



Artigo Original

Original Article

Suplementação antioxidante aguda e prevenção de dano lipídico e muscular de ciclistas em prova de longa duração: estudo experimental

Acute Antioxidant Supplementation and Prevention of Lipid and Muscle Damage in Long-Term Cycling Competition: An Experimental Study

Luiz Casemiro Krzyzaniak Grando¹; Augusto Poloniato Gelain¹; Marcela Cararo¹ Camila Gatto¹; Thais Pasqualli¹; Luciano de Oliveira Siqueira^{§1}

Recebido em: 04 de junho de 2021. Aceito em: 23 de julho de 2021.

Publicado online em: 14 de outubro de 2021.

DOI: 10.37310/ref.v90i3.2763

Resumo

Introdução: A transição epidemiológica e demográfica, o sedentarismo e o estímulo ao desenvolvimento de atividades físicas regulares sem a devida orientação de profissionais podem estar relacionados a distúrbios osteoarticulares e musculares.

Objetivo: Analisar o efeito da suplementação de vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) e ácido graxo Ômega 3 no dano oxidativo de 20 atletas masculinos em uma prova de ciclismo de longa duração.

Métodos: Realizou-se um estudo clínico randomizado de 20 atletas participantes de uma prova de ciclismo de 200 km.

Resultados: O grupo suplementado apresentou uma menor dano lipídico (redução de TBARS $p < 0,005$) por consumo de glutathione (redução de grupamentos Sh não-proteicos, $p < 0,05$) e menor dano muscular (redução de Creatina quinase mm $p < 0,05$).

Conclusão: A suplementação antioxidante mostrou-se efetiva para redução do estresse oxidativo, lipoperoxidação permitindo menor grau de dano/fadiga muscular determinada pela atividade CK-mm.

Palavras-chave: antioxidantes, suplementos nutricionais, ciclismo, treino aeróbico.

Pontos Chave

- O grupo suplementado apresentou menor dano lipídico do que o grupo controle.
- O grupo suplementado apresentou menor dano muscular do que o grupo controle.
- A suplementação antioxidante aguda mostrou-se efetiva para redução do estresse oxidativo, lipoperoxidação em prova de ciclismo de longa duração.

Abstract

Introduction: The epidemiological and demographic transition, sedentary lifestyle, and encouragement to develop regular physical activities without proper guidance from professionals may be related to osteoarticular and muscle disorders.

Objective: The aim of the present study was to analyze the effect of vitamin E (α -tocopherol) supplementation, vitamin C (ascorbic acid) and omega 3 fatty acid in the oxidative damage of 20 male athletes in a long-term cycling event.

Methods: A randomized clinical study of 20 athletes participating in a 200 km cycling event was carