitrobenzóico)
- DTT – Ditionitrosol
- ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
- FC_{max} – Frequência Cardíaca Máxima
- FOX – *ferrous oxidation in xylenol orange*
- FRAP – *Ferric Reducing Ability of Plasma*
- GPX – Glutathione Peroxidase
- GS – Grupamentos sulfidrílica
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
- IA – Coleta de sangue Imediatamente após o término do teste físico
- IAL – Instituto Adolfo Lutz
- IPE – Isolado Protéico de Ervilha
- LDL – *Low Density Lipoprotein*
- LIST – *Loughborough Intermittent Shuttle Test*
- MDA – Malondialdeído
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

ORAC – *Oxygen radical absorbance capacity*
P – Grupo Placebo
PE – Coleta de sangue Pré-exercício
PPC – Concentrado Proteico de Ervilha
QFCA – Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos
R24 – Recordatório de 24 horas
RL – Radicais Livres
SOD – Superóxido Dismutase
ST – Sólidos Totais
TBARS – Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEP – 1,1,3,3, tetraetoxipropano
TPP – Trifenilfosfina
TPTZ - 2,4,6-tripiridil-s-triazina
VO_{2max} – Captação máxima de volume de oxigênio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de reação para oxidação do ácido ascórbico.....	8
Figura 2 - Critérios utilizados para acessar o estresse oxidativo.....	11
Figura 3 - Desenho experimental do estudo.....	22
Figura 4 - Procedimentos experimentais nos dias de realização do teste físico (LIST).....	23
Figura 5 - Ilustração esquemática do LIST.....	25
Figura 6 - Microscopias eletrônicas de varredura das micropartículas obtidas por <i>spray dryer</i> (A e B).....	37
Figura 7 - Concentração plasmática de glicose de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP).....	43
Figura 8 - Concentração plasmática de bilirrubina total de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP).....	47
Figura 9 - Concentração plasmática de lactato de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P ($p < 0,05$); ■ Diferença significativa em relação aos valores do grupo AAL ($p < 0,05$).....	48
Figura 10 - Concentração plasmática de uréia de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP).....	49
Figura 11 - Concentração plasmática de ácido úrico de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP).....	50
Figura 12 - Concentração plasmática de creatina quinase de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P ($p < 0,05$).....	50

Figura 13 - Concentração plasmática de ácido ascórbico de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P (p < 0,05).....	51
Figura 14 – Capacidade antioxidante do plasma, por equivalentes de ácido ascórbico, de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P (p < 0,05).....	53
Figura 15 - Concentração plasmática de grupamentos sulfidríla totais de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP).....	54
Figura 16 - Concentração plasmática de hidroperóxidos de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P (p < 0,05).....	55
Figura 17 - Concentração plasmática de TBARS (MDA) de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P (p < 0,05).....	56
Figura 18 - Concentração plasmática de catalase de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P (p < 0,05).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual de rendimento e teor de proteínas e umidade do isolado protéico de ervilha – IPE.....	36
Tabela 2 - Parâmetros de obtenção e caracterização das micropartículas de ácido ascórbico (MD ± DP).....	37
Tabela 3 - Características antropométricas e funcionais dos sujeitos da pesquisa, de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM) (MD ± DP).....	38
Tabela 4 - Ingestão de energia e macronutrientes, segundo recordatório de 24 horas, de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM) (MD ± DP).....	39
Tabela 5 - Ingestão de micronutrientes, segundo recordatório de 24 horas, de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM) (MD ± DP).....	40
Tabela 6 - Distribuição dos sujeitos da pesquisa quanto às categorias de frequência de consumo de alimentos, de acordo com o questionário de frequência de consumo de alimentos - QFCA.....	41
Tabela 7 – Parâmetros monitorados durante a prática do protocolo de exercício LIST relativos aos sujeitos da pesquisa, de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM) (MD ± DP).	42
Tabela 8 - Tabela de comparação entre o tempo do tratamento placebo - P para as análises bioquímicas.....	44
Tabela 9 - Tabela de comparação entre o tempo do tratamento ácido ascórbico livre - AAL para as análises bioquímicas.....	45
Tabela 10 - Tabela de comparação entre o tempo do tratamento ácido ascórbico microencapsulado - AAM para as análises bioquímicas.....	46
Tabela 11 - Coeficientes lineares e coeficientes angulares dos ajustes das curvas de concentração do ácido ascórbico plasmático em função dos tempos de coleta de sangue, nos	

grupos experimentais, ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), com os as equações de cinética de reação testadas.....52

RESUMO

COSTA, Camila Sousa Campos da. **Micropartículas de ácido ascórbico: estudo da absorção e efeito antioxidante em jogadores de futebol de elite.** Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

O presente estudo teve o objetivo de avaliar a cinética de absorção e o efeito antioxidante de micropartículas de ácido ascórbico, em jogadores de futebol, após exercício intermitente, que simula a atividade física em jogos. Os jogadores de futebol de elite da categoria juniores selecionados para a pesquisa foram divididos em três grupos experimentais – placebo, ácido ascórbico livre e encapsulado em micropartículas. Imediatamente ao término do protocolo de exercício foi administrada bebida isenta de ácido ascórbico no grupo placebo e adicionada de 1 g de ácido ascórbico livre ou encapsulado nos grupos suplementados. As micropartículas foram produzidas utilizando isolado protéico de ervilha como matriz encapsulante, por *spray drying*. Participaram do estudo 10 sujeitos, que foram avaliados quanto às características antropométricas, funcionais e nutricionais. Durante o exercício foi monitorada a frequência cardíaca (FC), ingestão hídrica e a variação do peso corporal de todos os sujeitos. Coletas de sangue foram realizadas antes do exercício, imediatamente após e 10, 20, 40 e 60 minutos após o exercício. Foram analisados no plasma os indicadores lactato, glicose, ácido ascórbico, uréia, ácido úrico, bilirrubina, creatina quinase, capacidade antioxidante total, TBARS, hidroperóxidos, grupamentos sulfidrila e, nos eritrócitos, a catalase. Os dados de FC e lactato indicaram que o esforço físico durante o exercício foi característico de jogadores de futebol; a perda de peso observada após o exercício ocorreu conforme esperado; a homeostase de glicose foi mantida ao longo do estudo. As concentrações de ácido ascórbico plasmático aumentaram significativamente nos grupos suplementados, em relação ao placebo, após 20 minutos do consumo das bebidas, não havendo diferenças entre ambos os grupos. No entanto, os ajustes dos dados com as cinéticas de reação demonstraram que a taxa de incremento dos valores encontrados foi menos acentuada no grupo que consumiu as micropartículas, demonstrando que o encapsulamento promoveu uma absorção sustentada de ácido ascórbico. Após o exercício, os indicadores analisados tiveram comportamento característico de alterações relacionadas ao estresse oxidativo em todos os grupos pesquisados. Contudo, os grupos suplementados demonstraram efeito positivo significativo sobre os indicadores hidroperóxidos, em relação ao placebo e o grupo que consumiu as micropartículas teve efeito pronunciado sobre a capacidade antioxidante e creatina quinase em relação ao placebo. Sugere-se que fatores inerentes ao processo de microencapsulamento favoreceram a funcionalidade do ácido ascórbico no meio biológico, além de mostrar a biodisponibilidade do material encapsulado. Ressalta-se ainda que o grupo que consumiu as micropartículas apresentou tendências a comportamentos diferenciados para as diversas análises quando comparado com o grupo que consumiu o ácido ascórbico livre. As micropartículas apresentaram-se biodisponíveis e bioativas no organismo podendo ser utilizadas como alternativas para suplementação.

ABSTRACT

COSTA, Camila Sousa Campos da. **Microparticles of ascorbic acid: study of the absorption and antioxidant effects in elite football.** Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

This study aimed to evaluate the kinetics of absorption and antioxidant effects of ascorbic acid microparticles in soccer players after intermittent exercise, which simulates physical activity in games. The elite football players of the junior category selected for the study were divided into three groups - placebo, ascorbic acid free and encapsulated in microparticles. Immediately following the exercise protocol it was given a drink exempt of ascorbic acid in the placebo group and added by 1 g of ascorbic acid, free or encapsulated, in the supplemented groups. Microparticles were produced using pea protein isolate as encapsulating matrix by spray drying. The study included 10 subjects who were evaluated for anthropometrical, functional and nutritional characteristics. During the exercise it was monitored heart rate (HR), water intake and body weight variation of all subjects. Blood samples were taken before exercise, immediately after and 10, 20, 40 and 60 minutes after exercise. The parameters analyzed in plasma were lactate, glucose, ascorbic acid, urea, uric acid, bilirubin, creatine kinase, total antioxidant capacity, TBARS, hydroperoxides, sulfhydryl groups and, in the erythrocytes, catalase. Data from HR and lactate indicated that the physical exertion during exercise was typical of soccer players; weight loss observed after exercise occurred as expected; glucose homeostasis was maintained throughout the study. The concentrations of plasma ascorbic acid increased significantly in the supplemented groups compared to placebo, after 20 minutes of consumption of beverages, with no differences between both groups. However, the data fit in the reaction kinetics showed that the values increasing rate was less pronounced in the group that consumed the microparticles, showing that the encapsulation promoted a sustained absorption of ascorbic acid. After the exercise, the indicators examined had typical behavior related to oxidative stress in all groups surveyed. However, the supplemented groups showed a significant positive effect on hydroperoxides compared to placebo and the group that consumed the microparticles had a significant effect on the antioxidant capacity and creatine kinase compared to placebo. It is suggested that factors inherent to the process of microencapsulation favored the functionality of ascorbic acid in the biological environment, and show the bioavailability of encapsulated material. It is worth noting that the group that consumed the microparticles showed tendencies to be different toward the varied analysis when compared to the group that consumed the ascorbic acid free. The microparticles were bioavailable and bioactive in the body and can be used as alternative to supplementation.

1 INTRODUÇÃO

A aplicação dos princípios básicos da ciência e da tecnologia para projetar e fabricar alimentos com melhorias físico-químicas, sensoriais e nutricionais tem sido foco de diversas indústrias de fármacos e de alimentos nos últimos anos. Compostos dietéticos, bioativos, com benefícios para a saúde, à capacidade física e ao estado mental, como vitaminas, probióticos, peptídeos, antioxidantes, dentre outros, são normalmente utilizados pelas indústrias visando a produção de alimentos com alto valor nutricional e com propriedades funcionais.

Insere-se neste contexto a aplicação de tecnologias que promovam o aumento da estabilidade de nutrientes instáveis e a liberação controlada em seus sítios específicos de atuação e/ou liberação, como o micro e o nanoencapsulamento (GOUIN, 2004). O encapsulamento consiste, basicamente, em envolver o material que se deseja proteger em uma matriz ou cápsula, havendo a formação de partículas de variados formatos e tamanhos na ordem de micrômetros e nanômetros.

O interesse na área de encapsulamento, atualmente, é encontrar novas alternativas de materiais naturais, de baixo custo e biocompatíveis, para o revestimento de substâncias bioativas. Dentre os principais polímeros estudados, destacam-se as proteínas, que além de serem macronutrientes vitais, desempenham exclusivas propriedades funcionais, o que as classifica como materiais ideais. Pereira *et al.* (2009), utilizaram um isolado protéico de ervilha (IPE) (*Pisum sativum*) como material para encapsular o ácido ascórbico (AA). Os resultados obtidos mostraram que o IPE formou micropartículas esféricas e com alta retenção desta vitamina, sendo considerado efetivo no processo de formação de micropartículas. A incorporação dessas cápsulas em alimentos ainda é um campo em ascensão nesta área tão revolucionária. Há que se considerar, entretanto, a verificação da biodisponibilidade e da bioatividade *in vivo* do AA microencapsulado.

Atualmente, sabe-se que, no sistema biológico humano, o AA tem atividade vital na biossíntese de proteínas estruturais, principalmente do músculo esquelético (colágeno, elastina), e reguladoras do metabolismo energético (catecolaminas), além de também atuar no sistema de defesa antioxidante (ARRIGONI & De TÚLIO, 2002). Verifica-se, portanto, estreita relação das funções biológicas desta vitamina com o metabolismo humano durante o exercício físico. Neste sentido, é de interesse científico conhecer o comportamento desta vitamina em episódios de estresse oxidativo induzido por exercício físico extenuante. Estudos já foram realizados em diferentes modalidades esportivas para avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo e do papel do AA como antioxidante (AGUILÓ *et al.*, 2005; ZOPPI *et al.*, 2006; CHOLEWA *et al.*, 2008). Mas, sabe-se pouco sobre como isto ocorre no esporte mais popular do mundo, o futebol.

O futebol é um exercício físico intermitente extenuante. Dessa forma, os jogadores de futebol são especialmente vulneráveis ao estresse oxidativo, que está relacionado com o processo de fadiga e até mesmo lesão muscular. A principal dificuldade de realizar estudos com jogadores de futebol é o protocolo de exercício, que deve apresentar estímulos semelhantes a uma partida de futebol, para que os resultados sejam reprodutíveis e coerentes com a população estudada. O *Loughborough Intermittent Shuttle Test* (LIST) é um teste que apresenta estes estímulos, sendo próprio para jogadores de futebol. Nicholas *et al.* (2000) avaliaram o dispêndio energético e a frequência cardíaca de jogadores durante a prática do LIST em comparação a uma partida de futebol, concluindo que o mesmo pode ser utilizado como protocolo experimental em pesquisas que envolvem esta modalidade esportiva.

Estudos comparativos sobre o consumo de AA microencapsulado em relação ao consumo dessa vitamina em forma livre, bem como seu efeito antioxidante em situações fisiológicas de estresse oxidativo, podem ser realizados em jogadores de futebol, com

utilização do LIST como protocolo de exercício. Portanto, a presente pesquisa propõe-se aos seguintes objetivos:

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Estudar a cinética de absorção e o efeito antioxidante do AA encapsulado em jogadores de futebol após exercício físico intermitente que simula a atividade em jogo.

2.2 Específicos:

- Produzir e caracterizar micropartículas de AA em matriz de IPE;
- Avaliar o comportamento de biomarcadores de estresse oxidativo em jogadores de futebol durante a prática do LIST e frente ao consumo de AA, livre e microencapsulado, imediatamente após o protocolo de exercício;
- Comparar a cinética de absorção do AA, livre e microencapsulado, após o consumo das micropartículas pelos sujeitos da pesquisa imediatamente após LIST.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microencapsulamento

O microencapsulamento é definido como a tecnologia de embalagem de materiais (sólidos, líquidos ou gasosos) em minúsculas partículas ou gotículas, as quais podem liberar seu conteúdo a taxas controladas sob condições específicas (DZIEZAK, 1988), tendo a atividade biológica preservada (POTHAKAMURY & BARBOSA-CÁNOVAS, 1995). Assim, a principal finalidade do processo é a proteção de uma substância ativa, evitando sua rápida degradação e promovendo o prolongamento de seu período de ação, seja por liberação controlada ou pelo isolamento de sua interação com o meio até o momento em que sua ação seja necessária (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). O material revestido é denominado núcleo ou material ativo encapsulado, e o material que forma o revestimento é conhecido como matriz, material de parede ou encapsulante (GOUIN, 2004).

A produção de micropartículas pode ocorrer por diferentes processos, utilizando-se diversos materiais de revestimento. Estes fatores exercem influência sobre a formação de partículas, conferindo diferentes formatos e tamanhos (POTHAKAMURY & BARBOSA-CÁNOVAS, 1995). O *spray drying* é a tecnologia mais largamente utilizada nas indústrias farmacêuticas e de alimentos para encapsular substâncias ativas, devido ao baixo custo em comparação às outras técnicas e por produzir partículas de boa qualidade (DESAI AND PARK, 2005). Este método baseia-se na pulverização (atomização) de uma solução, emulsão ou suspensão, contendo o material ativo e a matriz encapsulante, em uma câmara de ar quente, sendo as gotículas secas (pó) recuperadas por meio de ciclone em coletores (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007, GOUIN, 2004). As partículas formadas podem ser classificadas quanto ao tamanho, sendo denominadas macropartículas (>5000µm), micropartículas (1-5000µm) ou nanopartículas (<1µm) (SANGUANSRI & AUGUSTIN, 2006).

O controle da liberação de substâncias encapsuladas pode ser obtido por diferentes mecanismos, dependendo da finalidade de sua aplicação. Diferentes dispositivos podem iniciar o processo de liberação de materiais ativos encapsulados, tais como mudanças no pH do meio e ação de enzimas específicas, que exercem influência sobre as propriedades físico-químicas das matrizes encapsulantes, permitindo que esta modifique sua estrutura e promova a difusão e/ou liberação da substância encapsulada (GOUIN, 2004; DESAI & PARK, 2005). A aplicação de nutrientes microencapsulados no desenvolvimento de alimentos para liberação lenta no trato digestório constitui-se em grande inovação nesse campo da saúde.

3.1.1 Matrizes encapsulantes

A escolha da matriz encapsulante para o processo de microencapsulamento é fundamental, uma vez que esta influenciará nas propriedades físicas e químicas das partículas formadas, determinando aspectos importantes para a funcionalidade dos biomateriais, tais como morfologia, distribuição de tamanho, retenção e controle da liberação do material ativo encapsulado (REINECCIUS, 2004).

Proteínas são classificadas como materiais ideais para encapsulamento de substâncias bioativas, devido ao seu alto valor nutricional, e principalmente, pelas propriedades tecnológicas e funcionais, incluindo emulsificação, gelatinização e formação de espuma. As proteínas mais comumente utilizadas são: as do leite (ou soro) e gelatina (CHEN *et al.*, 2006). No entanto, estudos recentes vêm explorando as propriedades funcionais de proteínas de leguminosas, visando utilização de um material seguro para adição em matrizes alimentares com alto valor nutricional. Estas proteínas são materiais de baixo custo, biocompatíveis e biodegradáveis, que vem sendo utilizadas como alternativa para alguns dos materiais mais comumente utilizados na produção de micropartículas (PIERUCCI *et al.*, 2006 e 2007; PEREIRA *et al.*, 2009). Pierucci *et al.* (2006) utilizaram um concentrado protéico de ervilha (PPC) para microencapsulamento de AA e observaram que ao adicionar essas partículas em

uma matriz alimentar (utilizou-se um alimento energético em gel) o AA teve taxa de degradação reduzida em relação a observada quando a vitamina foi adicionada na forma livre, o que demonstra a eficácia do sistema de proteção desenvolvido.

Rangel *et al.* (2003) desenvolveram um método de purificação de sementes de ervilha (*Pisum sativum*) e ao estudar o isolado protéico obtido verificaram que as propriedades funcionais, importantes para o processo de microencapsulamento, são atribuídas principalmente à fração de vicilina. O isolado protéico apresenta cerca de 90% do seu conteúdo composto pela vicilina e foi aplicado no encapsulamento do AA apresentando resultados promissores (PEREIRA *et al.*, 2009). Há que se considerar, no entanto, o estudo da biodisponibilidade e da bioatividade das partículas produzidas *in vivo*.

3.2 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico, também conhecido como ascorbato ou vitamina C é uma lactona de ácido derivado de um monossacarídeo, apresentando a fórmula $C_6H_8O_6$ e peso molecular 176,12g. Oxida-se facilmente formando o ácido desidroascórbico (ADA), o qual pode ser subsequentemente oxidado gerando os ácidos dicetogulônico, oxálico e treônico (BOBBIO & BOBBIO, 2003). Na primeira etapa de degradação do ADA ocorre a hidrólise do anel de lactona, uma reação irreversível e que apresenta perda da atividade biológica (ARRIGONI & De TÚLIO, 2002; KARLSEN *et al.*, 2005) (Figura 1). A oxidação do AA em plasma é influenciada pela sua concentração, temperatura, luz, pH, presença de oxigênio, solvente, força iônica, e presença de íons férricos ou enzimas oxidadas. Assim, procedimentos para estabilizar esta vitamina em amostras biológicas requerem acidificação e incluem, algumas vezes, a adição de um agente redutor ou de um quelante de metal (JACOB, 2003).

O AA é um nutriente que deve ser adquirido, por humanos, a partir da alimentação, pois, em exceção a classe animal, os humanos não sintetizam AA no organismo. (PENTEADO, 2003). As fontes alimentares mais abundantes de vitamina C são as frutas

cítricas, sendo encontrada também em verduras e tubérculos, como espinafre, brócolis e batata. As recomendações dietéticas para mulheres e homens adultos são de 75mg/dia e 90mg/dia, respectivamente (*Dietary Reference Intake – DRI*, 2004).

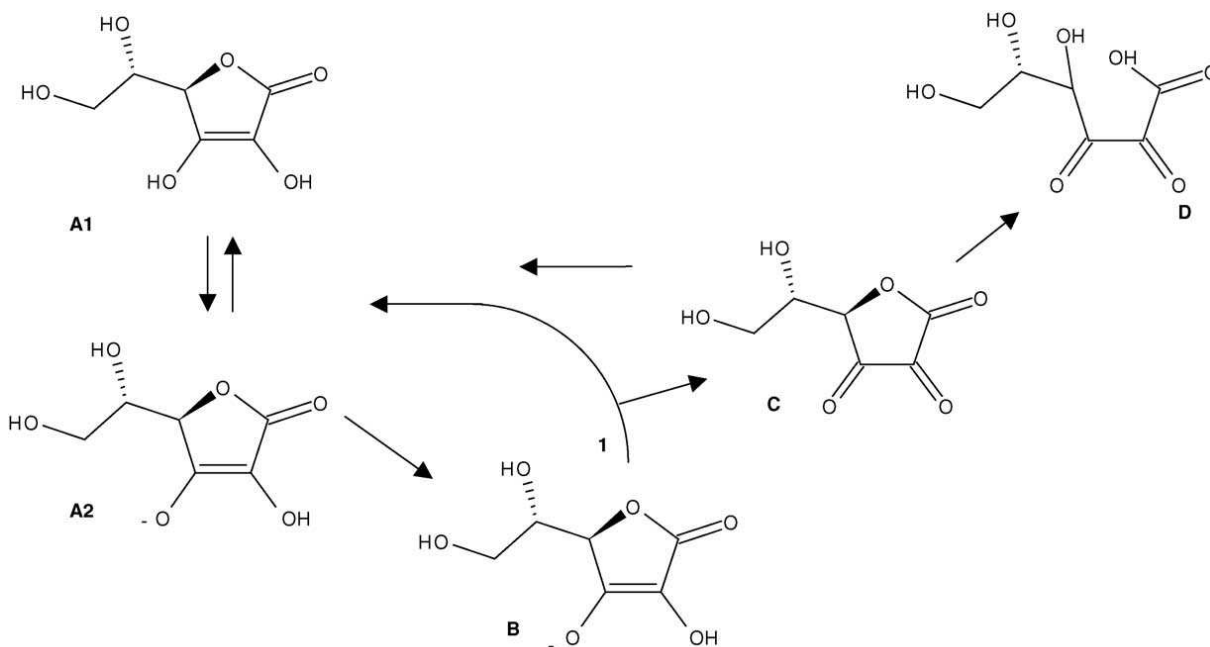


Figura 1 – Esquema de reação para oxidação do ácido ascórbico (Adaptado de KARLSEN *et al.*, 2005). A principal forma de vitamina C é o ácido ascórbico (AA) (A1), e em condições biológicas é encontrado na sua forma iônica, ascorbato (A2). Quando sofre oxidação, o radical ascorbil (B) é formado e sofre uma reação espontânea de dismutação (1), onde uma molécula de AA e uma molécula de ácido desidroascórbico (ADA) (C) são formadas a partir de duas moléculas de radical ascorbil. Em condições biológicas o ADA sofre rápida e irreversível hidrólise com formação de ácido dicetogulônico (D).

A vitamina C é absorvida através do epitélio do intestino humano por meio de processos saturáveis e dose-dependente (RUMSEY & LEVINE, 1998). Em células de mamíferos, a absorção do AA é mediada por transportadores dependentes de Na^+ (SVCT1 e SVCT2). Estes transportadores são altamente homólogos entre si, porém eles têm diferentes características funcionais, com SVCT2 exibindo uma maior afinidade e menor capacidade para o AA que o SVCT1. A distribuição e os parâmetros cinéticos do SVCT1, descritos na literatura, sugerem que o papel primário deste transportador é a manutenção da homeostase corporal do AA por absorção dietética e reabsorção renal (WANG *et al.*, 2000). O SVCT2 é largamente expresso e seu RNAm foi detectado em diversas células e tecidos

metabolicamente ativos (neurônios, cérebro, olhos, placenta, osteoblastos e condrócitos). O possível papel deste transportador pode ser a larga absorção de AA requerida para a proteção das células metabolicamente ativas contra o estresse oxidativo (CASTRO *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2004). A vitamina C também pode ser transportada, através dos enterócitos, na forma oxidada (ADA), pelos transportadores facilitadores de hexoses (GLUT 1, GLUT 3 e GLUT 4) e depois reduzida a AA pelas redutases presentes nos enterócitos (WILSON, 2005). Qualquer ADA que escape à redução nos enterócitos e passe para a corrente sanguínea, ou que seja formado pela oxidação do AA no meio extracelular, pode ser captado e reduzido a ascorbato por outras células (adipócitos, células endoteliais, hemácias, hepatócitos, neutrófilos, osteoblastos e células musculares lisas) (HOLMES *et al.*, 2002).

As funções biológicas do AA são devidas, principalmente, à sua capacidade redutora, agindo em diversas reações bioquímicas, sendo considerado um antioxidante dietético de grande importância (HAMILTON *et al.*, 2000). Presente nos compartimentos citossólicos das células, é considerado o principal supressor de radicais livres (RL) em meio aquoso (SAVINI *et al.*, 2005), reagindo diretamente com RL tais como: superóxido, hidroxilas e oxigênio livre, sendo considerado um composto bioativo. As propriedades de redução dessa vitamina auxiliam na absorção dietética do ferro, que é necessário para formação de hemoglobina nas células vermelhas (EVANS, 2000), contribuem para o restabelecimento de atletas, após treinamentos e competições (SAVINI *et al.*, 2005), além de participar da formação do colágeno, síntese de neurotransmissores e produção de linfócitos (JACOB, 2003).

O AA é largamente adicionado a muitos produtos alimentares como um suplemento vitamínico para reforçar a ingestão dietética de vitamina C e para agir como antioxidante. No entanto, devido à sua alta reatividade e baixa estabilidade em solução, podem ocorrer perdas significativas desta vitamina durante o processamento de alimentos (KIRBY *et al.*, 1991; PIERUCCI *et al.*, 2004). Nesse sentido, o encapsulamento desta vitamina pode protegê-la da

oxidação, mantendo sua atividade biológica, além de ser uma alternativa para a manutenção da biodisponibilidade por promover liberação controlada no trato digestório.

3.3 Estresse oxidativo, exercício físico e antioxidantes

As células produzem continuamente RL e espécies reativas de oxigênio (ERO) devido a inúmeros processos do metabolismo. No entanto, estas substâncias são, normalmente, neutralizadas por um elaborado sistema de defesa antioxidante que consiste de enzimas como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPX) e numerosos antioxidantes não enzimáticos, incluindo as vitaminas A, E e C, glutatona, ubiquinona e flavonóides (URSO & CLARKSON, 2003; FINAUD *et al.*, 2006). Se a produção de RL e ERO for excessiva, conforme observado durante exercícios extenuantes e alguns estados patológicos, ou as defesas antioxidantes forem severamente reduzidas, o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes é desfeito e instala-se o estresse oxidativo (LIU *et al.*, 1999; URSO & CLARKSON, 2003). A condição de estresse oxidativo pode induzir a apoptose em células saudáveis provocando inflamações ou alterações das funções celulares permitindo oxidação de lipídios, proteínas e DNA (PRIOR & CAO, 1999; FINAUD *et al.*, 2006).

A atividade física aumenta a produção de RL e ERO de diversas maneiras. A via de formação destas substâncias mais comumente descrita na literatura é a do metabolismo oxidativo. Durante o exercício físico, há um aumento na necessidade de utilização do oxigênio, sendo que boa parte é consumida na fosforilação oxidativa, metabolismo ligado aos prótons e elétrons na cadeia respiratória celular formando água. Porém, estima-se que de 4 a 5% deste oxigênio não seja completamente reduzido à água, formando RL (CLARKSON & THOMPSON, 2000). Outras fontes de aumento dos RL com o exercício incluem produção de catecolaminas, xantina oxidase, isquemia-reperfusão e várias fontes secundárias, como a liberação de radicais por macrófagos recrutados para reparação de tecidos danificados (FEHRENBACH & NORTHOFF, 2001; URSO & CLARKSON, 2003). As conseqüências do

estresse oxidativo para o desempenho físico incluem, em curto prazo, limitação do tempo de exercício devido à fadiga muscular, dor muscular tardia e danos musculares (VOLLAARD *et al.*, 2005).

Em geral, os critérios utilizados para avaliar o estresse oxidativo podem ser categorizados como descrito na Figura 2, sendo que cada um desses critérios pode ser avaliado por diferentes índices, utilizando-se vários métodos analíticos. A peroxidação lipídica é a consequência mais bem descrita da ação dos RL e envolve a deterioração oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular gerando uma variedade de produtos, incluindo, principalmente, malondialdeído (MDA), hidroperóxidos, dienos conjugados e creatina quinase (CK) (KARATAS *et al.*, 2002; AGUILÓ *et al.*, 2005).

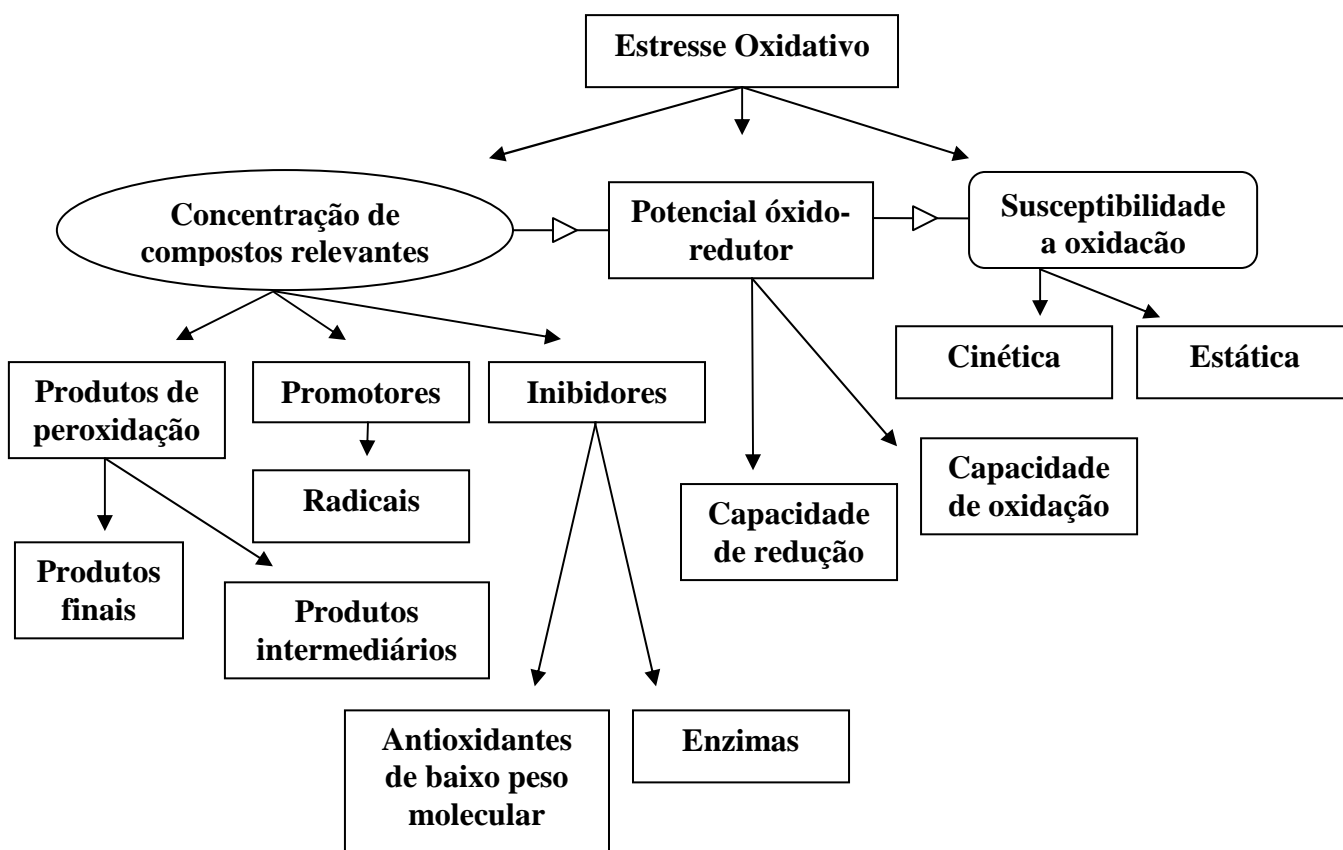


Figura 2. Critérios utilizados para acessar o estresse oxidativo (Adaptado de DOTAN *et al.*, 2004).

A avaliação da capacidade antioxidante do organismo pode ser realizada através do seu potencial total, por exemplo, com as análises de FRAP (*Ferric reducing ability of plasma*)

que dentre as metodologias de análise existentes é a que melhor se encaixa para estudos *in vivo*. Primeiramente por ter sido desenvolvida para fluidos biológicos (BENZIE & STRAIN, 1996) e posteriormente por ser a metodologia mais utilizada nos estudos que avaliam potencial redox de fluidos biológicos em situações de estresse oxidativo. Outra forma de avaliar a capacidade antioxidante do organismo é pela quantificação de antioxidantes (não-enzimáticos – vitaminas C e E, ácido úrico, bilirrubina, carotenóides; enzimáticos – SOD, GPX, CAT) que em associação com os produtos da peroxidação lipídica são os indicadores frequentemente descritos na literatura para avaliação do estresse oxidativo (DOTAN *et al.*, 2004; VOLLAARD *et al.*, 2005; FINAUD *et al.*, 2006).

3.3.1 Futebol

3.3.1.1 Dinâmica de esforço no futebol

O futebol é considerado o esporte mais popular e mais praticado em todo o mundo (REILLY, 1997; CASTAGNA *et al.*, 2007). Durante as últimas duas décadas, tem atraído cada vez mais o interesse de pesquisas para investigação dos vários aspectos deste esporte. No entanto, estudos envolvendo o impacto de um jogo e de protocolos de exercício na avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo e danos celulares, principalmente na suplementação e recuperação de jogadores, ainda são escassos na literatura (THOMPSON *et al.*, 2003; ASCENSÃO *et al.*, 2008).

O futebol é um esporte caracterizado por atividades intermitentes e de alta intensidade, em que, se intercalam, períodos de esforço (*sprints*, corridas, saltos, chutes) e recuperação (NICHOLAS *et al.*, 2000; CASTAGNA *et al.*, 2007). Um jogador durante os noventa minutos de uma partida percorre aproximadamente 10 km (SILVA *et al.*, 2007), mas, dependendo da posição, esta distância pode ser ainda maior, como é o caso dos meio-campistas, que podem chegar a percorrer até 12km por jogo (REILLY *et al.*, 2000).

As ações mais decisivas e cruciais para o desfecho de uma partida de futebol, como *sprints*, saltos, chutes e disputas pela bola, são dependentes do metabolismo anaeróbio (WRAGG *et al.*, 2000; STØLEN *et al.*, 2005). Durante uma partida de futebol um *sprint* ocorre aproximadamente a cada 90 segundos, apresenta duração média de 2-4 segundos, constituindo de 1-11% da distância total percorrida durante uma partida. No entanto, outras atividades dependentes do metabolismo anaeróbio são realizadas durante uma partida. No contexto da resistência anaeróbia da partida, cada atleta realiza de 1000-1400 atividades de curta duração que mudam a cada 4-6 segundos. As principais atividades desenvolvidas são: *sprints*, corridas de alta intensidade a cada 70 segundos, aproximadamente, 10 cabeceadas, 50 envolvimento com a bola, cerca de 30 passes, bem como a alteração de ritmo e sustentação de contrações fortes para manter o equilíbrio e a posse de bola contra a pressão defensiva, em que potência, força e resistência anaeróbia se tornam igualmente importantes (MOHR *et al.*, 2004; STØLEN *et al.*, 2005). Contudo, tendo em vista o tempo de duração do jogo, o futebol é um esporte igualmente dependente do metabolismo aeróbio (BANGSBO *et al.*, 1991; MOHR *et al.*, 2004).

A atividade de jogadores de futebol durante competições implica em semanas de treinamento, jogos e recuperação. Estas exigências competitivas podem impor tensões para vários sistemas fisiológicos como músculo-esquelético, nervoso, imunológico e metabólico, tornando a necessidade de estratégias de recuperação pós-exercício influente na preparação para a próxima partida (REILLY & EKBLUM, 2005).

Apesar de poucos dados terem sido publicados a respeito dos efeitos do estresse oxidativo sobre o desempenho em partidas de futebol, há a possibilidade de que o dano oxidativo causado pelos intensos períodos de treinamento e/ ou as modificações oxidativas provocadas durante os jogos poderiam comprometer o estado de saúde dos jogadores, bem como a atuação nos jogos (VOLLAARD *et al.*, 2005; ASCENSÃO *et al.*, 2008).

Ascensão *et al.* (2008) analisaram os efeitos de uma partida de futebol nas concentrações plasmáticas dos biomarcadores de estresse oxidativo e dano muscular, como CK, MDA, e capacidade antioxidante total e verificaram que um jogo de futebol provocou alteração dos biomarcadores de estresse oxidativo e dano muscular em jogadores de futebol por até 72 horas após o término da partida. Shipinger *et al.* (2002), avaliaram jogadores de futebol durante uma temporada competitiva e constataram elevação dos níveis séricos de peróxidos totais no período pós-competição em comparação com a pré-competição. Assim, estratégias de suplementação de nutrientes antioxidantes, como o AA, poderiam auxiliar o sistema de defesa antioxidante do organismo no combate dos RL, minimizando as alterações e os danos celulares do estresse oxidativo.

3.3.1.2 Loughborough Intermittent Shuttle Test (LIST)

Alguns pesquisadores monitoraram a resposta da frequência cardíaca, as alterações sanguíneas, estimaram o gasto energético e o consumo de oxigênio durante partidas de futebol (REILLY, 2000; NICHOLAS *et al.*, 2000; MOHR *et al.*, 2004). No entanto, devido à impossibilidade de controle de diversas variáveis que interferem nesses parâmetros (jogadores, intensidade) durante o jogo, é difícil avaliar o efeito de intervenções nutricionais. Deste modo, protocolos de exercício que simulem e controlem as demandas do esporte em questão são necessários (NEVILL *et al.*, 2003).

O LIST é um teste que reproduz as atividades normalmente desempenhadas no futebol. Consiste de cinco baterias de exercício com duração de 15 minutos, intercaladas por 3 minutos de recuperação passiva, totalizando duração fixa de 90 minutos de exercício. Os jogadores realizam um percurso de 20m, repetidamente, envolvendo estímulos de baixa, média e alta intensidade, como caminhadas, *sprints* e corridas a 55 e 95% do volume máximo de oxigênio (VO_{2max}). Nicholas *et al.* (2000) verificaram que o padrão de atividades, o gasto energético e as respostas fisiológicas e metabólicas de jogadores durante o LIST são similares

às de uma partida de futebol. Diferentes pesquisadores já utilizaram o LIST para verificar o efeito de intervenções envolvendo o consumo de carboidratos, bebidas isotônicas (NICHOLAS *et al.*, 1995 e 2000; WELSH *et al.*, 2002) e gel energético (PATTERSON & GRAY, 2007), sobre a recuperação energética de jogadores. Este protocolo de exercício também já foi utilizado em estudos que avaliaram comportamento de biomarcadores de estresse oxidativo frente ao consumo de nutrientes antioxidantes (Thompson *et al.*, 2001 e 2003). Apresenta além de reprodutibilidade fisiológica e metabólica as mesmas variáveis ecológicas a uma partida de futebol, como temperatura, umidade e solo.

4 METODOLOGIA

4.1. Obtenção e caracterização do isolado protéico de ervilha (IPE) – matriz encapsulante

O IPE foi obtido por meio do método descrito por Rangel *et al.* (2003), que consiste na separação de proteínas pelo seu ponto isoelétrico. As sementes de ervilha (*Pisum sativum*) foram obtidas em comércio local e moídas em moinho Retsch ZM, utilizando-se peneira com 0,5mm. A farinha obtida foi desengordurada, utilizando-se acetona (Merck) como solvente. A proporção de farinha:acetona usada foi de 1:10, sob agitação magnética por 10 minutos e decantação por 30 minutos para posterior troca do solvente. A troca do solvente foi realizada duas vezes e, após evaporação em capela, a farinha foi incubada por 1 hora e 30 minutos, a 4°C, em tampão Tris-HCl (50mmol – Merck), pH 8,5, na proporção 1:10 (farinha desengordurada: tampão de incubação). O incubado foi centrifugado a 4°C, na velocidade de 10000 x g por 30 minutos. O pH do sobrenadante obtido foi ajustado a 4,5 com solução de ácido clorídrico – HCl (3M – TEDIA) e novamente centrifugado por 50 minutos, sob as mesmas condições de velocidade e temperatura anteriores. Ao fim deste processo, o precipitado (*pellet*) foi recolhido e armazenado, como isolado protéico.

O IPE produzido foi caracterizado quanto ao teor de proteínas, seguindo metodologia de Lowry *et al.* (1951), usando albumina bovina (66kDa – Sigma) como padrão.

4.2 Produção e caracterização das micropartículas de ácido ascórbico

Para a produção das micropartículas foram preparadas soluções alimentadoras contendo o material ativo (ácido ascórbico) e a matriz encapsulante (IPE), na proporção de 1:1 de AA: proteína do IPE, com teor de sólidos totais de 13%. Para tanto, o AA (BASF) foi dissolvido em água deionizada sob agitação magnética. Na sequência, o IPE foi dissolvido em água deionizada, sob agitação magnética por 20 minutos, seguida de homogeneização por 10 segundos, em Ultraturrax T25 IKA-Labotechnik, a 8000rpm. A solução de AA foi então

adicionada à solução de IPE e o volume ajustado para 100mL com água deionizada, finalizando assim o preparo da solução alimentadora. Em seguida, esta solução foi seca em Mini *Spray dryer* Büchi, modelo B- 290 (Büchi Laboratoriums Technik AG), localizado no Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello da Petrobrás (CENPES), sob as seguintes condições de secagem: temperatura de entrada do ar: 180°C, velocidade de entrada do ar comprimido: 414 L/h, taxa de alimentação de amostra: 20% (6mL/min), taxa de aspiração do ar: 80% (30-35 m³/h) e bico atomizador de: 0,7mm. O material seco foi recolhido e armazenado em tubos plásticos de 50mL, protegidos em embalagens metalizadas opacas, fechadas hermeticamente (Rangel Indústria e Comércio Ltda) e mantidas em dessecador até o momento da sua utilização. O rendimento do processo foi calculado conforme equação [1] descrita por Fu *et al.* (2002):

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{MM}{MN + MMP} \times 100 \quad [1]$$

Onde *MM* é a massa coletada de micropartículas ao final do processo; *MN* a massa do material ativo; e *MMP* a massa do material de parede.

As micropartículas produzidas foram caracterizadas quanto ao teor de umidade, teor de ácido ascórbico, distribuição do tamanho das partículas e morfologia. A partir dos teores de umidade e AA, foram calculados o teor de sólidos totais (ST) e a retenção da substância ativa (AA).

- a) **Determinação do teor de umidade:** realizado por dessecação em estufa a 105°C, até peso constante (Instituto Adolfo Lutz – IAL, 1985). O teor de sólidos totais foi calculado por diferença, a partir do valor de umidade.
- b) **Determinação do teor de AA:** determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em cromatógrafo líquido Shimadzu LC10, detector UV-VIS Shimadzu, ajustado em 254 nm e coluna Hypersil de fase reversa C₁₈ (5μ), 250 x 4,5 mm. O sistema de eluição foi isocrático ao fluxo de 0,8 mL/min, com fase móvel

composta por 0.2M de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (Merck) em água deionizada e pH 2,4 ajustado com ácido fosfórico (H_3PO_4) (Merck) (GÖKMEN *et al*, 2000). As curvas de calibração foram construídas com soluções padrão de AA para CLAE (Supelco) em concentrações entre 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$. As amostras foram diluídas em fase móvel, desintegradas com agitação em vórtex por 1 minuto, seguindo-se à centrifugação (15° C, 3000 x g por 5 minutos) e o sobrenadante filtrado em membrana 0,22 μm , sendo o volume de injeção 20 μL . Para a quantificação do AA foram utilizados os dados de altura dos picos cromatográficos dos padrões e das amostras, fornecidos pelo software LiquiChrom LC10.

- c) **Retenção de AA nas micropartículas:** A partir dos teores de AA e umidade das partículas e de ST das soluções alimentadoras, calculou-se a retenção do ativo através da equação [2] conforme Trindade & Grosso (2001):

$$\text{Retenção (\%)} = \frac{TAm}{TAsa} \times 100 \quad [2]$$

Onde TAm corresponde ao teor de AA em base seca das micropartículas e $TAsa$, ao teor de AA em base seca da solução alimentadora.

- d) **Avaliação da distribuição de tamanho de partículas:** foi realizada em equipamento analisador de tamanho de partículas Malvern Master Sizer “Plus” MAF 5001, para partículas com diâmetros na faixa entre 0,05 e 550 μm . Quantidades de amostra suficientes para obtenção de grau de obscuração superior a 10% foram suspensas em 400 ml de isopropanol, sendo as suspensões mantidas sob agitação mecânica e sonicação (55KHz) durante a leitura para evitar agregação das micropartículas. A intensidade de espalhamento de luz foi medida e os dados de distribuição em volumes cumulativos de 10% (d_{10}), 50% (d_{50}) e 90% (d_{90}) foram fornecidos pelo software do equipamento.

e) **Avaliação da morfologia das micropartículas:** foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram depositadas em fita adesiva de carbono dupla-face, fixada na superfície de stubs de aço para MEV. As amostras foram recobertas com fina camada de ouro em metalizador BAL-TEC SCD-050, por 120 segundos, a 40mA e analisadas em microscópio JEOL JSM 5310, a 15kV, conforme descrito por Sheu & Rosenberg (1995). As imagens foram digitalizadas diretamente do microscópio e micrografias foram selecionadas.

4.3 Elaboração e caracterização do veículo para administração das micropartículas

Para consumo das micropartículas pelos sujeitos da pesquisa, foi elaborada uma bebida contendo água mineral, adoçante sucralose (Linea[®]), corante natural urucum (CHR HANSEN) e aroma natural de laranja (MAXENS). As bebidas foram preparadas no momento do consumo pelos sujeitos da pesquisa e o preparo consistiu basicamente na mistura de todos os ingredientes sob agitação mecânica em vortex. Posteriormente, as mesmas foram analisadas quanto à capacidade antioxidante total, de acordo com o método de redução do ferro (FRAP – *ferric reducing ability of plasma*) (BENZIE & STRAIN, 1996). Em suma, a bebida pronta para o consumo, assim como cada componente da mesma, nas proporções correspondentes a formulação, foi dissolvida em água mineral, sendo 25µL utilizados para dosagem de FRAP. Todos os procedimentos realizados para esta dosagem se seguiram conforme descrito no item 4.8.9.

4.4 Seleção e caracterização dos sujeitos da pesquisa

A amostra de sujeitos foi constituída por 10 jogadores de futebol com faixa etária entre 18 e 21 anos, classificados na categoria de juniores, sendo recrutados no Centro de Treinamento do Fluminense *Football Club*, localizado em Xerém, Duque de Caxias. Como critério de inclusão foi considerado a participação em campeonatos relacionados à modalidade em questão, ausência de doenças crônicas não transmissíveis e de consumo de suplementos

nutricionais. Os sujeitos foram informados sobre o desenvolvimento do trabalho e de todos os procedimentos e possíveis riscos associados ao mesmo; aqueles que concordaram em participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.4.1 Avaliação antropométrica e funcional

A avaliação antropométrica foi realizada por profissionais qualificados do centro de treinamento do Fluminense *Football Club*. Os dados de medidas corporais coletados foram: (1) massa corporal (kg); (2) estatura (m) e (3) percentual de gordura (%), de acordo com a padronização de Lohman (1988). Para mensuração da massa corporal os jogadores se posicionaram na plataforma da balança (Filizola[®], balança antropométrica mecânica), sem calçados, com o peso do corpo igualmente distribuído entre os pés. Foram pesados sem camisa, usando apenas a bermuda do uniforme de treinamento. A estatura foi mensurada com os sujeitos descalços, em superfície plana, calcanhares juntos tocando a haste vertical do estadiômetro, acoplado a balança, e a cabeça orientada segundo o plano de Frankfurt. As dobras cutâneas foram medidas em três pontos anatômicos: (1) abdominal, (2) peitoral e (3) coxa, três vezes, sempre do lado direito, pelo mesmo avaliador. Realizou-se média dos três valores obtidos, quando os mesmos apresentavam-se similares. Caso os valores fossem diferentes uns dos outros, a média seria realizada apenas com dois valores ou então a medição seria repetida. O percentual de gordura corporal foi calculado de acordo com Jackson & Pollock (1978).

Adicionalmente, a captação do volume máximo de oxigênio (VO_{2max}) foi estimada com a utilização de um teste de esforço máximo, denominado *Yo-Yo test* segundo Léger & Lambert (1982) e a frequência cardíaca máxima (FC_{max}) prevista determinada através da equação [3], segundo Tanaka *et al.*, 2001.

$$FC_{max} = 208 - (0,7 \times idade) \quad [3]$$

4.4.2 Avaliação do consumo alimentar

A avaliação do consumo alimentar foi coletada e analisada pelos responsáveis da pesquisa por meio da aplicação de dois recordatórios de 24 horas (R24) e do questionário de frequência de consumo de alimentos (QFCA). Todos os dados obtidos nos R24 foram convertidos para gramas e mililitros para análise quantitativa dos nutrientes ingeridos, mediante programa computadorizado NUTWIN da Escola Paulista de Medicina, em sua versão 2.5. O QFCA utilizado foi selecionado de Panza (2007) que foi adaptado de Sichieri & Everhart (1998). O QFCA tem caráter qualitativo, com 62 itens alimentares e inclui cinco opções de frequência de consumo [(1) nunca, (2) 1-3 vezes/mês, (3) 1 vez/semana, (4) 3-4 vezes/semana e (5) diariamente].

A ingestão de macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos – colesterol, ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados) e micronutrientes (vitaminas: AA, α -tocoferol e minerais: cálcio, ferro, magnésio, sódio e potássio) – MAUGHAN, (1999) foi analisada e comparada com a ingestão dietética de referência (*DRI*, 2004). As necessidades nutricionais dos atletas foram calculadas de acordo com a Diretriz Brasileira de Medicina do Exercício e do Esporte (2009), *Position of the American Dietetic Association* (ADA, 2009) e *World Health Organization* (WHO, 1999).

4.5 Desenho experimental

Os sujeitos da pesquisa realizaram dois dias de testes, separados por exatamente sete dias. No primeiro dia de teste todos os jogadores (n = 10) consumiram a bebida acrescida das micropartículas de AA. No segundo dia os jogadores consumiram placebo (n = 5) ou AA livre (n = 5) (Figura 3). Neste dia, o estudo foi duplo-cego randomizado, em que o processo de cegagem e randomização foram realizados por meio da atribuição de números aleatórios para a identificação dos sujeitos e das amostras, com posterior sorteio, por uma terceira pessoa, não envolvida na coleta dos dados.

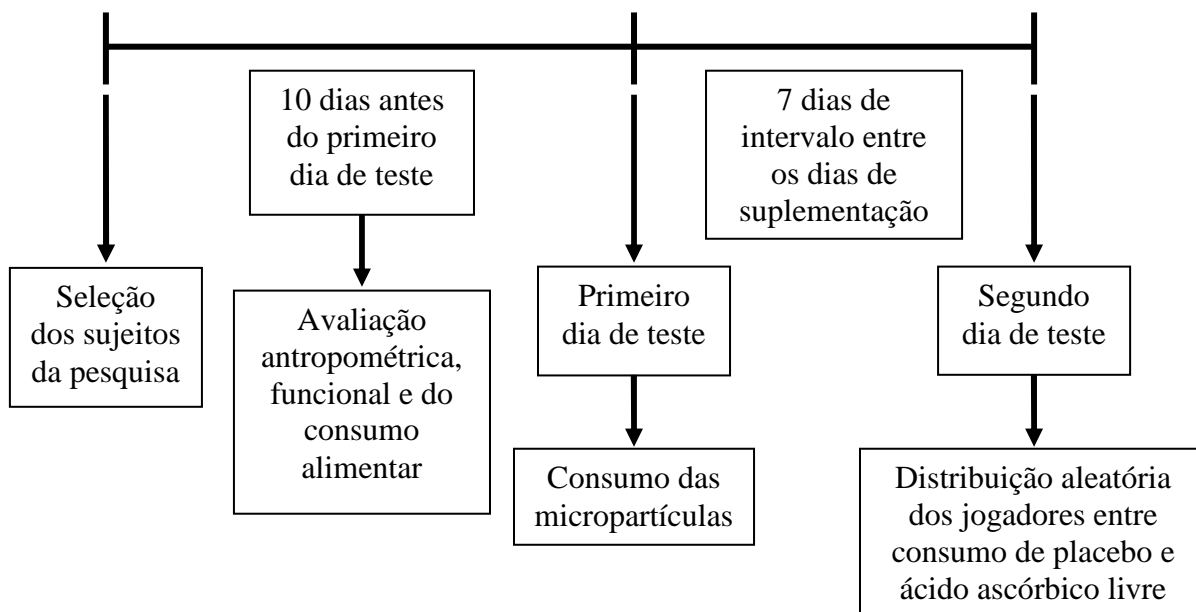


Figura 3 – Desenho experimental do estudo

Nos dias de realização dos testes físicos os jogadores de futebol chegaram em jejum de 12 horas ao centro de treinamento – CT, para consumo de desjejum padronizado, contendo alimentos normalmente consumido pelos sujeitos no CT. Duas horas após o consumo do desjejum, os jogadores foram submetidos ao protocolo de exercício LIST. Os procedimentos experimentais realizados nos dias de testes estão apresentados graficamente na Figura 4. Imediatamente após o término do exercício, os sujeitos consumiram as micropartículas de AA ou AA livre/ placebo. Amostras de sangue foram coletadas, por enfermeiros e farmacêuticos bioquímicos, por meio de punção da veia antecubital. As coletas de sangue foram realizadas seis vezes, no entanto, nem todas as análises bioquímicas foram realizadas em todos os tempos de coleta. As coletas referentes ao pré-exercício (PE), ao imediatamente após (IA) e 60 minutos após (60A) foram realizadas, principalmente, para avaliação do comportamento dos biomarcadores de estresse oxidativo nos jogadores durante a prática do LIST e frente ao consumo de AA imediatamente após o protocolo de exercício. As coletas realizadas após o teste, referentes a 10 (10A), 20(20A), 40(40A) e 60A, foram determinadas, principalmente,

para avaliação da cinética de absorção do AA após consumo das micropartículas. Para esta finalidade, três versões da bebida foram preparadas visando atender aos três grupos da pesquisa: placebo -isento de vitamina (P), consumo de AA livre - bebida acrescida de AA – 40mg/mL (AAL), consumo das micropartículas - bebida acrescida de micropartículas de AA – 100mg/mL (AAM), perfazendo um total de 1g de AA para cada grupo suplementado. O volume de bebida administrado para cada sujeito da pesquisa foi corresponde a 25mL para todos os tratamentos.

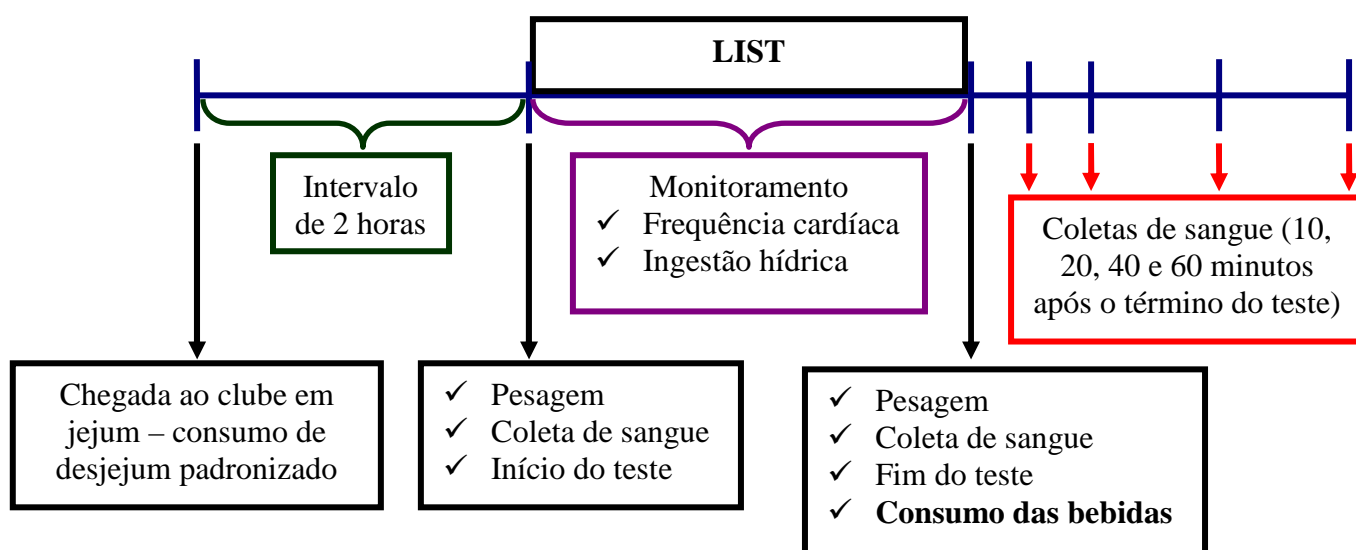


Figura 4 – Procedimentos experimentais nos dias de realização do teste físico (LIST).

4.6 Protocolo de exercício físico – LIST

O teste apresenta duração de 90 minutos distribuídos em cinco períodos de 15 minutos de exercício, separados por 3 minutos de recuperação, cada (Figura 5). Os períodos de exercício englobam atividades intermitentes e são distribuídos da seguinte forma (NICHOLAS *et al.*, 1995 e 2000):

- 60m andando (3 x 20m);
- 20m velocidade máxima de corrida;
- ~ 2 segundos de recuperação;
- 60m a uma velocidade correspondente a 55% do VO_{2max} individual (3 x 20m);

- 60m a uma velocidade correspondente a 95% do VO_{2max} individual (3 x 20m)..

O cálculo individual referente às intensidades de 55 e 95% do VO_{2max} individual foi realizado por meio da equação [4], segundo *American College of Sports Medicine* (ACMS, 2003).

$$\text{Tempo (s)} = \frac{[\text{distância(m)} \times 12]}{\%VO_{2max}} + 3,5 \quad [4]$$

Para garantir que os jogadores percorressem as distâncias delimitadas, nas velocidades previamente recomendadas, um monitor, para cada jogador, foi selecionado e treinado para auxiliá-los durante o LIST. A função dos monitores foi orientar os jogadores, usando um cronômetro, sobre o tempo para percorrer cada distância, de acordo com o VO_{2max} individual.

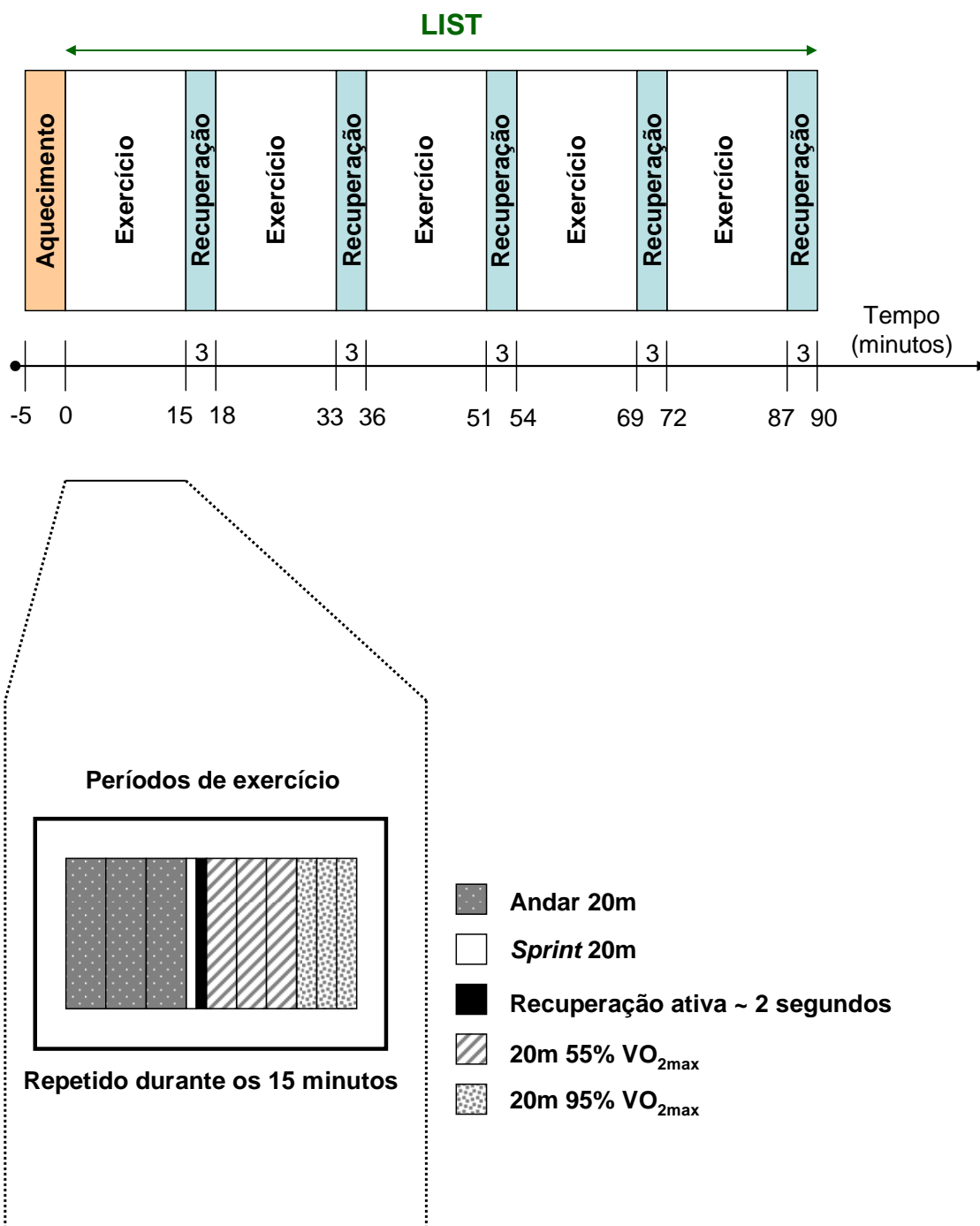


Figura 5 – Ilustração esquemática do LIST

4.6.1 Avaliação da perda de peso

A massa corporal (kg) dos jogadores foi mensurada antes e após o LIST, e cada jogador recebeu garrafas individuais de água, para monitoramento da ingestão hídrica. Os resultados obtidos serviram para calcular o percentual de perda de peso de acordo com a equação [5].

$$\text{Percentual (\%)} \text{ de perda de peso} = \frac{(Pa - Pap) + IH}{Pa} \times 100 \quad [5]$$

Onde Pa corresponde ao peso antes do exercício; Pap ao peso após o término do exercício; e IH a ingestão hídrica durante o exercício.

4.6.2 Monitoramento da frequência cardíaca

A FC foi monitorada durante a realização do exercício, sendo registrada a cada 15 segundos, com uso de um monitor cardíaco Polar[®] (RS 800 CX). Os dados armazenados foram transferidos para computador com a utilização de uma interface de conexão infravermelha (Polar[®]) e do programa *Pro Trainer 5*.

4.7 Coletas sanguíneas

As coletas de sangue foram realizadas seguindo as normas de biossegurança (Brasil, 1993) com utilização de tubos a vácuo (4mL) contendo heparina como anticoagulante (vacutainer[®]). Alíquotas do sangue foram transferidas para capilares para avaliação do hematócrito (%). O sangue restante (~ 4mL) foi centrifugado a 3000 x g por 10 minutos (THOMPSON *et al.*, 2001; ASCENÇÃO *et al.*, 2008) para obtenção do plasma e separação dos eritrócitos. O plasma obtido foi mantido sob refrigeração com posterior congelamento (-20°C, até o dia das análises) para as análises de glicose, bilirrubina, lactato, uréia e ácido úrico. Para as análises de creatina quinase, ácido ascórbico, capacidade antioxidante total, grupamentos sulfidril totais, hidroperóxidos e peroxidação lipídica, as alíquotas de plasma foram congeladas em nitrogênio líquido com posterior armazenamento a -80°C até o dia das

análises. Os eritrócitos foram utilizados para quantificação de catalase, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o dia da análise.

4.8 Análises bioquímicas

4.8.1 Hematócrito

O hematócrito foi analisado em duplicata por microcentrifugação, em todos os seis tempos de coleta de sangue, e os valores obtidos foram utilizados para correção dos resultados das demais análises realizadas no plasma de acordo com a equação [6], segundo Cholewa *et al.* (2008).

$$\Delta \text{ volume plasmático} = \frac{(100 - Ht2)}{(100 - Ht1)} \times \text{variável} \quad [6]$$

Onde, *Ht2* corresponde ao valor após o exercício; *Ht1* ao valor antes do exercício; e a *variável* corresponde ao resultado das análises bioquímicas realizadas no plasma.

4.8.2 Glicose

A glicose plasmática foi determinada, em duplicata, usando um kit de teste comercial (glicose enzimática líquida, DOLES, nº 10231810084). Alíquotas de 20µL de plasma, de todos os seis tempos de coleta de sangue, armazenadas com anticoagulante contendo fluoreto [anticoagulante (DOLES, nº 10231810040) para evitar a glicólise], foram misturadas a 2mL do reagente de cor e incubadas por cinco minutos em banho-maria a 37°C. O branco consistiu apenas de 2mL do reagente de cor. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro com microplaca de 96 poços de plástico, a 510nm.

4.8.3 Bilirrubina total

A bilirrubina plasmática total foi determinada, em duplicata, usando um kit de teste comercial (Bilirrubina, DOLES, nº 10231810035). Alíquotas de 50µL de plasma, de todos os seis tempos de coleta de sangue, foram misturadas a uma gota de nitrito sódico, duas gotas do

reagente sulfanílico (ácido sulfanílico em HCl) e 2mL da solução aceleradora (benzoato de cafeína tamponada), seguida de agitação mecânica em vortex e repouso por 3 minutos (20-30°C), para posterior leitura em espectrofotômetro. A leitura das absorbâncias foi feita a 530nm, em cubetas de plástico, sendo o equipamento zerado com o branco que consistiu de 50µL de plasma misturadas a duas gotas do reagente sulfanílico e 2mL de água destilada.

4.8.4 Lactato

O lactato plasmático foi determinado, em duplicata, através de teste enzimático utilizando a lactato desidrogenase (kit K084-2, Bioclin, nº 10269360143). Alíquotas de 10µL de plasma, de três tempos de coleta de sangue (PE, IA e 60A), foram misturadas a 1mL do monorreagente e incubadas por cinco minutos em banho-maria a 37°C para posterior leitura em espectrofotômetro. A leitura das absorbâncias foi feita a 340nm, em cubetas de quartzo, sendo o equipamento zerado com o branco que consistiu de 10µL de água e 1mL do monorreagente.

4.8.5 Uréia

A uréia plasmática foi determinada, em duplicata, com uso de kit comercial (uréia 500, DOLES, nº 10231810007). Alíquotas de 20µL de plasma, de todos os seis tempos de coleta de sangue, foram misturadas a 2mL do reagente 1 (contendo salicilato de sódio, nitroprussiado de sódio e EDTA dissódico), duas gotas de urease e incubadas por cinco minutos em banho-maria a 37°C. Em seguida, 2mL do reagente 2 (hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio) foram adicionados e as amostras incubadas novamente por 5 minutos em banho-maria a 37°C. O branco consistiu de 2mL do reagente 1, duas gotas de urease e 2mL do reagente 2. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro, a 600nm em microplaca de 96 poços de plástico.

4.8.6 Ácido úrico

O ácido úrico plasmático foi determinado, em duplicata, através de teste enzimático colorimétrico (kit K052, Bioclin, nº 10269360066). Alíquotas de 25µL de plasma, de todos os seis tempos de coleta de sangue, foram misturadas a 1mL do reagente de trabalho (tampão e reagente enzimático) e incubadas por cinco minutos em banho-maria a 37°C. O branco consistiu de apenas de 1mL do reagente de trabalho. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro, a 505nm em microplaca de 96 poços de plástico.

4.8.7 Creatina quinase (CK)

A CK plasmática foi determinada, em duplicata, através de sistema cinético com uso do kit comercial CK-NAC (DOLES, nº 10231810072). Alíquotas de 20µL de plasma, de três tempos de coleta de sangue (PE, IA e 60A), foram misturadas a 1,0mL do CK reagente. As amostras então foram homogeneizadas por agitação mecânica em vortex, e transferidas para cubeta de quartzo termostatzada a 37°C. A leitura foi realizada a 340nm, em espectrofotômetro a 37°C, nos tempos 0, 1, 2 e 3 minutos, para cálculo da média das diferenças por minuto.

4.8.8 Ácido ascórbico

A concentração plasmática de AA foi determinada, em todos os seis tempos de coleta de sangue, segundo Bobrowicz *et al.* (2001), com modificações de acordo com Gökmen *et al.* (2000), por CLAE, em cromatógrafo líquido Shimadzu LC10, detector UV-VIS Shimadzu, ajustado em 254 nm e coluna Hypersil de fase reversa C₁₈ (5µ), 250 x 4,6 mm. O sistema de eluição foi isocrático, ao fluxo de 1mL/minuto, com fase móvel composta por 0.2M de KH₂PO₄ em água deionizada e pH 2,4 ajustado com H₃PO₄. As curvas de calibração foram construídas com soluções padrão de AA para CLAE em concentrações entre 10 e 50 µg/mL..

Alíquotas de 150µL de plasma foram misturadas a 100µL de solução aquosa de ditioneitol - DTT (154mg/100ml – Sigma – agente redutor). As amostras foram mantidas por 10 minutos a 20-30°C, para garantir a redução total do ADA em AA (BOBROWICZ *et al.*, 2001). Adicionou-se, em seguida, 270µL de solução aquosa de ácido metafosfórico (24,7% - Merck). O material foi, então, centrifugado a 4°C, com velocidade de 10000 x g, por 10 minutos e alíquotas de 20µL do sobrenadante foram injetadas, em triplicata, no cromatógrafo.

Para a quantificação do AA plasmático foram utilizados os dados de altura dos picos cromatográficos dos padrões e das amostras, fornecidos pelo software LiquiChrom LC10.

4.8.8.1 Cinética de absorção do AA

As curvas das análises curso-temporais de AA plasmático nos tratamentos AAM e AAL serão ajustadas com modelos matemáticos de zero ordem [7], primeira ordem [8] e segunda ordem [9], para definição da cinética de absorção.

$$C_0 - C = k_0t \quad [7]$$

$$-\ln(C/C_0) = k_1t \quad [8]$$

$$(1/C) - (1/C_0) = k_2t \quad [9]$$

Onde C_0 é a concentração inicial, C a concentração final, t o tempo, k_0 a constante de reação de zero ordem, k_1 a constante de reação de primeira ordem e k_2 a constante de reação de segunda ordem.

As constantes de reação foram estimadas por regressão linear, sendo considerados os coeficientes de correlação mais altos para a definição da ordem de reação.

4.8.9 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total foi determinada, em todos os seis tempos de coleta de sangue, pela redução de ferro do plasma (FRAP – *ferric reducing ability of plasma*) de acordo com a metodologia de Benzie & Strain (1996), com pequenas modificações segundo Jimenez-

Alvarez *et al.* (2008) e McAnulty *et al.* (2005). Neste ensaio, os agentes redutores (antioxidantes) presentes no plasma atuam reduzindo os íons férricos (Fe^{+3}) a íons ferrosos (Fe^{+2}), os quais, por sua vez, formam um complexo com a 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) produzindo um cromóforo.

A solução de trabalho do FRAP foi preparada no dia da análise pela mistura de 25mL de tampão acetato (300mmoL – pH 3,6 – Merck), 2,5mL de TPTZ (10mmoL – Sigma, dissolvido em 40mmoL de HCl – Merck) e 2,5mL de cloreto férrico hexahidratado (20mmoL – Merck). Após o preparo, o reagente de FRAP foi mantido em banho a 37°C até o momento das análises. As análises foram procedidas como segue: 10µL de amostra [padrão, plasma ou água destilada (branco)] e 300µL do reagente de FRAP adicionados em microplaca de 96 poços de plástico, incubados a 37°C por 8 minutos com absorbância mensurada a 593nm em espectrofotômetro.

As amostras e os padrões foram analisados, em triplicata, e os valores de FRAP expressos como equivalentes de AA por regressão linear a partir de uma curva padrão de AA (270, 360, 450, 540, 630 e 720µmol/L – Supelco).

4.8.10 Grupamentos sulfidrila totais

A quantificação da concentração plasmática dos grupamentos sulfidrila totais (GS), que fornece uma idéia do ataque oxidativo as proteínas plasmáticas, foi determinada por espectrofotometria a 414nm de acordo com o método proposto por Hu (1990) que se baseia na redução do 5,5 ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB - Sigma).

Alíquotas de 50µL do plasma, de quatro tempos de coleta de sangue (PE, IA, 20A e 60A), foram misturadas a 1mL de tampão Tris-EDTA (1mM - Merck), sendo feita uma primeira leitura a 412nm (leitura A1). Após esta leitura, foram adicionados 20µL de DTNB 10mM, diluído em metanol (TEDIA). Esperou-se 15 minutos a temperatura entre 20-30°C e fez-se nova leitura (leitura A2). O branco continha somente DTNB e tampão tris-EDTA. Os

grupos sulfidrilos totais foram expressos em nmol/mg de proteínas do plasma, usando-se o coeficiente de absorção molar = 13,600 mmol/cm (Faure & Lafond, 1995).

4.8.11 Hidroperóxidos

A concentração plasmática de hidroperóxidos foi determinada, em todos os seis tempos de coleta de sangue, pelo método do alaranjado de xilenol versão 2 (FOX2 – *ferrous oxidation in xylene orange*) de acordo com a metodologia de Södergren *et al.*, (1998). Este método se baseia na oxidação de Fe^{+2} a Fe^{+3} por agentes oxidantes presentes na amostra, o qual forma um complexo com o reagente alaranjado de xilenol produzindo um cromóforo.

A solução de trabalho do FOX2 foi preparada por dissolução de 38 g de alaranjado de xilenol (Sigma) e 440mg de butil-hidroxitolueno (BHT – Merck) em 450mL de metanol (grau CLAE - TEDIA), 49 mg de sulfato ferroso amoniacal (Sigma) dissolvido em 50mL de ácido sulfúrico (250mmol – Merck) e adicionado à solução de metanol anteriormente preparada. As amostras, os padrões, e o branco, foram analisados em triplicata, e os valores de hidroperóxidos expressos como equivalentes de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - Merck) por regressão linear a partir de curva padrão (5, 10, 20, 30, 40 e 50 μ mol/L). O branco da reação consistiu da substituição do plasma por água destilada.

Alíquotas de 10 μ L de uma solução de trifenilfosfina (TPP – Sigma – 10mmol em metanol) e de metanol (grau CLAE) foram adicionadas a 90 μ L de plasma. O TPP foi adicionado visando à redução dos hidroperóxidos. As amostras foram, então, incubadas, por 30 minutos (20-30°C). Na sequência, 900 μ L do reagente FOX2 foram adicionados a cada amostra e as mesmas novamente incubadas por 30 minutos e em seguida, centrifugadas a 2500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi mensurado a 560nm em espectrofotômetro, utilizando microplaca de 96 poços de plástico. A partir das leituras das absorbâncias os resultados foram calculados diante da diferença dos valores encontrados entre as amostras que não foram adicionadas de TPP e as que receberam o reagente.

4.8.12 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica plasmática foi determinada através da detecção dos derivados dos produtos de oxidação, ou seja, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o MDA, de acordo com o método descrito por Puhl *et al.*, (1994). A técnica se baseia na reação de uma molécula de MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), resultando na eliminação de duas moléculas de água e a formação de um pigmento rosa.

Alíquotas de 100µL de plasma, de quatro tempos de coleta de sangue (PE, IA 20A e 60A), foram misturadas com 100µL de tampão fosfato (pH 7.4 – Merck) e 200µL de TBA [(Sigma) 1% em ácido acético (TEDIA)], após agitação mecânica em vortex, as amostras foram mantidas em banho de gelo (~ 4°C) por 60 minutos, e em seguida, por 30 minutos em banho maria a 98°C. Após isto, foi realizado resfriamento em água com gelo, e em seguida adicionado 500µL de butanol. Após agitação mecânica em vortex, as amostras foram centrifugadas a 20.000 x g por 10 minutos. A absorbância do sobrenadante foi determinada em 532nm, em microplaca de 96 poços de plástico. O branco da reação consistiu da substituição da amostra (plasma) por água deionizada. A concentração de TBARS (µmol/L) foi determinada, em triplicata, através de regressão linear com diferentes concentrações (20,15,10,5,1 e 0,5) de 1,1,3,3 – tetraetoxipropano - TEP (Sigma).

4.8.13 Catalase

A atividade da CAT foi determinada, espectrofotometricamente, em triplicata, através da decomposição do H₂O₂ em eritrócitos, segundo Aebi (1984). Os eritrócitos foram lavados com solução alcalina e armazenados a partir da mistura de 200µL de células, 20µL de inibidor de protease (Roche) e 780µL de água deionizada, com agitação manual por 10 minutos e posterior congelamento a -80°C até o momento das análises.

O desaparecimento do H₂O₂ foi monitorado a 240nm, por um minuto, a 25°C, em cubetas de quartzo. As reações foram realizadas na presença de um tampão Tris-HCl [900µL (100mM – Merck)], pH 8 e 8mM de H₂O₂ (80µL), e iniciadas a partir da adição de 20µL de alíquotas (eritrócitos diluídos 10 vezes) de quatro tempos de coleta de sangue (PE, IA 20A, 60A). O branco foi realizado na ausência de amostra, completando-se o volume com água destilada. Soluções com diferentes concentrações (45, 20, 5, 0,5, 0,05mmol) de aminotriazol, um inibidor da atividade da CAT, foi adicionado, a cada amostra, para garantir que a decomposição do H₂O₂ estivesse ocorrendo pela catalase.

Para cálculo das concentrações de CAT nas amostras, utilizou-se um fator de conversão onde uma unidade de atividade da CAT corresponde à decomposição de 1µmol H₂O₂/ minuto, sendo os resultados expressos em unidades de CAT por grama de hemoglobina (proteínas totais), e a concentração de proteínas totais analisada de acordo com Lowry *et al.* (1951), usando albumina bovina como padrão.

4.9 Aspectos de bioética

A presente pesquisa foi realizada em sua totalidade com respeito às normas contidas na resolução nº 196/96 (Conselho Nacional de Saúde), que regulamenta as práticas de pesquisas envolvendo seres humanos. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Estudos em Saúde Coletiva (IESC) da UFRJ, com o parecer nº132/2006 e processo nº 70/2006.

4.10 Análises estatísticas

Os resultados estão expressos por média ± desvio padrão (M ± DP). As diferenças entre as análises bioquímicas do plasma e os diferentes tempos de coleta do sangue (PE, IA, 10A, 20A, 40A e 60A) para cada tratamento (P, AAL e AAM), foram determinadas por ANOVA *one-way* com teste *post hoc* de Tukey, ao nível de significância de 95% (p<0,05).

Para as comparações entre os tratamentos foi realizada análise de variância *ANOVA two-way* com *post hoc* de *Tukey*, ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção e caracterização do isolado protéico de ervilha (IPE) – matriz encapsulante

Os grãos de ervilha foram obtidos em comércio local (marca Granfino, grupo II – tipo III – lote 074), e processados para obtenção do IPE. Foram obtidos rendimentos de $23,91 \pm 1,52$ g de isolado para cada 100g de farinha de ervilha delipidada (Tabela 1).

Tabela 1 – Percentual de rendimento e teor de proteínas e umidade do isolado protéico de ervilha – IPE (MD \pm DP).

Variáveis	Valores
Rendimento (%)	$23,91 \pm 1,52$
Concentração de proteína (mg/mL) ¹	$16,11 \pm 0,71$
Concentração de proteína (%) ¹	$52,96 \pm 2,25$
Umidade (%) ²	$45,23 \pm 0,91$

¹ Lowry *et al.* (1951)

² Instituto Adolfo Lutz (1985)

5.2 Produção e caracterização das micropartículas de ácido ascórbico

As soluções alimentadoras do *spray dryer* foram preparadas com concentração de sólidos totais em 13%. Portanto, a quantidade de IPE utilizada esteve de acordo com a respectiva concentração de proteínas, visando obter a proporção AA:PTN (1:1). A Tabela 2 mostra os resultados referentes aos parâmetros de obtenção das micropartículas.

A análise da distribuição de tamanho das micropartículas de AA demonstrou que houve predominância de tamanhos na escala micrométrica, apesar de ter sido observado, em cerca de 10% das partículas, tamanhos na ordem de sub-microns. Os valores encontrados de distribuição foram: $D_{10} 0,61 \pm 0,08 \mu\text{m}$, $D_{50} 13,07 \pm 2,77 \mu\text{m}$ e $D_{90} 27,85 \pm 4,95 \mu\text{m}$, os quais representam volumes cumulativos de 10%, 50% e 90% das partículas analisadas, respectivamente. As imagens digitalizadas obtidas nas análises em MEV (Figura 6 – A e B)

demonstraram que as micropartículas são homogêneas apresentando alto grau de esfericidade, sendo a superfície intensamente invaginada.

Tabela 2 – Parâmetros de obtenção e caracterização das micropartículas de ácido ascórbico (MD ± DP).

Variáveis	Valores
Rendimento do processo (%) ¹	49,80 ± 4,20
Concentração de proteína (mg/mL) ²	10,51 ± 0,32
Concentração de proteína (%) ²	41,37 ± 4,36
Umidade (%) ³	10,97 ± 0,29
Retenção de ácido ascórbico das partículas (%) ⁴	85,09 ± 3,44

¹Rendimento (%) = $MM \times 100 / MN + MMP$, onde *MM* é a massa coletada de micropartículas ao final do processo; *MN* a massa do material ativo; e *MMP* a massa do material de parede;

²Lowry *et al.* (1951)

³Instituto Adolfo Lutz (1985)

⁴Retenção de ácido ascórbico (%) = $(TAm/TAsa) \times 100$, onde *TAm* corresponde ao teor de AA em base seca das micropartículas e *TAsa*, ao teor de AA em base seca da solução alimentadora.

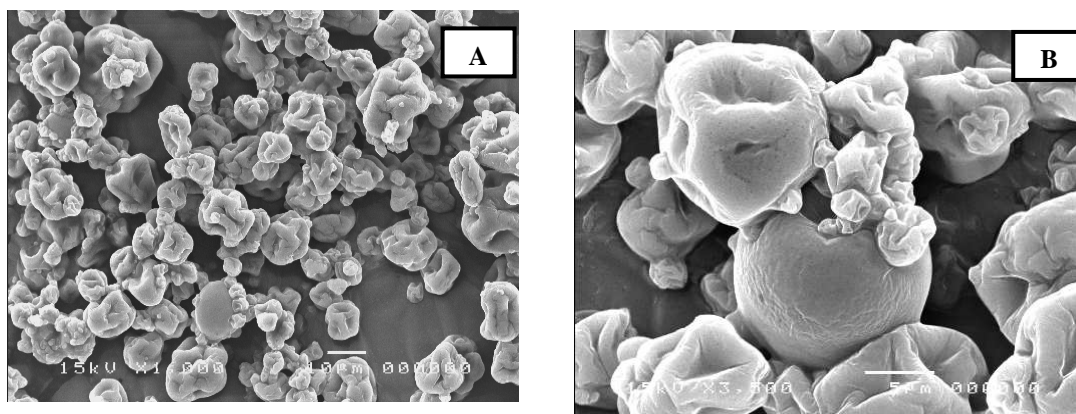


Figura 6 – Microscopias eletrônicas de varredura das micropartículas obtidas por *spray dryer* (A e B).

5.3 Caracterização quanto a capacidade antioxidante do veículo para administração das micropartículas

A análise de FRAP mostrou que a bebida elaborada com as micropartículas de AA não apresentou diferença significativa quando comparada com a bebida elaborada com o AA livre ($121,29 \pm 0,83$ e $118,93 \pm 0,72 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$, respectivamente). No entanto, ambas apresentaram diferença significativa quando comparadas com a bebida placebo ($2,51 \pm 0,03 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$), que não apresentava AA na sua composição.

5.4 Avaliação antropométrica e funcional dos sujeitos da pesquisa

A Tabela 3 mostra os resultados referentes às características antropométricas e funcionais dos sujeitos da pesquisa. Os grupos não apresentaram diferença significativa para nenhuma das variáveis avaliadas, o que demonstra a homogeneidade dos sujeitos da pesquisa.

Tabela 3 – Características antropométricas e funcionais dos sujeitos da pesquisa, de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM) (MD ± DP).

Variáveis	Grupos da pesquisa		
	P (n=5)	AAL (n=5)	AAM (n=10)
Idade (anos)	18,20 ± 0,45	18,60 ± 0,89	18,50 ± 0,71
Peso (kg)	73,54 ± 4,71	71,50 ± 6,27	71,50 ± 5,48
Estatura (m)	1,82 ± 0,06	1,82 ± 0,07	1,79 ± 0,07
% de gordura corporal¹	7,73 ± 0,71	8,68 ± 0,43	8,20 ± 0,70
VO₂max (mL/kg/minuto)²	55,51 ± 2,70	55,35 ± 1,06	55,14 ± 1,31
FC_{max} (bpm)³	195 ± 1	194 ± 3	195 ± 2

¹ Pollock & Jackson (1978)

² Yo-yo test (LÉGER & LAMBERT, 1982)

³ FC_{max} = 208 – (0,7 x idade), segundo Tanaka *et al.* (2001)

5.5 Avaliação do consumo alimentar

As Tabelas 4, 5 e 6 mostram os resultados referentes aos inquéritos dietéticos aplicados: R24 e QFCA qualitativo. O QFCA foi analisado a partir do agrupamento das frequências de consumo em categorias de acordo com Panza (2007) da seguinte forma: 1) nula, para a opção nunca; 2) baixa, para as opções 1-3 vezes/mês ou 1 vez/semana; 3) média, para a opção 3-4 vezes/semana; e 4) alta, para a opção diariamente.

O consumo energético e de macronutrientes entre os sujeitos dos três grupos experimentais não apresentou diferença significativa. De acordo com as recomendações da ADA (2009), a ingestão de carboidratos encontrada nos grupos experimentais ficou ligeiramente abaixo (Tabela 4) dos valores mínimos indicados para consumo (6 -10g/kg de peso). Já a ingestão de proteínas apresentou valores levemente superiores às recomendações

(1,2 a 1,7g/kg de peso). O consumo de lipídios apresentou valores dentro da faixa de normalidade preconizada pela ADA (2009) (20 – 35% do valor energético total - VET). No entanto, a avaliação dos componentes da fração lipídica, segundo o guia alimentar para a população brasileira (2005) mostrou consumo superior à recomendação em $9,27 \pm 1,88\%$ para o colesterol (recomendação – 300mg), sendo encontrado o consumo de ácido graxo saturado no limite superior de ingestão ($< 10\%$ VET). A ingestão preconizada de ácidos graxos mono e poliinsaturado é de 20 e 10% do VET, respectivamente. Entretanto, o consumo observado para estes ácidos graxos foi inferior à recomendação para todos os grupos experimentais.

Tabela 4 – Ingestão de energia e macronutrientes, segundo recordatório de 24 horas, de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM) (MD \pm DP).

Macronutriente	Grupos da pesquisa		
	P (n=5)	AAL (n=5)	AAM (n=10)
Energia (kcal/kg de peso)	41,39 \pm 11,21	44,98 \pm 12,60	45,26 \pm 11,36
Carboidrato			
g/ kg de peso	5,30 \pm 1,90	5,97 \pm 1,97	5,81 \pm 1,69
% do VET ¹	51,21 \pm 18,36	53,06 \pm 17,51	51,37 \pm 14,93
Proteína			
g/ kg de peso	1,78 \pm 0,53	1,88 \pm 0,44	1,95 \pm 0,91
% do VET ¹	17,22 \pm 5,16	16,72 \pm 3,91	17,25 \pm 8,07
Lipídio			
g/ kg de peso	1,54 \pm 0,18	1,63 \pm 0,29	1,57 \pm 0,25
% do VET ¹	33,46 \pm 3,84	32,63 \pm 5,88	31,19 \pm 4,89
Colesterol (mg)	333,57 \pm 91,73	322,32 \pm 92,15	327,52 \pm 87,14
Ácidos graxos saturados (% VET¹)	9,99 \pm 2,20	9,26 \pm 1,96	9,97 \pm 2,38
Ácidos graxos monoinsaturados (% VET¹)	10,49 \pm 3,17	9,87 \pm 1,57	9,95 \pm 2,47
Ácidos graxos poliinsaturados (% VET¹)	6,03 \pm 2,63	4,94 \pm 2,07	7,44 \pm 3,35

¹ VET – Valor Energético Total

A ingestão de micronutrientes foi inferior às recomendações da DRI (2004) para os nutrientes Ca, Mg, e K, cuja recomendação é de 1300mg, 410mg e 4,7g, respectivamente. A ingestão das vitaminas antioxidantes C e E também apresentou inadequação, cujas recomendações são de 90 e 15mg/dia, respectivamente. De acordo com Maughan (1999), os micronutrientes analisados nesta pesquisa são considerados os mais mobilizados durante a prática de atividade física e, portanto, os mais susceptíveis a variações de estado nutricional.

Tabela 5 – Ingestão de micronutrientes, segundo recordatório de 24 horas, de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM) (MD ± DP).

Micronutriente	Grupos da pesquisa		
	P (n=5)	AAL (n=5)	AAM (n=10)
Cálcio (mg)	764,01 ± 339,17	724,49 ± 324,34	665,39 ± 269,08
Magnésio (mg)	326,41 ± 139,28	322,98 ± 145,23	403,27 ± 199,28
Ferro (mg)	15,66 ± 4,7	16,42 ± 4,9	17,89 ± 5,92
Sódio (g)	2,21 ± 0,86	2,29 ± 0,84	2,57 ± 0,52
Potássio (g)	2,86 ± 1,09	2,71 ± 0,75	3,01 ± 1,17
Vitamina C (mg)	69,55 ± 14,67	70,35 ± 10,42	71,66 ± 13,43
Vitamina E (mg)	7,63 ± 5,27	6,71 ± 2,84	9,77 ± 4,34

A análise do QFCA foi realizada com agrupamento de todos os sujeitos da pesquisa por tratar-se de uma análise qualitativa. Os resultados indicaram que, dentre os alimentos fontes de carboidratos, o arroz e o pão de trigo foram os mais habitualmente consumidos (ambos com 100% de sujeitos na categoria de consumo de alta frequência), seguidos do macarrão (60% em consumo de média frequência). As leguminosas foram consumidas, diariamente, por todos os jogadores. No grupo das carnes, os maiores percentuais ocorreram para a carne bovina e o frango (ambos com 60%), na categoria média (3-4 vezes/semana) de frequência de consumo. Entre os laticínios, o leite (70%) foi o que mostrou o mais elevado percentual, na categoria alta frequência de consumo. Dentre as hortaliças e frutas, as percentagens mais elevadas encontravam-se nas categorias nula e baixa. Na categoria de alta frequência de consumo para as hortaliças foram citadas apenas tomate (50%), alface (40%), cebola (30%) e beterraba (10%). No caso das frutas, somente a banana (20%) foi citada na categoria de alta frequência de consumo. Os alimentos ricos em gordura animal e vegetal mais consumidos foram manteiga (50%), margarina (50%) e óleo vegetal (100%).

Tabela 6 – Distribuição dos sujeitos da pesquisa quanto às categorias de frequência de consumo de alimentos, de acordo com o questionário de frequência de consumo de alimentos - QFCA.

Alimentos	Categorias (n)				Alimentos	Categorias (n)			
	Nula ^a	Baixa ^b	Média ^c	Alta ^d		Nula ^a	Baixa ^b	Média ^c	Alta ^d
Arroz	0	0	0	10	Açúcar	0	0	0	10
Macarrão	1	2	6	1	Biscoito com recheio	1	1	5	3
Pão de trigo	0	0	0	10	Chocolate	2	3	4	1
Pão doce	2	8	0	0	Doces (sorvete, bolo)	0	6	4	0
Bolacha salgada	1	7	2	0	Refrigerante	0	2	4	4
Bolacha doce	2	5	2	1	Bebida alcoólica	8	2	0	0
Cereal matinal	3	7	0	0	Café	5	2	0	3
Milho	1	7	2	0	Chá preto/verde	9	1	0	0
Batata (cozida)	1	3	5	1	Suco artificial	0	2	2	6
Feijão, lentilha	0	0	0	10	Suco de fruta	1	4	4	1
Salgadinhos	0	5	4	1	Alface	2	1	3	4
Batata frita	0	6	3	1	Folhosos verde-escuros	4	5	1	0
Hambúrguer	0	8	1	1	Tomate	1	2	2	5
Cachorro-quente	0	8	2	0	Cenoura	4	4	2	0
Pizza	0	7	3	0	Beterraba	3	0	6	1
Carne bovina	0	1	6	3	Cebola	5	1	1	3
Frango	0	4	6	0	Chuchu	6	1	3	0
Ovo	1	8	1	0	Abóbora	4	4	2	0
Peixe e frutos do mar	1	8	1	0	Couve-flor	7	2	1	0
Salsicha	4	4	2	0	Repolho	6	2	2	0
Embutidos	1	5	4	0	Tangerina	2	6	2	0
Leite	0	2	1	7	Banana	0	4	4	2
Queijo	0	6	2	2	Mamão	5	3	2	0
Iogurte	4	4	2	0	Maçã	2	4	4	0
Requeijão	3	3	2	2	Laranja	3	5	2	0
Manteiga	4	0	1	5	Goiaba	6	2	2	0
Margarina	4	1	0	5	Uva	3	5	2	0
Maionese	2	6	0	2	Pêra	3	5	2	0
Óleo de soja	0	0	0	10	Manga	4	3	3	0
Oleaginosas	5	4	1	0	Morango	4	4	2	0

^aOpção “Nunca”

^bOpções: “1-3vezes/mês” e/ou “1 vez/semana”

^cOpção “3-4 vezes/semana”

^dOpção “Diariamente”

Outros alimentos ricos em gordura, como salgadinhos, batata-frita e *fast foods* de forma geral, apresentaram maiores percentuais de consumo nas categorias baixa e média. Quanto ao consumo do açúcar, 100% dos jogadores relataram consumo diário, ao passo que doces e refrigerantes foram distribuídos nas categorias baixa/ média e média/ alta, respectivamente. Destaca-se o consumo de biscoito com recheio, que apresentou os maiores percentuais de consumo nas categorias média e alta (50 e 30%, respectivamente).

5.6 Protocolo de exercício – LIST

Na tabela 7, estão descritos os resultados referentes às variáveis investigadas durante a prática do protocolo de exercício. Os grupos não apresentaram diferença significativa para nenhuma das variáveis avaliadas. A média da frequência cardíaca foi de 159 ± 8 , 160 ± 9 e 161 ± 8 bpm para o grupo P, AAL e AAM, respectivamente, o que correspondeu a $86,56 \pm 5,66$, $86,97 \pm 6,36$ e $84,04 \pm 3,54\%$, respectivamente, da FC_{max} determinada teoricamente.

Tabela 7 – Parâmetros monitorados durante a prática do protocolo de exercício LIST relativos aos sujeitos da pesquisa, de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM) (MD \pm DP).

Variáveis	Grupos de pesquisa		
	P (n=5)	AAL (n=5)	AAM (n=10)
Peso antes do exercício (kg)	74,10 \pm 5,07	72,88 \pm 6,14	72,02 \pm 5,53
Peso após o exercício (kg)	72,78 \pm 4,54	71,78 \pm 5,52	71,00 \pm 5,44
Ingestão hídrica total durante o exercício (L)	0,88 \pm 0,32	0,70 \pm 0,30	0,80 \pm 0,21
Percentual de perda de peso ¹	2,92 \pm 1,10	2,42 \pm 1,40	2,53 \pm 0,83
Distância total percorrida (km)	9,94 \pm 0,61	9,52 \pm 0,27	9,68 \pm 1,10
FC_{max} no exercício (bpm)	184 \pm 4	183 \pm 6	186 \pm 5
Percentual da FC_{max} ²	94,35 \pm 1,57	94,31 \pm 1,63	95,37 \pm 1,59

¹ Percentual (%) de perda de peso = $[(Pa - Pap) + IH / Pa] \times 100$, onde *Pa* corresponde ao peso antes do exercício; *Pap* ao peso após o término do exercício; e *IH* a ingestão hídrica durante o exercício.

² $FC_{max} = 208 - (0,7 \times \text{idade})$, segundo Tanaka *et al.* (2001)

5.7 Coletas sanguíneas e análises bioquímicas

As figuras 7 a 18 apresentam os resultados das análises bioquímicas comparadas entre os tratamentos realizados P, AAL e AAM. Nas tabelas 8 a 10, são demonstrados os resultados

de cada tratamento envolvendo a comparação dos valores plasmáticos de cada análise bioquímica entre os tempos de coleta de sangue (PE, IA, 10A, 20A, 40A e 60A).

O protocolo de exercício não induziu alterações significativas ($p < 0,05$) na concentração plasmática de glicose entre os três grupos experimentais nos tempos de coletas de sangue avaliados (Figura 7). Entretanto os valores de glicose aumentaram significativamente ($p < 0,05$) no tempo IA em comparação com o PE, para todos os tratamentos, mantendo-se constante e similar aos valores basais a partir do tempo 10A, até o tempo 60A em todos os grupos experimentais (Tabelas 8 – 10).

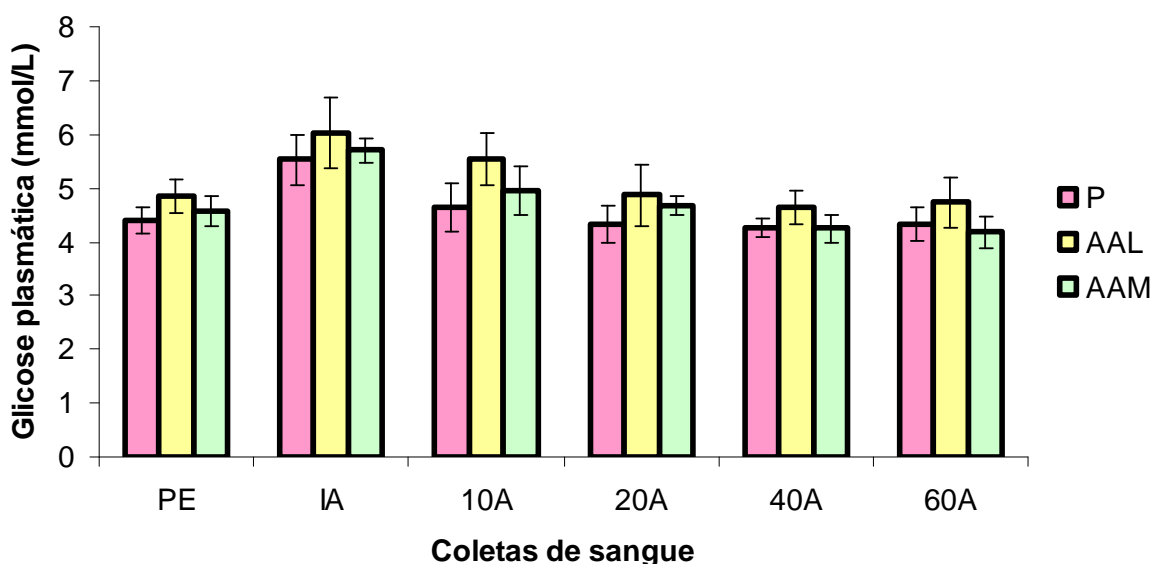


Figura 7 – Concentração plasmática de glicose de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD \pm DP).

A variação da concentração plasmática de bilirrubina total também não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais (Figura 8). O valor médio referente ao PE foi de $1,04 \pm 0,21$, $1,08 \pm 0,09$ e $1,15 \pm 0,07$ mg/dL para os grupos experimentais, P, AAL e AAM, respectivamente. Estes valores estão dentro da faixa de normalidade para adultos (até 1,2 mg/dL).

Tabela 8 – Tabela das concentrações dos componentes plasmáticos avaliados ao longo das coletas de sangue para o grupo de tratamento placebo - P

Variáveis	P					
	PE	IA	10A	20A	40A	60A
Glicose (mmol/L)	4,40±0,26	5,54±0,47 ^a	4,64±0,44 ^b	4,32±0,34 ^b	4,25± 018 ^b	4,33± 0,30 ^b
Bilirrubina total (mg/dL)	1,04 ± 0,21	1,27 ± 0,11	1,42 ± 0,11 ^a	1,38 ± 0,08 ^a	1,28 ± 0,06	1,25 ± 0,08
Lactato (mmol/L)	1,59 ± 0,23	5,13 ± 1,02 ^a	*	*	*	2,04 ± 0,36 ^b
Uréia (mg/dL)	38,36 ± 3,57	42,07 ± 1,45	40,75 ± 2,10	43,31 ± 2,56	37,32 ± 2,55 ^d	42,69 ± 3,08 ^e
Ácido úrico (mg/dL)	4,89 ± 0,31	5,83 ± 0,64 ^a	5,82 ± 0,72 ^a	5,42 ± 0,62	5,31 ± 0,50	5,41 ± 0,59
Creatina quinase (U.I./L)	350,35 ± 26,06	454,45 ± 35,40 ^a	*	*	*	548,39 ± 31,78 ^a
Ácido ascórbico (mmol/L)	117,47 ± 15,97	129,05 ± 21,20	131,03 ± 25,90	126,14 ± 15,71	124,08 ± 15,40	119,20 ± 21,88
Capacidade antioxidante total (µmol/ eq. AA)	640,12 ± 30,94	722,30 ± 52,34	667,98 ± 64,39	688,97 ± 50,41	681,69 ± 31,96	645,68 ± 44,70
Grupamentos sulfidríla totais (µmol/g ptn)	7,30 ± 0,14	7,13 ± 0,14	*	6,82 ± 0,24	*	6,86 ± 0,19
Hidroperóxidos (µmol/L)	5,41 ± 0,68	7,91 ± 0,71 ^a	8,28 ± 0,72 ^a	8,40 ± 0,97 ^a	8,28 ± 0,95 ^a	8,13 ± 0,74 ^a
Peroxidação lipídica (µmol/L)	6,84 ± 0,38	8,75 ± 0,55 ^a	*	8,99 ± 0,51 ^a	*	9,51 ± 0,62 ^a
Catalase (µmol/mg ptn)	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,02	*	0,15 ± 0,02	*	0,17 ± 0,03

^a diferença significativa em relação aos valores PE (p < 0,05); ^b diferença significativa em relação aos valores IA (p < 0,05); ^c diferença significativa em relação aos valores 10A (p < 0,05); ^d diferença significativa em relação aos valores 20A; ^e diferença significativa em relação aos valores 40A (p < 0,05).

* Dado não coletado

Tabela 9 – Tabela das concentrações dos componentes plasmáticos avaliados ao longo das coletas de sangue para o grupo de tratamento ácido ascórbico livre – AAL

Variáveis	AAL					
	PE	IA	10A	20A	40A	60A
Glicose (mmol/L)	4,85 ± 0,33	6,04 ± 0,65 ^a	5,53 ± 0,48	4,87 ± 0,59 ^b	4,64 ± 0,30 ^{b,c}	4,73 ± 0,46 ^{b,c}
Bilirrubina total (mg/dL)	1,08 ± 0,09	1,25 ± 0,07	1,53 ± 0,10 ^{a,b}	1,42 ± 0,13 ^a	1,30 ± 0,09 ^{a,c}	1,14 ± 0,14 ^{c,d}
Lactato (mmol/L)	1,84 ± 0,53	5,39 ± 0,95 ^a	*	*	*	1,95 ± 0,60 ^b
Uréia (mg/dL)	38,42 ± 3,10	43,41 ± 7,15	39,62 ± 5,50	43,44 ± 5,65	38,20 ± 6,43	41,72 ± 6,72
Ácido úrico (mg/dL)	4,70 ± 0,29	6,03 ± 0,57 ^a	5,55 ± 0,43 ^a	5,29 ± 0,34	4,97 ± 0,31 ^b	4,82 ± 0,55 ^b
Creatina quinase (U.I./L)	348,18 ± 17,22	442,40 ± 40,33 ^a	*	*	*	474,05 ± 45,06 ^a
Ácido ascórbico (mmol/L)	115,68 ± 16,71	128,44 ± 17,48	137,29 ± 3,62	147,30 ± 14,20 ^a	154,07 ± 18,14 ^a	155,18 ± 15,60 ^a
Capacidade antioxidante total (µmol/ eq. AA)	630,62 ± 35,83	687,56 ± 87,45	715,26 ± 52,88	747,64 ± 68,01	761,92 ± 61,40 ^a	766,53 ± 64,44 ^a
Grupamentos sulfidríla totais (µmol/g ptn)	7,47 ± 0,26	7,10 ± 0,37	*	6,85 ± 0,35 ^a	*	7,16 ± 0,37
Hidroperóxidos (µmol/L)	5,51 ± 0,77	7,69 ± 0,83 ^a	7,27 ± 0,61 ^a	6,93 ± 0,63 ^a	6,77 ± 0,85	6,59 ± 0,59
Peroxidação lipídica (µmol/L)	7,18 ± 0,54	8,51 ± 0,58 ^a	*	9,02 ± 0,5 ^a	*	9,37 ± 0,54 ^a
Catalase (µmol/mg ptn)	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,03	*	0,14 ± 0,03	*	0,15 ± 0,02

^a diferença significativa em relação aos valores PE (p < 0,05); ^b diferença significativa em relação aos valores IA (p < 0,05); ^c diferença significativa em relação aos valores 10A (p < 0,05); ^d diferença significativa em relação aos valores 20A.

* Dado não coletado

Tabela 10 – Tabela das concentrações dos componentes plasmáticos avaliados ao longo das coletas de sangue para o grupo de tratamento ácido ascórbico microencapsulado – AAM

Variáveis	AAM					
	PE	IA	10A	20A	40A	60A
Glicose (mmol/L)	4,57 ± 0,28	5,70 ± 0,24 ^a	4,96 ± 0,45 ^b	4,67 ± 0,18 ^b	4,25 ± 0,27 ^b	4,18 ± 0,30 ^b
Bilirrubina total (mg/dL)	1,15 ± 0,07	1,31 ± 0,12	1,52 ± 0,12 ^{a,b}	1,31 ± 0,20 ^c	1,18 ± 0,18 ^c	1,12 ± 0,11 ^c
Lactato (mmol/L)	1,92 ± 0,54	7,44 ± 1,12 ^a	*	*	*	2,22 ± 0,43 ^b
Uréia (mg/dL)	39,55 ± 5,51	45,16 ± 6,32	42,63 ± 2,75	44,80 ± 6,22	46,71 ± 5,84	49,62 ± 5,51
Ácido úrico (mg/dL)	4,71 ± 0,49	5,65 ± 0,72 ^a	6,12 ± 0,69 ^a	5,87 ± 0,67 ^a	5,23 ± 0,61 ^c	4,91 ± 0,67 ^{c,d}
Creatina quinase (U.I./L)	324,03 ± 40,30	401,95 ± 43,17 ^a	*	*	*	437,52 ± 32,94 ^a
Ácido ascórbico (mmol/L)	112,33 ± 8,17	116,45 ± 9,55	117,95 ± 8,03	120,99 ± 9,30	128,32 ± 8,08 ^a	133,77 ± 13,43 ^a
Capacidade antioxidante total (µmol/ eq. AA)	670,47 ± 42,55	725,17 ± 75,64	740,36 ± 69,34	778,75 ± 46,38 ^a	800,44 ± 28,24 ^{a,b}	845,54 ± 56,66 ^{a,b,c}
Grupamentos sulfidrilais totais (µmol/g ptn)	7,91 ± 0,50	7,39 ± 0,44	*	6,90 ± 0,69 ^a	*	7,19 ± 0,68
Hidroperóxidos (µmol/L)	5,17 ± 0,45	7,46 ± 0,31 ^a	7,17 ± 0,32 ^a	6,74 ± 0,33	6,69 ± 0,47	6,46 ± 0,38
Peroxidação lipídica (µmol/L)	6,79 ± 0,37	8,15 ± 0,47 ^a	*	8,45 ± 0,47 ^a	*	9,04 ± 0,39 ^a
Catalase (µmol/mg ptn)	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,03	*	0,13 ± 0,03	*	0,14 ± 0,02

^a diferença significativa em relação aos valores PE (p < 0,05); ^b diferença significativa em relação aos valores IA (p < 0,05); ^c diferença significativa em relação aos valores 10A (p < 0,05); ^d diferença significativa em relação aos valores 20A.

* Dado não coletado

Comparando-se os valores entre os tempos de coleta, verificou-se que, independentemente do tratamento, as concentrações plasmáticas de bilirrubina aumentaram significativamente ($p < 0,05$) no tempo IA em relação ao tempo PE, voltando praticamente aos valores basais no tempo 60A (Tabelas 8 – 10).

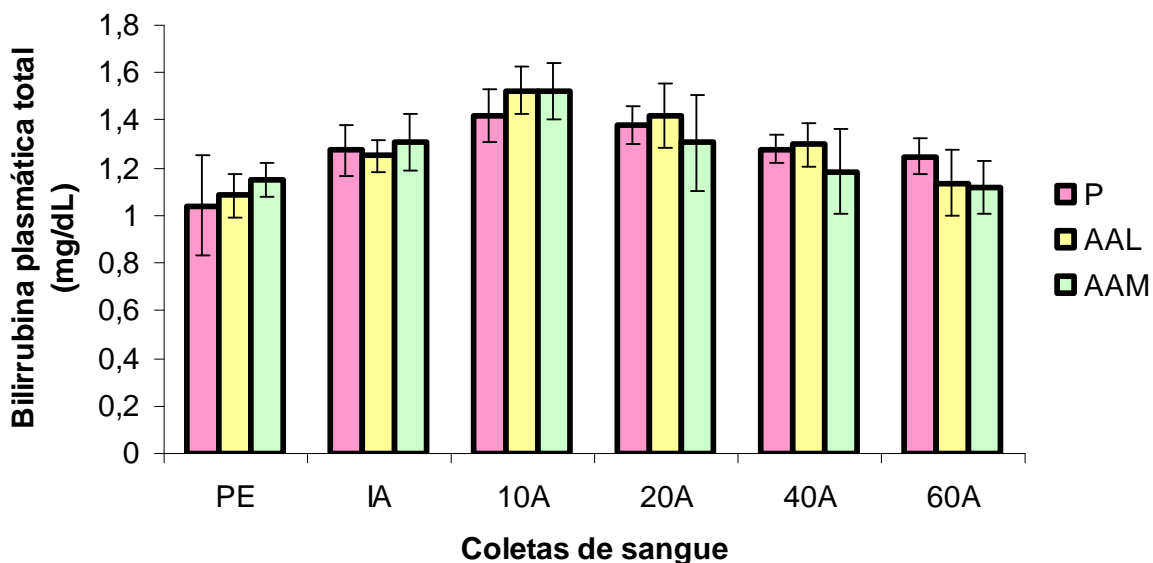


Figura 8 – Concentração plasmática de bilirrubina total de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD \pm DP).

Os níveis plasmáticos de lactato aumentaram significativamente ($p < 0,05$) no tempo IA no grupo AAM quando comparado com os outros dois grupos, P e AAL (Figura 9). Quando foi realizada a comparação de cada grupo experimental entre os tempos de coleta, os valores de lactato apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo IA quando comparado com o PE, retornando praticamente aos valores basais no tempo 60A em todos os grupos experimentais (Tabelas 8 – 10).

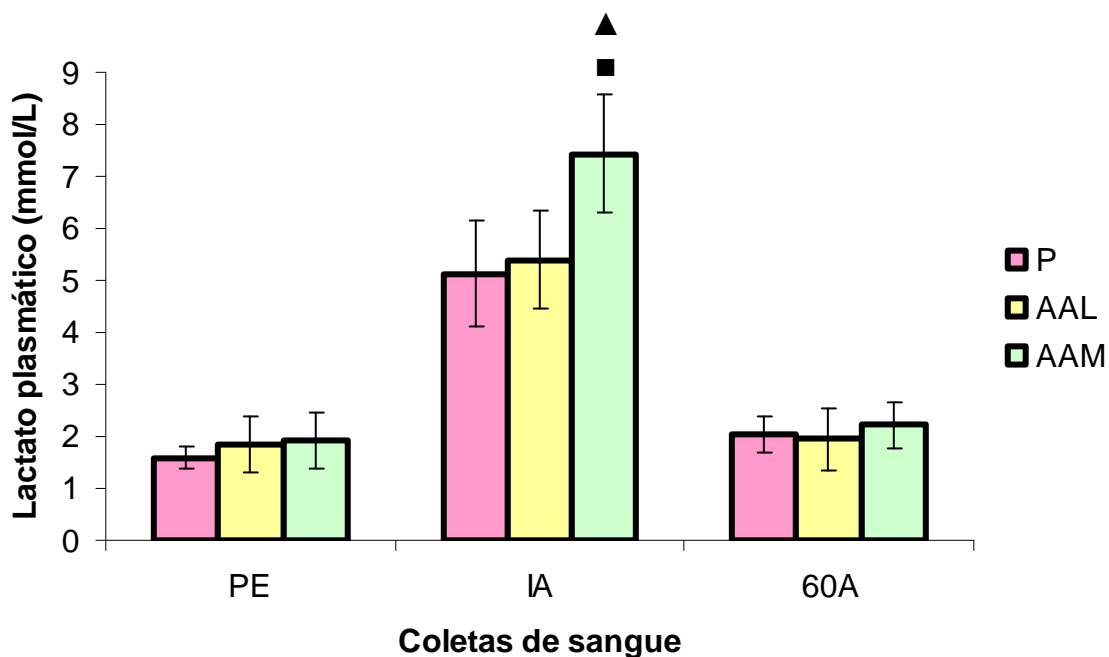


Figura 9 – Concentração plasmática de lactato de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P ($p < 0,05$); ■ Diferença significativa em relação aos valores do grupo AAL ($p < 0,05$).

Os níveis plasmáticos de uréia e ácido úrico não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais nos tempos de coletas de sangue avaliados. As concentrações PE da uréia foram de $38,36 \pm 3,57$, $38,42 \pm 3,10$ e $39,85 \pm 5,51$ mg/dL para os grupos experimentais P, AAL e AAM, respectivamente, que são valores correspondentes à faixa de normalidade para adultos (até 15 – 40 mg/dL) (Figura 10). As concentrações PE do ácido úrico foram de $4,89 \pm 0,31$, $4,70 \pm 0,29$ e $4,71 \pm 0,49$ mg/dL para os grupos experimentais P, AAL e AAM, respectivamente, que são valores correspondentes a faixa de normalidade para adultos (até 2,5 – 7,0 mg/dL) (Figura 11). Quando foi realizada a comparação de cada grupo experimental entre os tempos de coleta, os valores plasmáticos de uréia apresentaram alteração significativa ($p < 0,05$) apenas no grupo P, nos tempos de coleta 40 e 60A (Tabelas 8 – 10). No que se refere aos valores de ácido úrico, os mesmos apresentaram elevação significativa ($p < 0,05$) após o exercício em todos os grupos

experimentais, porém, a partir do tempo 40A, os grupos experimentais AAL e AAM apresentaram redução significativa ($p < 0,05$), enquanto que o grupo P apresentou tendência a manter os valores elevados.

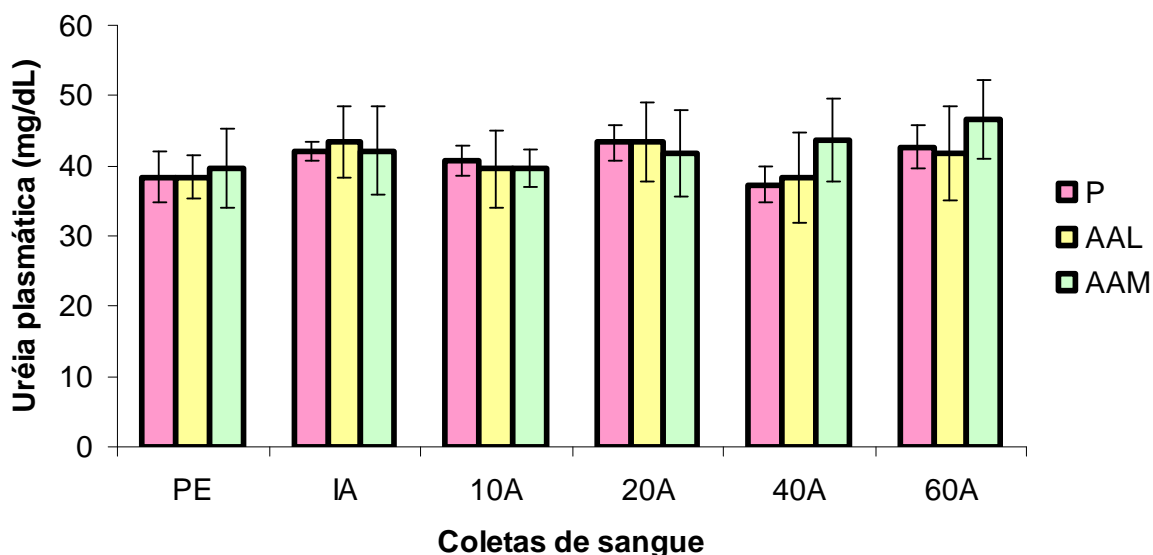


Figura 10 – Concentração plasmática de uréia de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD \pm DP).

A concentração plasmática da CK apresentou uma menor elevação ($p < 0,05$) nos tempos IA e 60A, para o grupo AAM quando comparado com o grupo P (Figura 12). Comparando-se entre os tempos de coleta, para cada tratamento, verificou-se que, as concentrações plasmáticas de CK apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) nos tempos IA e 60A para todos os grupos experimentais, quando comparados com o tempo PE (Tabelas 8 – 10) não retornando aos valores basais no tempo 60A em nenhum dos grupos experimentais.

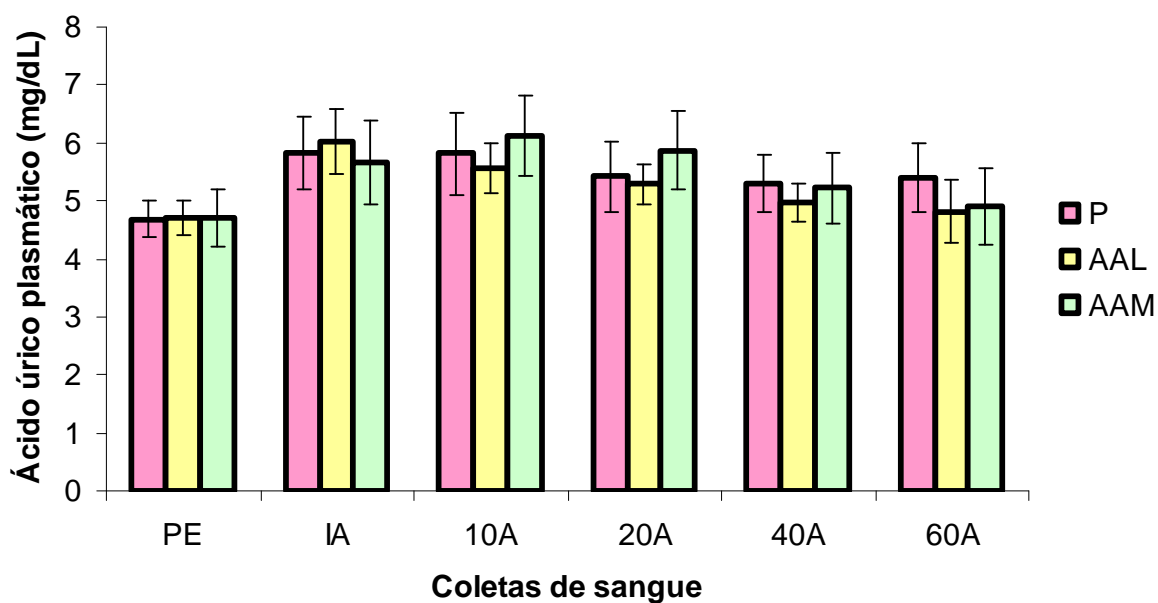


Figura 11 – Concentração plasmática de ácido úrico de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP).

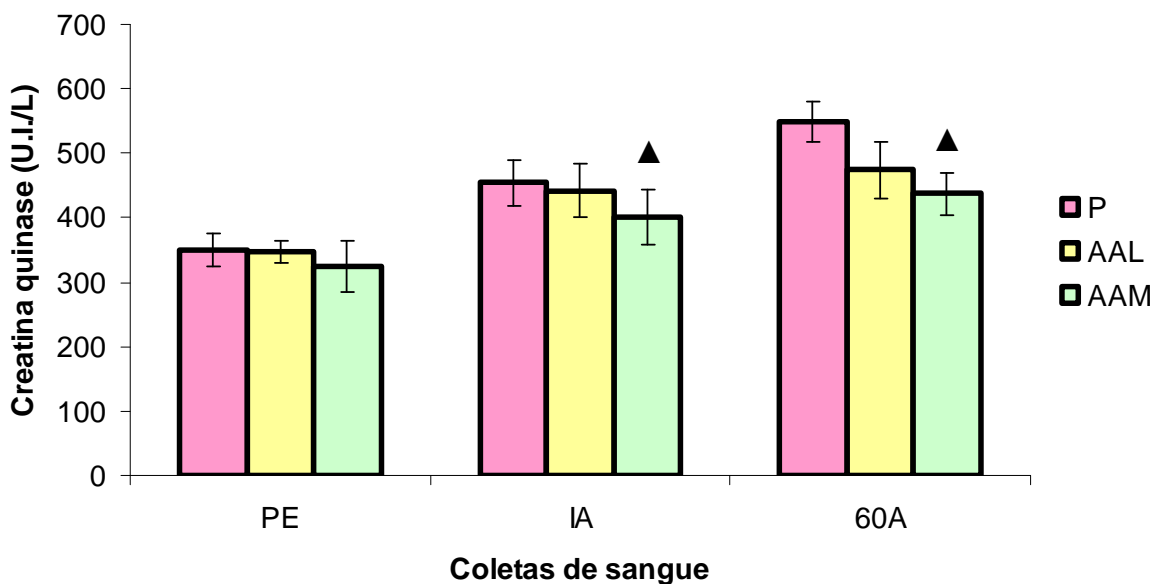


Figura 12 – Concentração plasmática de creatina quinase de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P ($p < 0,05$).

Os valores plasmáticos do AA no tempo PE não foram diferentes entre os três grupos experimentais (Figura 13). No entanto, no tempo 60A, os valores referentes ao grupo AAL apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) com relação ao grupo P, não sendo diferente, entretanto, do grupo AAM. Apesar de não haver diferença significativa entre os três grupos experimentais, percebe-se que os valores plasmáticos de AA dos grupos AAL e AAM tiveram tendência a aumentarem ao longo das coletas de sangue, sendo este aumento mais pronunciado no grupo AAL, e que os valores do grupo P apresentaram uma tendência à diminuição ao longo das coletas de sangue. Quando foi realizada a comparação de cada grupo experimental entre os tempos de coleta, os valores plasmáticos do grupo P não sofreram alteração significativa, enquanto houve aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações plasmáticas de AA nos tempos 20A, 40A e 60A, no grupo AAL, e 40A e 60A no grupo AAM, quando comparados com o tempo PE (Tabelas 8 – 10).

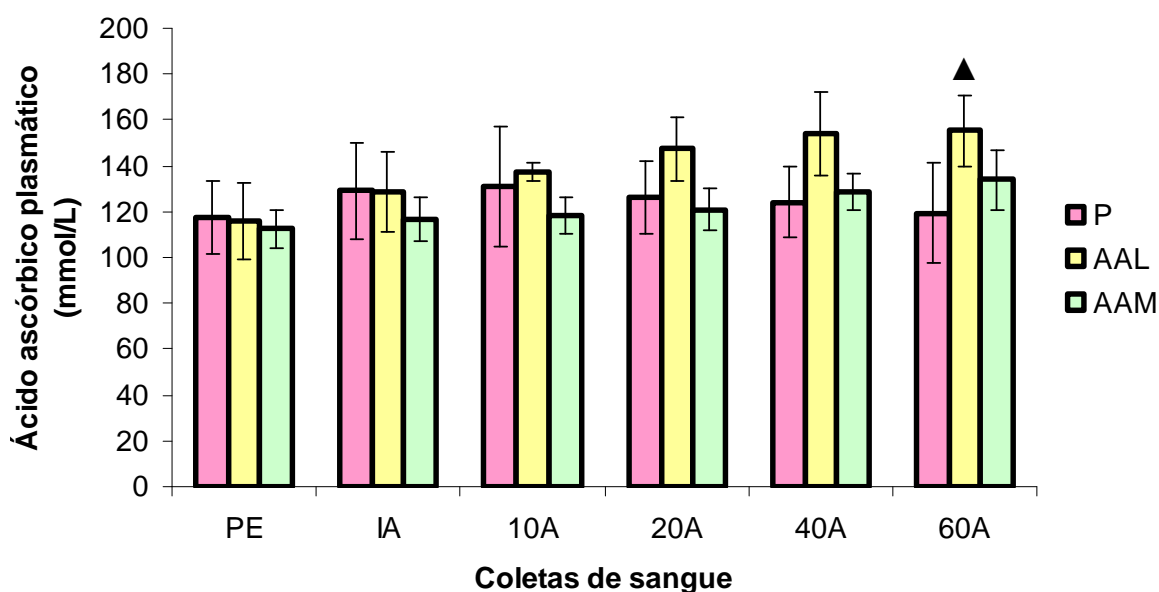


Figura 13 – Concentração plasmática de ácido ascórbico de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD \pm DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P ($p < 0,05$).

Na Tabela 11 são apresentados os coeficientes lineares (r^2) dos ajustes dos dados de concentração do AA, em função dos tempos de coleta de sangue, com as equações de cinética de reação de zero ordem e de 1^a e 2^a ordens. Ambos os grupos, AAL e AAM, apresentaram correlação mais significativa com a cinética de 2^a ordem. Contudo, a correlação verificada para o grupo AAM foi mais fraca ($r^2 = 0,7215$) do que a observada no grupo AAL ($r^2 = 0,9109$). Nas cinéticas de segunda ordem a velocidade da reação química é proporcional ao produto das concentrações de dois reagentes. Para realização do ajuste dos dados de concentração do AA do grupo P verificou-se comportamentos diferenciados nos tempos de coleta PE, IA e 10A (valores ascendentes) em comparação com os tempos 20A, 40A e 60A (valores descendentes), sendo necessária a separação dos valores. Os valores referentes ao grupo P ascendente mostraram resultados semelhantes ao grupo AAL, sendo também de 2^a ordem e apresentando coeficiente linear ($r^2 = 0,999$) próximo do obtido no grupo AAL. Os coeficientes angulares (a) das curvas de análise curso temporal do AA plasmático indicam que as elevações dos valores nos grupos AAL e AAM ocorrem a taxas de 2×10^{-5} mmol/L/ min e 9×10^{-6} mmol/L/min., respectivamente.

Tabela 11 – Coeficientes lineares e coeficientes angulares dos ajustes das curvas de concentração do ácido ascórbico plasmático em função dos tempos de coleta de sangue, nos grupos experimentais, ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), com os as equações de cinética de reação testadas.

Grupos experimentais	Modelos matemáticos					
	Ordem zero		Primeira ordem		Segunda ordem	
	K_0^a	r^2	K_1^b	r^2	K_2^c	r^2
P ascendente^d	0,13	0,998	5×10^{-4}	0,9985	9×10^{-6}	0,999
P descendente^e	0,17	0,9478	6×10^{-4}	0,9449	1×10^{-5}	0,942
AAL	0,28	0,8773	9×10^{-3}	0,8951	2×10^{-5}	0,9109
AAM	0,13	0,6911	5×10^{-3}	0,7063	9×10^{-6}	0,7215

^a $K_0 = \text{mg}\% \text{dia}^{-1}$

^b $K_1 = \text{Inmg}\% \text{dia}^{-1}$

^c $K_2 = \text{mg}\%^{-1} \text{dia}^{-1}$

^d Valores plasmáticos do placebo nos tempos PE, IA e 10A, que apresentaram comportamento ascendente

^e Valores plasmáticos do placebo nos tempos 20A, 40A e 60A, que apresentaram comportamento descendente

Os resultados referentes à capacidade antioxidante total do plasma, expressos em equivalentes de AA, estão apresentados na Figura 14. Houve aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores plasmáticos relativos ao grupo experimental AAM em comparação com o grupo P, nos tempos de coleta 40A e 60A. O comportamento plasmático da capacidade antioxidante foi similar ao encontrado no AA plasmático. Apesar de não haver diferença significativa, os valores plasmáticos dos grupos AAL e AAM apresentaram uma tendência a aumentar ao longo das coletas de sangue, sendo esse aumento mais tendencioso no grupo AAM (diferente do encontrado na análise de AA plasmático, onde o aumento foi mais pronunciado no grupo AAL). Os valores do grupo P apresentaram uma tendência a diminuir ao longo das coletas de sangue.

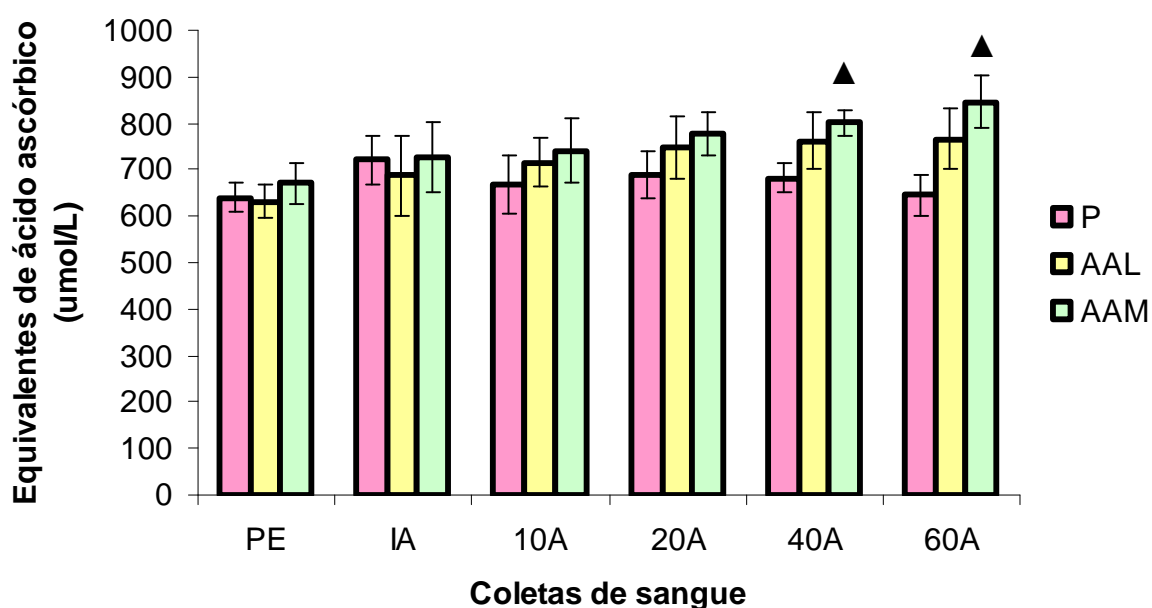


Figura 14 – Capacidade antioxidante do plasma, por equivalentes de ácido ascórbico, de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD \pm DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P ($p < 0,05$).

Quando foi realizada a comparação de cada grupo experimental entre os tempos de coleta (Tabelas 8 – 10) os valores plasmáticos do grupo P não apresentaram alterações significativas, ao passo que o grupo AAL apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) nos

tempos de coleta 40A e 60A quando comparados com o PE, e o grupo AAM apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) nos tempos 20A, 40A e 60A quando comparados com o PE e ainda no tempo 60A quando comparado com o IA e o 10A.

A Figura 15 mostra os resultados referentes à concentração plasmática de grupamentos sulfidrila totais. As concentrações obtidas nas análises não foram diferentes estatisticamente entre os grupos experimentais nos tempos de coletas de sangue avaliados e nem entre cada tratamento nos diferentes tempos de coleta de sangue (Tabelas 8 – 10).

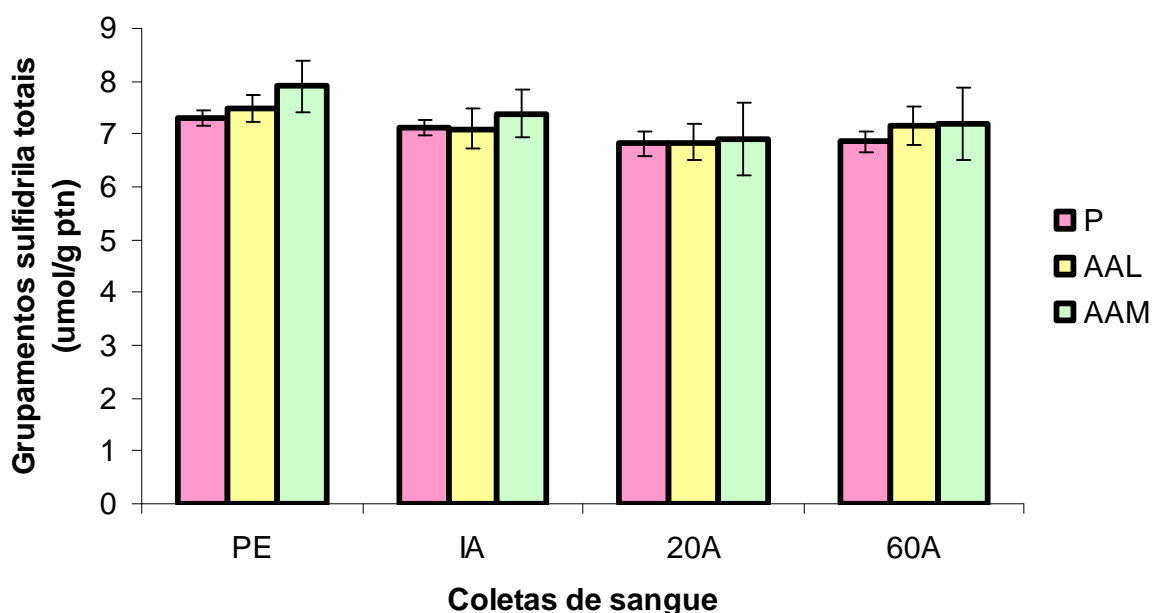


Figura 15 – Concentração plasmática de grupamentos sulfidrila totais de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP).

Os hidroperóxidos plasmáticos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) nos grupos AAM e AAL quando comparados com o grupo P, nos tempos de coleta de sangue 10A, 20A, 40A e 60A (Figura 16). Comparando-se entre os tempos de coleta, para cada tratamento, o grupo P apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) em todos os tempos de coleta (IA, 10A, 20A, 40A e 60A) quando comparados com o PE. Para o grupo AAL, houve aumento significativo ($p < 0,05$) apenas nos tempos IA, 10A e 20A, quando comparado com o

PE, enquanto que, para o grupo AAM só houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de IA e 10A quando comparados com o PE. Apesar disto, no entanto, os valores plasmáticos de hidroperóxidos não retornaram aos valores basais no tempo 60A em nenhum dos grupos experimentais (Tabelas 8 – 10).

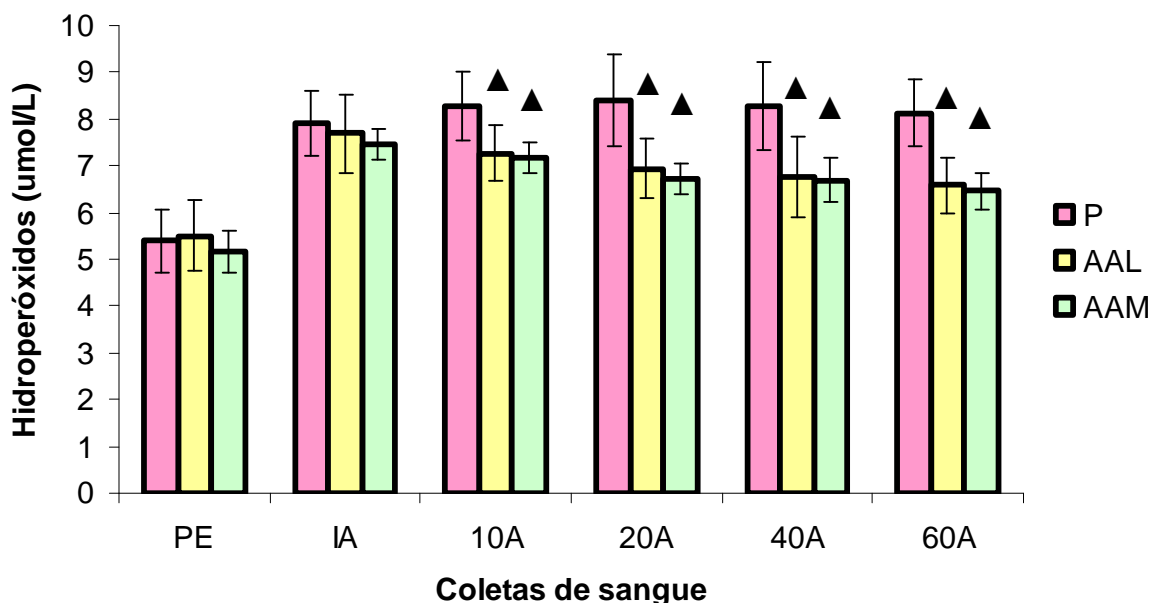


Figura 16 – Concentração plasmática de hidroperóxidos de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P ($p < 0,05$).

A Figura 17 mostra os resultados de TBARS (MDA). As concentrações não foram diferentes estatisticamente entre os grupos experimentais, nos tempos de coletas de sangue avaliados. Quando foi realizada a comparação de cada grupo experimental entre os tempos de coleta de sangue houve diferença significativa nos tempos IA, 20A e 60A quando comparado com o PE para todos os grupos experimentais (Tabelas 8 – 10), apesar do grupo P apresentar tendência a maiores elevações plasmáticas deste biomarcador, em comparação aos outros grupos (AAL e AAM).

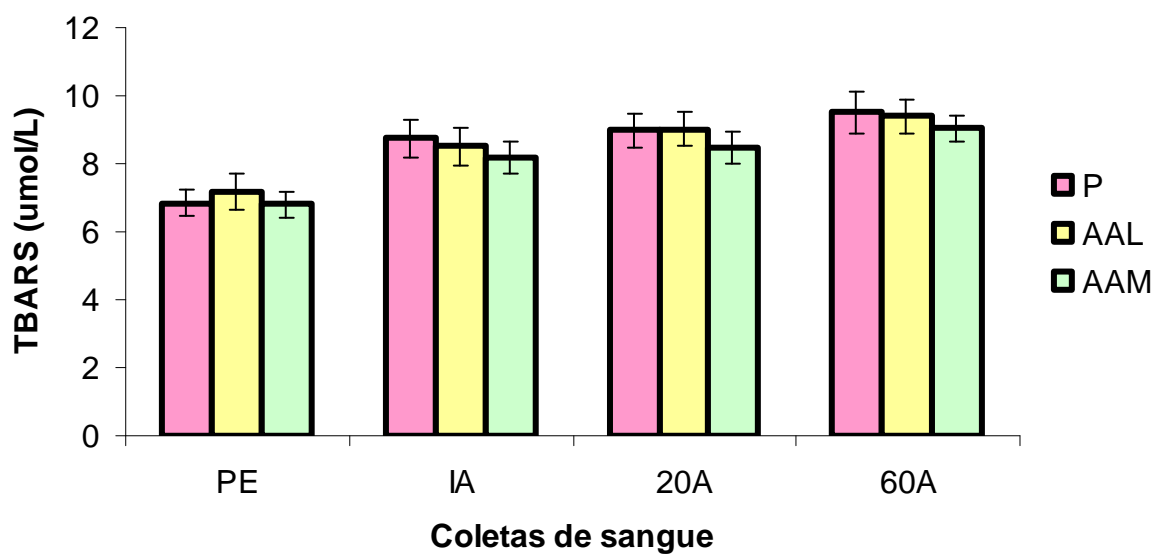


Figura 17 – Concentração plasmática de TBARS (MDA) de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP).

A Figura 18 mostra os resultados da atividade da catalase. As concentrações não foram diferentes estatisticamente entre os grupos experimentais nos tempos de coletas de sangue avaliados e nem entre cada tratamento nos diferentes tempos de coleta de sangue (Tabelas 8 – 10).

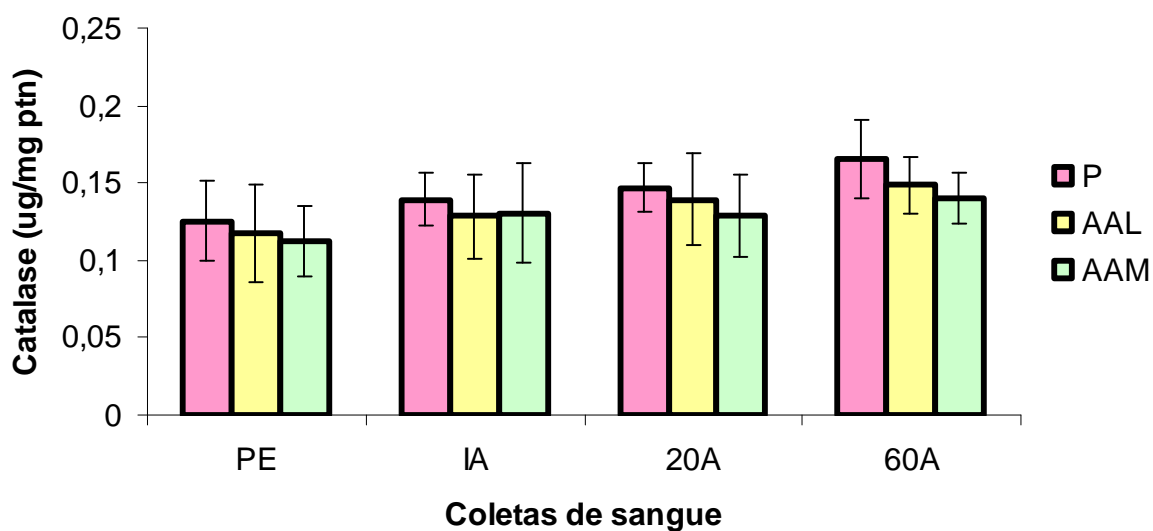


Figura 18 – Concentração plasmática de catalase de acordo com os grupos experimentais: placebo (P), ácido ascórbico livre (AAL) e micropartículas de ácido ascórbico (AAM), em todos os tempos de coletas de sangue (MD ± DP). ▲ Diferença significativa em relação aos valores do grupo P ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O concentrado protéico de ervilha (PPC) e o isolado protéico de ervilha (IPE) têm sido pesquisados e utilizados como alternativa para o encapsulamento de substâncias ativas em diferentes estudos (PIERUCCI *et al.*, 2006 e 2007; PEREIRA *et al.*, 2009). Proteínas de sementes de leguminosas podem ser consideradas boas alternativas para processos de microencapsulamento, principalmente, por serem materiais de alto valor biológico, que aliam biocompatibilidade, biodegradabilidade e eficiência na formação de partículas e baixo custo.

A formulação e as condições de secagem para a produção das micropartículas no presente estudo foram conduzidas de acordo com Pereira (2009). As partículas produzidas apresentaram rendimento de $49,80 \pm 4,20\%$ e retenção do material ativo de $85,09 \pm 3,44\%$, valores similares aos encontrados no estudo de Pereira (2009), que foi de $47,3 \pm 9,9\%$ e $88,3 \pm 7,9\%$, respectivamente. Os resultados referentes a tamanhos das partículas e morfologia também foram similares aos de Pereira (2009), demonstrando que o processo de produção das micropartículas de AA apresentou satisfatória reprodutibilidade.

As imagens das micropartículas, obtidas por MEV mostraram que as mesmas são homogêneas e com alto grau de esfericidade, sendo a superfície intensamente invaginada. Tais características estão de acordo com as micropartículas produzidas em outros estudos que utilizaram o PPC ou IPE como matriz encapsulante de ácido ascórbico, por *spray dryer* (PIERUCCI *et al.*, 2006 e PEREIRA *et al.*, 2009). A esfericidade das partículas é característica inerente ao processo de produção por *spray dryer* e as invaginações são atribuídas à natureza físico-química de matrizes protéicas (WALTON & MUMFORD, 1999). A distribuição de tamanho e a morfologia de partículas exercem forte influência sobre a cinética de liberação e, conseqüentemente, na biodisponibilidade de materiais encapsulados. Contudo, este estudo não visou relacionar tais parâmetros à cinética de absorção do ácido ascórbico microencapsulado.

As características antropométricas e funcionais dos jogadores de futebol neste estudo foram similares às encontradas na literatura para mesma modalidade e categoria (ZOPPI *et al.*, 2003; CHAMARI *et al.*, 2004; ASCENÇÃO *et al.*, 2008). Helgerud *et al.* (2001), por exemplo, trabalharam com dezenove jogadores juniores de futebol de elite que apresentavam características similares as encontradas nos jogadores desse estudo (idade $18,1 \pm 0,8$ anos, altura $181,3 \pm 5,6$ cm, peso $72,2 \pm 11,1$ kg e $VO_{2max} 58.1 \pm 4.5$ mL/kg/min).

O esforço físico do jogo de futebol implica em várias alterações fisiológicas, como aumento do débito cardíaco e do fluxo sanguíneo, aumento na liberação de catecolaminas e mobilização de leucócitos do sangue, sendo dependente, entre outros, do metabolismo aeróbio (ASCENÇÃO *et al.*, 2008). O protocolo de exercício utilizado neste estudo apresenta estímulos semelhantes aos que ocorrem em um jogo, envolvendo ações como caminhar, *sprint*, corrida a 55 e 95% do VO_{2max} . Desta forma, este protocolo provoca, teoricamente, as mesmas alterações fisiológicas de um jogo (NICHOLAS *et al.*, 2000), embora existam outras atividades que não estejam incluídas, tais como saltar, correr para trás e posse de bola. O LIST foi escolhido em detrimento a uma partida de futebol, tendo em vista a possibilidade de promover melhor controle dos jogadores, das intensidades e distâncias percorridas em todos os três grupos experimentais. Além disto, como o protocolo é realizado ao ar livre e em terreno gramado, há similaridade das condições ecológicas (clima e solo) que ocorrem durante um jogo de futebol.

As distâncias percorridas durante o LIST (Tabela 7) foram correspondentes ao percurso comumente reportado para um jogador em campo durante uma partida de futebol, que varia de 10 – 12km, dependendo da posição em campo (REILLY, 2000; MOHR *et al.*, 2003). Os valores médios e máximos de frequência cardíaca observada nos sujeitos da pesquisa durante o teste físico foram similares aos encontrados em estudos com jogadores

durante uma partida de futebol (KRUSTRUP *et al.*, 2006; ASCENSÃO *et al.*, 2008) e durante o LIST (NICHOLAS *et al.*, 2000).

Os valores médios de frequência cardíaca encontrados durante o teste físico, mensurados como %FC_{max}, estavam próximos do limiar anaeróbio (normalmente entre 80-90% da FC_{max} em jogadores de futebol) (STØLEN *et al.*, 2005). Diante deste resultado, seria fisiologicamente impossível para os jogadores manterem o desempenho físico por um tempo prolongado devido ao acúmulo de lactato. No entanto, o protocolo de exercício, assim como uma partida de futebol, intercala períodos de alta e baixa intensidade, nos quais o lactato é acumulado e removido dos músculos, favorecendo a continuidade do exercício (MOHR *et al.*, 2003). Os valores de lactato encontrados neste estudo aumentaram significativamente no tempo IA (Tabelas 8 – 10) para todos os grupos experimentais, com valores médios similares aos encontrados na literatura em estudos que utilizaram o LIST como protocolo de exercício ($5,7 \pm 0,9$ mmol/L – NICHOLAS *et al.*, 2000), assim como em um jogo ($5,0 \pm 0,4$ mmol/L – KRUSTRUP *et al.*, 2006). No tempo de coleta de sangue referente ao 60A, para todos os grupos experimentais, os valores de lactato plasmático haviam praticamente retornado aos valores basais, resultado também encontrado nos mesmos estudos supracitados.

Durante o teste, a concentração plasmática de glicose apresentou aumento significativo no tempo IA em todos os grupos experimentais (Tabelas 8 – 10), com posterior diminuição a partir do tempo 10A. No entanto, apesar da diminuição, os valores plasmáticos se mantiveram próximos aos encontrados no PE, garantindo dessa forma suporte energético para prática da atividade física. Nicholas *et al.* (2000) encontraram aumento da concentração plasmática de glicose durante o exercício (até 7mmol/L) com posterior diminuição, no entanto, sem alterações em comparação com o tempo pré exercício, assim como encontrado no presente estudo. Agrupando-se tais aspectos, pode-se afirmar que o protocolo experimental

utilizado neste estudo apresenta validade quanto à reprodução do esforço físico característico de jogadores de futebol.

O esforço físico intenso pode levar ao aumento da formação de radicais livres em praticantes de atividade física ou atletas. Estima-se que de 1-5% do volume total de oxigênio consumido na respiração resulte na formação de radicais livres (URSO & CLARKSON, 2003). Devido ao elevado nível de captação de oxigênio dos jogadores de futebol (VO_{2max}), não é surpreendente que haja alteração nos biomarcadores de estresse oxidativo, tais como, TBARS (MDA), hidroperóxidos e CK, relativos às ações provocadas pelos RL e AA, CAT, grupamentos sulfidril e capacidade antioxidante total relativos às alterações no sistema de defesa antioxidante do organismo (ASCENSÃO *et al.*, 2008).

Imediatamente após (IA) o término do protocolo de exercício, os valores plasmáticos de TBARS (MDA), e hidroperóxidos, foram significativamente maiores quando comparados com o PE para todos os grupos experimentais (Tabelas 8 – 10). No entanto, diferentemente do resultado encontrado para TBARS, os valores plasmáticos de hidroperóxidos apresentaram diminuição significativa a partir do tempo 10A com relação ao tempo IA nos grupos suplementados (AAL e AAM). A elevação das concentrações plasmáticas destes biomarcadores após o exercício tem sido observada em diferentes modalidades além do futebol (SCHIPPINGER *et al.*, 2002; ASCENSÃO *et al.*, 2008), incluindo corrida (MASTALOUDIS *et al.*, 2004), basquete (CHOLEWA *et al.*, 2008) e exercícios de resistência (McANULTY *et al.*, 2005).

Os hidroperóxidos são produtos primários da peroxidação lipídica, formados após incorporação de um oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado (AGPI) (PORTER *et al.*, 1995), sendo importante a sua avaliação uma vez que a maioria das abordagens científicas em estresse oxidativo avalia os produtos de degradação da peroxidação (LIMA & ABDALA, 2001). O malondialdeído, no entanto, é um dialdeído formado como produto secundário da

peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas induzem transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz celular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (LIMA & ABDALA, 2001; URSO & CLARKSON, 2003).

Diante das alterações plasmáticas dos biomarcadores relacionados a peroxidação lipídica, conseqüentemente, os valores de CK plasmáticos também sofreram alterações, pois a CK é uma enzima considerada um marcador indireto de estresse oxidativo perante os danos induzidos nas membranas celulares, provocados pela peroxidação lipídica (PETIBOIS *et al.*, 2002). No tecido muscular esquelético, sua função é auxiliar o metabolismo na ressíntese de adenosina trifosfato (ATP), estando envolvida na via energética para fosforilação do ATP a partir da adenosina difosfato (ADP) (TRUMP *et al.*, 1996). Os danos induzidos nas membranas celulares podem levar a permeabilidade da membrana e no extravasamento dos componentes do músculo para o meio extracelular, aumentando, dessa forma, a concentração plasmática de CK (THOMPSON *et al.*, 2001). Os valores encontrados neste estudo apresentaram diferença significativa entre o grupo P e AAM, mas não entre estes e o grupo AAL (Figura 12). Thompson *et al.* (2001 e 2003) não encontraram diferença significativa entre o grupo placebo e o grupo suplementado com AA, após a prática do LIST, para CK plasmática, por até 72 horas após o término do exercício. No entanto, Thompson *et al.* (2004) verificaram diferença significativa entre o grupo placebo e o grupo suplementado com AA 24 horas após a prática de atividade física. As diferenças encontradas entre os estudos podem justificar-se por diversas razões. No nosso estudo a avaliação da CK não foi feita nos dias subsequentes ao teste físico, o que dificulta a efetiva comparação entre os resultados da

literatura. Contudo, o aumento significativo verificado neste estudo nos tempos IA e 60A quando comparados com o tempo PE para todos os grupos, está em consonância aos outros estudos supracitados. A dosagem de AA administrada nas suplementações dos diferentes estudos, assim como os momentos de suplementação, também poderia influenciar nas divergências encontradas entre os resultados obtidos. Thompson *et al.* (2001) suplementaram 1g de AA 2 horas antes do exercício. Já Thompson *et al.* (2003) suplementaram 200mg imediatamente após o exercício, enquanto que Thompson *et al.* (2004) realizaram uma suplementação prolongada de AA com doses de 200mg, duas vezes ao dia, por 14 dias anteriores a prática da atividade física e por três dias após o exercício. No presente estudo a suplementação foi de 1g de AA imediatamente após o LIST. A observação de que houve uma menor elevação dos índices plasmáticos de CK do grupo AAM em relação ao P, e não em relação ao AAL (Figura 12), sugere que a forma microencapsulada do AA apresentou efeito antioxidante mais pronunciado.

Durante exercícios de alta intensidade e condições de isquemia muscular, o sistema de purinas é extremamente ativo e a eliminação de monofosfato de adenosina (AMP) provoca um acúmulo de hipoxantina no músculo esquelético e no plasma, sendo o ácido úrico produto final desse sistema de purinas em humanos (SVENSSON *et al.*, 2002). Desta forma, de acordo com a literatura (TAULER *et al.*, 2003; ASCENSÃO *et al.*, 2008), a concentração plasmática de ácido úrico em exercícios intensos tende a aumentar, o que corrobora os resultados encontrados no presente estudo (Tabelas 8 – 10). Por isto, é provável que as alterações oxidativas e os danos observados durante períodos de exercício intenso, como no caso do LIST neste estudo, podem ter a contribuição do sistema xantina oxidase na geração de radicais livres. A via metabólica de formação do ácido úrico é uma importante via de depuração da amônia decorrente da degradação de proteínas, apresentando a uréia como metabólito intermediário. Contudo, os valores plasmáticos de uréia não sofreram alterações

significativas independentemente dos tratamentos e dos tempos de coleta de sangue (Figura 10; Tabelas 8 – 10). Resultados semelhantes foram reportados para jogadores de futebol (SILVA *et al.*, 2007) e ciclistas (HALSON *et al.*, 2003).

O sistema de defesa antioxidante é constituído pelos componentes enzimáticos (endógenos) e não-enzimáticos (principalmente carregados por meio da alimentação) que atuam na detoxificação das espécies reativas de oxigênio de formas diferenciadas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Dentre os componentes de defesa não enzimática, os tióis, incluindo a glutathione (GSH) são uma classe de moléculas caracterizadas pela presença de grupamentos sulfidríla (-SH) (SEN & PACKER, 2000). A GSH é o principal tiol presente no organismo, atuando como substrato para a glutathione peroxidase (GPX), uma enzima responsável pela conversão de H₂O₂ em água, formando a glutathione oxidada (GSSG) (ANTUNES *et al.*, 2002). Em situações de estresse oxidativo, é possível observar uma diminuição na taxa de GSH/GSSG e, por conseguinte, na quantidade total de tióis (SEN & PACKER, 2000). Apesar de não ter havido diferença estatística significativa entre os tratamentos ou entre os tempos de coleta de sangue, verificou-se que o teste físico induziu a uma suave diminuição nos grupamentos sulfidríla totais plasmáticos (Figura 15). Diferentemente, Ascensão *et al.* (2008) verificaram que, após uma partida de futebol, os valores plasmáticos deste marcador diminuíram significativamente, mantendo-se alterados até 48 horas após a partida. Os resultados encontrados no presente estudo são similares aos obtidos por Zoppi *et al.* (2003), que não encontraram diferença significativa nos grupamentos sulfidríla totais em jogadores de futebol, apesar de o exercício ter promovido uma tendência de diminuição nesses valores.

A medida de capacidade antioxidante total é muito utilizada por diversos estudos que abordam as alterações de biomarcadores de estresse oxidativo. McNulty *et al.* (2005) trabalharam com corredores e suplementação de vitamina E, encontrando aumento na

capacidade antioxidante total imediatamente após a corrida, sendo esse aumento significativamente maior no grupo suplementação em comparação ao grupo placebo, por até 1 hora e meia após o término da corrida. Ascensão *et al.* (2008) também verificaram um aumento na capacidade antioxidante total após o jogo de futebol, no entanto sem haver suplementação de nutrientes antioxidantes. No presente estudo, a capacidade antioxidante total apresentou-se elevada a partir dos tempos 40A e 20A, nos grupos AAL e AAM, respectivamente, enquanto que não foram verificadas variações significativas entre os tempos de coleta no grupo P (Tabelas 8 – 10). Adicionalmente, o grupo AAM apresentou maior incremento da capacidade antioxidante nos tempos finais de coleta, sugerindo haver a continuidade da elevação destes valores (Figura 14).

A metodologia FRAP empregada neste estudo mensura a capacidade antioxidante dos componentes do compartimento aquoso do sangue, que é atribuída, principalmente, à proteína (bilirrubina, por exemplo) (10-28%), ao ácido úrico (7-58%) e ao ácido ascórbico (3-27%) (WAYNER *et al.*, 1987). O aumento da capacidade antioxidante plasmática, observado ao longo das coletas de sangue, parece estar relacionado ao aumento significativo do ácido úrico e da bilirrubina nos tempos iniciais de coleta de sangue e ao ácido ascórbico nos tempos finais de coleta (Tabelas 8 – 10). Contudo, há que se considerar também a influência dos componentes da formulação das bebidas consumidas pelos jogadores. Embora não tenha se verificado diferenças significativas na capacidade antioxidante entre as bebidas AAL e AAM, foi verificado aumento significativo dos valores plasmáticos de FRAP no grupo AAM (Figura 14). Isto sugere que a forma física ou os componentes da formulação das micropartículas tiveram alguma atividade diferenciada quando inseridas no sistema biológico.

A principal diferença entre as composições das bebidas AAL e AAM é a presença da matriz encapsulante IPE, a qual não contribuiu para o aumento da capacidade antioxidante *in vitro* da bebida AAM em relação à bebida AAL. Porém, depois de inseridas no sistema

digestório *in vivo*, as ações enzimáticas de hidrólise de proteína, podem ter induzido a formação de peptídeos com atividade antioxidante. Estudos estão reportando maiores atividades antioxidantes em peptídeos e aminoácidos quando comparados a proteínas com alto peso molecular (DÁVALOS *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2008), podendo potencializar dessa forma a atividade antioxidante *in vivo* após quebra das ligações peptídicas e formação de moléculas menores como os aminoácidos e peptídeos.

Contudo, não se pode descartar a possibilidade da capacidade antioxidante plasmática ter aumentado no grupo AAM em função de uma maior atividade do AA promovida pelo processo de encapsulamento. Foram verificados tamanhos de partícula na ordem de nanômetros em 10% das partículas analisadas, conforme descrito anteriormente neste estudo. Alguns estudos já demonstraram que nanopartículas, devido aos tamanhos reduzidos, podem penetrar capilares pequenos e serem absorvidas pelas células, através do sistema de absorção paracelular, mantendo sua integridade física e permitindo uma acumulação eficiente de substâncias ativas em sítios específicos no corpo (CHEN *et al.*, 2007). Estudos futuros com foco na produção de nanopartículas de AA e na avaliação comparativa com partículas micrométricas poderiam ser realizados para verificar a existência de aumento da funcionalidade do AA relacionado à redução dos tamanhos das partículas para a escala nanométrica.

As concentrações plasmáticas de ácido ascórbico entre os grupos analisados foram significativamente diferentes apenas no grupo AAL quando comparado ao grupo P, no tempo 60A. No entanto, avaliando cada grupo individualmente (Tabelas 8 – 10), o aumento nas concentrações foi significativo para ambos os grupos suplementados, ao longo dos tempos de coleta de sangue, não apresentando diferença significativa no grupo P, apesar de ser observada uma tendência a diminuição das concentrações de AA ao longo dos tempos de coleta de sangue (Figura 13). Diante dos resultados de ajuste das curvas de concentração do

AA plasmático com as cinéticas de reação (Tabela 11), verificou-se correlação mais significativa com a cinética de 2ª ordem, principalmente para o grupo AAL ao longo do estudo e P até o tempo 10A. Com isto, pode-se sugerir que a concentração plasmática do AA é dependente de dois fatores: absorção e utilização, sendo que, no caso das micropartículas, ainda pode existir um terceiro fator relacionado à velocidade de liberação do AA pelas micropartículas, justificando assim, o aumento nas concentrações plasmáticas de AA para o grupo AAL a taxas mais aceleradas ($k_2 = 2 \times 10^{-5}$) do que o AAM ($k_2 = 9 \times 10^{-6}$). Os dados sugerem que a taxa de absorção mais lenta pode favorecer a funcionalidade biológica desta vitamina, considerando-se os resultados de CK plasmática e FRAP. Verifica-se ainda que o grupo AAM apresentou uma tendência em manter o incremento do AA plasmático após 60A. Esta observação é um indicativo de que pode haver favorecimento à biodisponibilidade do mesmo, já que os transportadores intestinais são saturáveis e dose-dependentes (LI & SCHELLHORN, 2007).

Alguns estudos apontam que em sistemas de absorção saturáveis e dose-dependente, como o do AA, modelos matemáticos lineares não são satisfatórios para o ajuste dos dados e reconhecimento da cinética de reação (BARR *et al.*, 1994; LAWRENCE & GORDON, 1998). Recentemente, alguns modelos matemáticos não-lineares foram desenvolvidos para melhorar o ajuste das concentrações plasmáticas ao longo do tempo para substâncias que apresentam o referido modelo de absorção (LAWRENCE *et al.*, 1996; LAWRENCE & GORDON, 1998). No entanto, estes modelos foram desenvolvidos para substâncias altamente solúveis e livres. Dessa forma, é ainda necessário o desenvolvimento de um modelo de ajuste para materiais que não se encontram totalmente livres e solúveis, como é o caso de materiais encapsulados. Apesar disto, as concentrações plasmáticas de AA no grupo AAM mostraram, principalmente, que a vitamina microencapsulada é biodisponível e bioativa, além de ser estável em sistemas alimentares como mostrado em estudos de Pierucci *et al.* (2006).

O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui a SOD, a CAT e a GPX. Neste estudo, analisamos a concentração eritrocitária da CAT, uma enzima de ampla distribuição tecidual, apresentando, porém, atividade mais elevada no fígado, rim e hemácias, principalmente no interior de peroxissomos (ANTUNES *et al.*, 2002). Esta enzima neutraliza a ação deletéria do H₂O₂ produzido nas células a partir do radical superóxido, convertendo-o em água e oxigênio (YU, 1994). Aguiló *et al.* (2005) verificaram aumento significativo na atividade da CAT após exercício de resistência. No entanto, Zoppi *et al.* (2003) não encontraram diferença significativa na atividade da CAT em jogadores de futebol, apesar de o exercício ter promovido uma tendência ao aumento da atividade enzimática. No presente estudo, apesar de não ter havido diferença estatística significativa entre os tratamentos ou entre os tempos de coleta de sangue, verificou-se que o teste físico induziu a uma suave elevação nas concentrações de catalase (Figura 18), em todos os grupos ao longo do tempo.

Os resultados deste estudo mostraram que a suplementação de AA, uma vitamina com propriedades antioxidantes, imediatamente após a prática de um teste físico, que simula uma partida de futebol, pode auxiliar nas respostas fisiológicas relacionadas às alterações dos biomarcadores de estresse oxidativo. Os resultados encontrados no grupo não suplementado mostraram tendência a alterações em biomarcadores relacionados com o estresse oxidativo, não observadas nos grupos suplementados. Os grupos suplementados envolveram o consumo de AA livre e microencapsulado. Analisando comparativamente as respostas fisiológicas após consumo do AA livre e encapsulado em relação ao placebo, por até uma hora após seu consumo, foi possível verificar que houve redução significativa dos níveis de CK plasmática e aumento significativo da capacidade antioxidante no grupo suplementado com AA encapsulado após uma hora de suplementação. A taxa de incremento do AA plasmático entre os grupos suplementados comportou-se de forma diferente, demonstrando que o processo de encapsulamento promoveu a desaceleração na taxa de absorção desta vitamina. Isto pode ser

considerado um fator positivo para prolongamento dos efeitos antioxidantes sobre o metabolismo oxidativo em momentos tardios após o exercício físico. Este resultado ainda sugere que a forma física ou os componentes da formulação das micropartículas tiveram alguma atividade diferenciada quando inseridas no sistema biológico, podendo favorecer a funcionalidade do ácido ascórbico.

7 CONCLUSÃO

As micropartículas de ácido ascórbico – AA – produzidas neste estudo demonstraram satisfatória reprodutibilidade do processo de produção das micropartículas de AA.

O protocolo experimental, *Loughborough Intermittent Shuttle Test* – LIST – apresentou validade quanto à reprodução do esforço físico característico de jogadores de futebol, devido às respostas fisiológicas e metabólicas encontradas em comparação com a descrita na literatura para partidas de futebol.

Os biomarcadores de estresse oxidativo apresentaram alterações significativas quando se comparou o grupo não suplementado com os grupos suplementados, mostrando dessa forma que o consumo de AA após exercício físico, que simula a atividade normalmente desenvolvida em campo, pode minimizar algumas respostas metabólicas inerentes ao esforço físico.

Os biomarcadores de estresse oxidativo nos grupos suplementados apresentaram comportamentos similares. Entretanto, a suplementação com ácido ascórbico encapsulado demonstrou diferenças significativas com relação ao grupo placebo para concentrações plasmáticas de creatina quinase (diminuição) e capacidade antioxidante total (aumento), além de diferenças nas taxas de absorção do ácido ascórbico entre os grupos experimentais, promovendo menor aceleração na taxa de absorção, o que é considerado um fator positivo já que os receptores do ácido ascórbico são saturáveis e dose-dependente. Este fato sugere que as micropartículas seja pelas características morfológicas ou por algum componente da matriz encapsulante favoreçam a funcionalidade do AA no meio biológico, no entanto mais estudos devem ser realizados visando esclarecimentos dos resultados encontrados.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho apontam para diferentes desdobramentos, tais como:

- Avaliação do efeito tardio do consumo de ácido ascórbico microencapsulado, contemplando períodos de análise após 1 hora de consumo;
- Estudo da interação de macronutrientes normalmente presentes em alimentos, em especial, os carboidratos, na absorção e funcionalidade do ácido ascórbico;
- Estudo da interação do isolado protéico de ervilha com o ácido ascórbico sobre o metabolismo humano em situações de estresse oxidativo;
- Análise comparativa *in vivo* da cinética de absorção e da funcionalidade do ácido ascórbico nano e microencapsulado.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACMS – AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Diretrizes do ACSM para os teste de esforço e sua prescrição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

ADA - Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and Athletic Performance. *J. Am. Diet. Assoc.*, 109(3):509-527, 2009.

AEBI H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.*, 105:121-126, 1984.

AGUILÓ, A., TAULER, P., FUENTESPINA, E., TUR, J. A., CÓRDOVA, A.; PONS, A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol. Behav.*, 84(1):1-7, 2005.

ANTUNES, F.; DERICK, H. CADENAS, E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in vivo conditions. *Free Radic. Biol. Med.*, 33(9): 1260-1267, 2002.

ARRIGONI, O.; De TULLIO, M.C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1569(1-3): 01-09, 2002.

ASCENSÃO, A.; REBELO, A.; OLIVEIRA, E.; MARQUES, F.; PEREIRA, L.; MAGALHÃES, J. Biochemical impact of a soccer match – analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. *Clin. Biochem.*, 41(10-11):841-851, 2008.

BANGSBO, J.; NORREGAARD, L.; THORSOE, F. Activity profile of competition soccer. *Can J Sport Sci.*, 16(2): 110-116, 1991.

BARR, W.H.; ZOLA, E.M.; CANDLER, E.L.; HWANG, S.M; TENDOLKAR, A.V.; SHAMBUREK, R.; PARKER, B.; HILTY, M.D. Differential absorption of amoxicillin from the human small and large intestine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 56(3):279-285, 1994.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239(1):70-76, 1996.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.B. Introdução a Química de Alimentos. 3 ed., Varela, São Paulo, 2003.

BOBROWICZ, E., NASKALSKI, J.W., SIEDLECKI, A. Preanalytical factors in human plasma ascorbate assay. *Clin. Chim. Acta*, 314(1-2):237-239, 2001.

BRASIL. Ministério do Estado da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. *Diário Oficial da União*, 1996.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 05, de 05 de agosto de 1993. Tratamento e a destinação final dos resíduos dos serviços de saúde. *Diário Oficial da União*, 1993.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-geral da Política de Alimentação e Nutrição. *Guia Alimentar para População Brasileira: Promovendo a alimentação saudável*. Brasília, 2005. (Série Normas e Manuais Técnicos).

CASTAGNA, C.; GRANT, A.; STEFANO, D. Physiological Aspects of Soccer Refereeing Performance and Training. *Sports Med.*, 37(7): 625-646, 2007.

CASTRO, M.; CAPRILE, T.; ASTUYA, A.; MILLAN, C.; REINICKE, K.; VERA, J.C.; VASQUEZ, O.; AGUAYO, L.G.; NUALART, F. High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *J. Neurochem.* 78(4): 815-823, 2001.

CHAMARI, K.; HACHANA, Y.; AHMED, Y. B.; GALY, O.; SGHAIER, F.; CHATARD, J. C.; HUE, O.; WISLØFF, U. Field and laboratory testing in young elite soccer players. *Br. J. Sports Med.*, 38(2):191-196, 2004.

CHANDAN, K.S.; PACKER, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72(2): 653S-669S, 2000.

CHEN, L.; REMONDETTO, G.E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Sci. Technol.*, 17(5):272-283, 2006.

CHEN, L.; SUBIRADE, M. Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate-whey protein granular microspheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 65(3): 354-362, 2007.

CHOLEWA, J.; POPRZECKI, S.; ZAJAC, A.; WASKIEWICZ, Z. The influence of vitamin C on blood oxidative stress parameters in basketball players in response to maximal exercise. *Sci. Sports*, 23(3-4):176-182, 2008.

CLARKSON, P. M. & THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.*, 72(2): 637S-646S, 2000.

DÁVALOS, A., MIGUEL, M., BARTOLOME, B., & LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J. Food Prot.*, 67(9): 1939-1944, 2004.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent Developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technol.*, 23(7): 1361-1394, 2005.

DIRETRIZ BRASILEIRA DE MEDICINA DO EXERCÍCIO E DO ESPORTE. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. *Rev. Bra. Med. Esp.*, 15(3):03-12, 2009.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.*, 43(3): 200-227, 2004.

DRI - FOOD AND NUTRITION BOARD/ INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes. The complete set. Washington, DC: National Academies Press; 2004. Disponível em: <http://iom.edu>. Acesso em: 13 abr. 2009.

DZIEZAC, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technol.*, 42(4):136-151, 1988.

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA. Centro de informática em saúde. Programa de apoio a nutrição NUTWIN, [programa de computador]. Versão 2.5. São Paulo : Brasil, 2002.

- EVANS, W. Vitamin E, vitamin C and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72 (2):647-652, 2000.
- FAURE, P.; LAFOND, J.L. Measurement of plasma sulphhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: FAVIER, A.E. *Analysis of free radicals in biological systems*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1995.
- FEHRENBACH, E.; NORTHOFF, H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc. Immunol. Rev.*, 7: 66-89, 2001.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil*, 43(1):61-68, 1997.
- FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative Stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.*, 36(4):327-358, 2006.
- FU, Y.J.; SHYU, S.S.; YU, P.C. Development of biodegradable co-poly (D,L-lactic/glycolic acid) microspheres for the controlled release of 5-FU by the spray drying method. *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, 25(4):269-279, 2002.
- GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; AUREL, R. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.*, 40(9):1107-1121, 2007.
- GÖKMEN V.; KAHRAMAN N.; DEMIR N.; ACAR J. (2000). Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*, 881(1-2):309-316.
- GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Sci. Technol.*, 15(7-8):330-347, 2004.
- HALSON, S. L.; LANCASTER, G. I.; JEUKENDRUP, A. E.; GLEESON, M. Immunological Responses to Overreaching in Cyclists. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 35(5): 854-861, 2003.
- HAMILTON, I. M. J.; GILMORE, W. S.; BENZIE, I. F. F.; MULHOLLAND, C. W. E STRAIN, J. J. Interactions between vitamins C and E in human subjects. *Br. J. Nutr.*, 84(3):261-267, 2000.
- HOLMES, M.E.; MWANJEWEE, J.; SAMSON, S.E.; HAIST, J.V.; WILSON, J.X.; DIXON, S.J.; KARMAZYN, M.; GROVER, A.K. Dehydroascorbic acid uptake by coronary artery smooth muscle: effect of intracellular acidification. *Biochem. J.*, 362(2): 507-512, 2002.
- HU, M.L. Measurement of protein thiol groups and GSH in plasma. In: Parker, L. *Methods in enzymology*. San Diego: Academic Press, 1990.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 2. ed. São Paulo, 1985.
- JACKSON, A. S.; POLLOCK, M. L. Generalized equations for predicting body density of men. *Br. J. Nutr.*, 40(3):497-504, 1978.

JACOB, R.A. Vitamina C. In: Shills, M.; Olson, J.A.; Shike, M.; Ross, A.C. *Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença*. v. 1. 9. ed. São Paulo: Manole, 2003.

JIMENEZ-ALVAREZ, D.; GIUFFRIDA, F.; VANROBAEYS, F.; GOLAY, P.A.; COTTING, C.; LARDEAU, A.; KEELY, B.J. High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 56(10): 3470–3477, 2008.

KARATAS, F.; KARATEPE, M.; BAYSAR, A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 311(1):76-79, 2002.

KARLSEN, A.; BLOMHOFF, R.; GUNDERSEN, T.E. High-throughput analysis of Vitamin C in human plasma with the use of HPLC with monolithic column and UV-detection. *J. Chromatogr. B*, 824 (1-2): 132–138, 2005.

KIRBY, C.J.; WHITTLE, C.J.; RIGBY, N.; COXON, D.T.E., LAW, B.A. Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 26(5):437-449, 1991.

KRUSTRUP, P.; MOHR, M.; STEENSBERG, A.; BENCKE, J.; KJAER, M.; BANGSBO, J. Muscle and blood metabolites during a soccer game: implications for sprint performance. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 38(6): 1165-1174, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.

LAWRENCE, X.Y.; GORDON, L.A. Saturable small intestinal drug absorption in humans: modeling and interpretation of cefatrizine data. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45(2):199-203, 1998.

LAWRENCE, X.Y.; LIPKA, J.R.; CRISON, G.L.; GORDON, L.A. Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 19(3):359-376, 1996.

LÉGER, L.A.; LAMBERT, J. A Maximal Multistage 20-m Shuttle Run Test to Predict VO_{2max} . *Eur. J. of Appl. Physiol.*, 49(1):1-12, 1982.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. E. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J. Nutr.*, 137:2171-84, 2007.

LI, Y., JIANG, B., ZHANG, T., MU, W., & LIU, J. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chem.*, 106(2): 444-450, 2008.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, 37(3): 293-303, 2001.

LIU, M-L.; BERGHOLM, R.; MÄKIMATTILA, S.; LAHDENPERÄ, S.; VALKONEN, M.; HILDEN, H.; YKI-JÄRVINEN, H. E TASKINEN, M-R. A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation *in vitro* and modifies plasma antioxidants. *Am. J. Physiol.*, 276(6):E1083-E1091, 1999.

- LOHMAN T. G., ROCHE A. F., MARTORELL R. *Anthropometric standardization reference manual*. Champaign, Illinois, Human Kinetics, Inc, 1988.
- LOWRY, D. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. AND RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1):265-275, 1951.
- MASTALOUDIS, A.; MORROW, J.D.; HOPKINS, D.W.; DEVARAJ, S.; TRABER, M.G. Antioxidant supplementation in prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic. Biol. Med.*, 36(10):1329-1341, 2004.
- MAUGHAN, R.J. Role of micronutrients in sport and physical activity. *Br. Med. Bull.*, 55(3):683-690, 1999.
- McANULTY, S.R.; McANULTY, L.S.; NIEMAN, D.C.; MORROW, J.D.; SHOOTER, L.A.; HOLMES, S.; HEWARD, C.; HENSON, D.A. Effect of alpha-tocopherol supplementation on plasma homocysteine and oxidative stress in highly trained athletes before and after exhaustive exercise. *J. Nutr. Biochem.*, 16(9):530-537, 2005.
- MOHR, M.; KRUSTRUP, P.; BANGSBO, J. Match performance of high-standard soccer players with special reference to development of fatigue. *Journal J. Sports Sci.*, 221(7), 519-528, 2003.
- MOHR, M.; KRUSTRUP, P.; NYBO, L.; NIELSEN, J.J.; BANGSBO, J. Muscle temperature and sprint performance during soccer matches – beneficial effect of re-warm-up at half-time. *Scand. J. Med. Sci. Sports*, 14(3):156-162, 2004.
- NEVILL, A.M.; BROWN, D.; GODFREY, R.; JOHNSON, P.; ROMER, L.; STEWART, A.D.; WINTER, E. M. Modeling maximum oxygen uptake of elite endurance athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 35(3):488-494, 2003.
- NICHOLAS, C.W.; WILLIAMS, C.; LAKOMY, H. K. A.; PHILLIPS, G.; NOWITZ, A. Influence of ingesting a carbohydrate-electrolyte solution on endurance capacity during intermittent, high-intensity shuttle running. *J. Sports Sci.*, 13(4):283-290, 1995.
- NICHOLAS, C.W; NUTTALL, F. E.; WILLIAMS, C. The loughborough intermittent shuttle test: a field test that simulates the activity pattern of soccer. *J. Sports Sci.*, 18(2):97-104, 2000.
- ODRIOZOLA-SERRANO, I.; HERNÁNDEZ-JOVER, T.; MARTIN-BELLOSO, O. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem.*, 105(3):1151-1158, 2007.
- PANZA, V.P.S. Efeito do consume de chá verde no estresse oxidativo em praticantes de exercício resistido. Dissertação (mestrado), Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- PATTERSON, S. D.; GRAY, S. C. Carbohydrate-gel supplementation and endurance performance during intermittent high-intensity shuttle running. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, 17(5):445-455, 2007.
- PENTEADO, M.V.C. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. 1.ed. Tamboré: Manole, 2003.

PEREIRA, H.V.R. Micropartículas de Proteínas de Leguminosas e Ácido Ascórbico: Produção, Caracterização e Estudo da Liberação e Absorção *In Vitro*. Dissertação (mestrado em Nutrição), Instituto de Nutrição, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

PEREIRA, H.V.R.; SARAIVA, K.P.; CARVALHO, L.M.J.; ANDRADE, L.R.; PEDROSA, C.; PIERUCCI, A.P.T.R. Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. *Food Res. Int.*, 42(1):115-121, 2009.

PETIBOIS, C.; CAZORLA, G.; POORTMANS, J.R.; DELÉRIS, G. Biochemical Aspects of Overtraining in Endurance Sports: A Review. *Sports Med.*, 32(13): 867-878, 2002.

PIERUCCI, A. P. T. R., ANDRADE, L. R., BAPTISTA, E. B., VOLPATO, N. M. AND ROCHA-LEÃO, M H. M. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *J. Microencapsul.*, 23(6):654-662, 2006.

PIERUCCI, A. P. T. R., ANDRADE, L. R., FARINA, M., PEDROSA, C., ROCHA-LEÃO, M H. M. Comparison of α -tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. *J. Microencapsul.*, 24(3):201-213, 2007.

PIERUCCI, A. P. T. R., CARVALHO, L. M J. E ROCHA-LEÃO, M. H. M. Degradation kinetics of ascorbic acid in a high carbohydrate supplement for athletes under variable storage conditions. *Alimentaria Revista de Tecnologia e Higiene de los alimentos*, 356: 21-26, 2004.

PORTER, N.A.; CALDWELL, S.E.; MILLS, K.A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30(4): 277-290, 1995.

POTHAKAMURY, U. R & BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Sci. Technol.*, 6(12):397-406, 1995.

PRIOR, R.L.; CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.*, 27(11-12): 1173-1181, 1999.

PUHL H.; WAEG G.; ESTERBAUER H. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods Enzymol.*, 233:425-441, 1994.

RANGEL, A., DOMONT, G.D., PEDROSA, C., FERREIRA, S.T. Functional properties of purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*) and cowpea protein isolate. *J. Agri. Food Chem.*, 51(19):5792-5797, 2003.

REILLY, T.; EKBLUM, B. The use of recovery methods post-exercise. *J. Sports Sci.*, 23(6): 619– 627, 2005.

REILLY, T.; BANGSBO, J.; FRANKS, A. Anthropometric and physiological predispositions for elite soccer. *J. Sports Sci.*, 18(9):669-83, 2000.

REILLY, T. Energetics of high-intensity exercise (soccer) with particular reference to fatigue. *J. Sports Sci.*, 15(3): 257-263, 1997.

REILLY, T.; EKBLUM, B. The use of recovery methods post-exercise. *J. Sports Sci.*, 23(6):619-627, 2005.

- REINECCIUS, G. A. The spray drying of food flavors. *Drying Technol.*, 22(6):1289-1324, 2004.
- RUMSEY, S.C.; LEVINE, M. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans. *J. Nutr. Biochem.*, 9:116-130, 1998.
- SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development – a food industry perspective. *Trends in Food Sci. Technol.*, 17(10):547-556, 2006.
- SAVINI, I.; CATANI, M. V.; DURANTI, G.; CECI, R.; SABATINI, S.; AVIGLIANO, L. Vitamin C homeostasis in skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 38(7):898-907, 2005.
- SCHIPPINGER, G.; WONISCH, W.; ABUJA, P.M.; FANKHAUSER, F.; WINKLHFER-ROOB.; B.M., HALWACHS, G. Lipid peroxidation and antioxidant status in professional American football players during competition. *Eur. J. Clin. Invest.*, 32(9):686-692, 2002.
- SEN, C.K.; PACKER, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72(2)v:653S-659S, 2000.
- SHEU, T.Y.; ROSENBERG, M. J. Microencapsulation by spray drying ethyl caprylate in whey protein and carbohydrate wall systems. *J. Food Sci.*, 60(1):98-103, 1995.
- SICHERI, R.; EVERHART, J.E. Validity of a Brazilian frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. *Nutr. Res.*, 18(10):1649-1659, 1998.
- SILVA, A.S.R.; SANTHIAGO, V.; PAPOTI, M.; GOBATTO, C.A. Psychological, biochemical and physiological responses of Brazilian soccer players during a training program. *Sci. Sport.*, 23(2):66-72, 2007.
- SÖDERGREN, E.; NOUROOZ-ZADEH, J.; BERGLUND, L., VESSBY, B. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid Hydroperoxides. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 37(3):137-146, 1998.
- STØLEN, T.; CHAMARI, K.; CASTAGNA, C.; WISLØFF, U. Physiology of Soccer: An Update. *Sports Med.*, 35(6): 501-536, 2005.
- SVENSSON, M.; EKBLOM, B.; COTGREAVE, I.; NORMAN, B.; SJÖBERG, B.; EKBLOM, O.; SJÖDIN, B.; SJÖDIN A. Adaptative stress response of glutathione and acid uric metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiol. Scand.*, 176(1):43-56, 2002.
- TANAKA, H.; MONAHAN, K.D.; SEALS, D.R. Age-predicted maximal heart rate revisited. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 37(1):153-6, 2001.
- TAULER, P.; AGUILO, A.; GIMENO, I.; FUENTESPINA, E. TUR, J.A. PONS, A. Influence of vitamin C diet supplementation on endogenous antioxidant defences during exhaustive exercise. *Pflugers Arch.*, 446(6):658-664, 2003.
- 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.*, 22(1):68-15, 2001.

- THOMPSON, D.; BAILEY, D.M.; HILL, J.; HURST, T.; POWELL, J.R.; WILLIAMS, C. Prolonged vitamin C supplementation and recovery from eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 92(1-2): 133–138, 2004.
- THOMPSON, D.; WILLIAMS, C.; GARCIA-ROVES, P.; MCGREGOR; McARDLE, F.; JACKSON, J.M. Post-exercise vitamin C supplementation and recovery from demanding exercise. *Eur J Appl Physiol.*, 89(3-4): 393–400, 2003.
- TRINDADE, M.A.; GROSSO, C.R. The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice and in gum arabic. *J. Microencapsul.*, 17(2): 169-176, 2000.
- TRUMP, M.E., HEIGENHAUSER, G.J., PUTMAN, C.T., SPRIET, L.L. Importance of muscle phosphocreatine during intermittent maximal cycling. *J. Appl. Physiol.*, 80(5):1574-1580, 1996.
- URSO, M. L. & CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1):41-54, 2003.
- VOLLAARD, N.B.J.; SHEARMAN, J.P.; COOPER, C.E. Exercise-induced oxidative stress – myths, realities and physiological relevance. *Sports Med.*, 35(12): 1045-1062, 2005.
- WALTON, D.E.; MUMFORD, C.J. Spray dried products: characterization of particle morphology. *Trans. IchemE*, 77(1):21-38, 1999.
- WANG, Y.; MACKENZIE, B.; TSUKAGUCHI, H.; WEREMOWICZ, S.; MORTON, C.C.; HEDIGER, M. A. Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267(2): 488-494, 2000.
- WAYNER, D.D.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; BARELAY, L.R.; LOCKE, S.J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, 924(3):408-419, 1987.
- WELSH, R. S.; DAVIS, M. J.; BURKE, J. R.; WILLIAMS, H. G. Carbohydrate and physical/mental performance during intermittent exercise to fatigue. *Med. Sci. Sports and Exerc.*, 34(4):723-731, 2002.
- WHO STUDY GROUP ON DIET, NUTRITION AND PREVENTION OF CHRONIC DISEASES. Geneva, 1989. *Report*. Geneva, World Health Organization, 1990.
- WILSON, J.C. Regulation of vitamin C transport. *Annu. Rev. Nutr.*, 25: 105–125, 2005.
- WRAGG, C.B.; MAXWELL, N.S.; DOUST, J.H. Evaluation of the reliability and validity of a soccer-specific field test of repeated sprint ability. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 83(1): 77-83, 2000.
- WU, X.; ITOH, N.; TANIGUCHI, T.; HIRANI, J.; NAKANISHI, T.; TANAKA, K. Stimulation of differentiation in sodium-dependent vitamin C transporter 2 overexpressing MC3T3-E1 osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317(4): 1159-1164, 2004.

WU, X.; ITOH, N.; TANIGUCHI, T.; HIRANO, J.; NAKANISHI, T.; TANAKA, K. Stimulation of differentiation in sodium-dependent vitamin C transporter 2 overexpressing MC3T3-E1 osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317(4):1159-1164, 2004.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, 74(1):139-162, 1994.

ZOPPI, C.C.; ANTUNES-NETO, J.; CATANHO, F.O.; GOULART, L.F.; MOURA, N.; MACEDO, D.V. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Rev. Pau. Educ. Fis.*, 17(2):119-130, 2003.

ZOPPI, C.C.; HOHL, R.; SILVA, F.C.; LAZARIM, F.L.; NETO, J.M.F.A.; STANCANNELI, M.; MACEDO, D.V. Vitamin C and E Supplementation effects in professional soccer players under regular training. *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, 3(2): 37-44, 2006.

ANEXO

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O respeito devido à dignidade humana exige que toda a pesquisa se processe após o consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupo que por si e/ou por representantes legais manifestem sua anuência à participação na pesquisa.

O projeto intitulado “Micropartículas de ácido ascórbico: estudo da absorção e efeito antioxidante em jogadores de futebol de elite”, vem através deste convidá-lo a participar das etapas que o compõe. O nosso objetivo principal é avaliar o consumo de uma bebida que contém vitamina C, logo após a prática de exercício físico que simula a atividade em jogos.

Durante o projeto realizaremos avaliação antropométrica, funcional e de consumo alimentar. Nessas avaliações os indivíduos serão submetidos à pesagem e as medidas de estatura, e do percentual de gordura corporal e serão entrevistados fornecendo informação sobre sua alimentação.

Os sujeitos da pesquisa deverão executar exercício físico intermitente, durante 90 minutos e uma bebida logo após o término de exercício. A bebida poderá ou não conter vitamina C. Haverá também coleta de sangue por profissional qualificado (enfermeiro), adotando-se as práticas e os padrões para a coleta do material biológico de acordo com as normas de biossegurança. A coleta de sangue será realizada em 6 momentos: antes do exercício físico, logo após o término do exercício físico, 10, 20 40 e 60 minutos após o término do exercício, para tanto o enfermeiro irá colocar um cateter na mão (direita ou esquerda). Opcionalmente, as pessoas que preferirem poderão se sujeitar a 6 coletas de sangue diretamente na veia do braço como alternativa a colocação do cateter.

Essa pesquisa irá demonstrar o quanto o microencapsulamento da vitamina C favorece a sua absorção e utilização pelo organismo. Adicionalmente esta pesquisa também indicará se esta forma de administração da vitamina C possui efeito na diminuição dos efeitos do estresse físico causado pelo exercício. Essas descobertas contribuem para a evolução da ciência e para as ações que envolvem a orientação nutricional de praticantes de atividade física a fim de melhorar seu desempenho.

É garantida a liberdade de se recusar a participar ou a retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado. É garantido o sigilo que assegure a sua privacidade quanto aos dados pessoais confidenciais coletados na ocasião da análise.

A participação nesta pesquisa não é remunerada, e haverá ressarcimento na forma de indenização, em caso de eventuais danos recorrentes da pesquisa, como arcar com despesas médicas e medicamentosas.

Concordo em participar da pesquisa em questão,

Rio de Janeiro, ____ de _____ de ____

Assinatura

OBS: Em caso de dúvida ou necessidade de maiores esclarecimentos, faça contato com Srt^a. Camila Sousa, através dos telefones (021) 3351-6332, 9798-2770 ou através do email: camilasousacampos@yahoo.com.br, ou Dr^a. Anna Paola Pierucci, através dos telefones (021) 3353-0660, 2562-6697 ou 9992-0101, email: pierucci@nutricao.ufrj.br, endereço Av. Brigadeiro Trompowski, s/nº, CCS J2, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brasil.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)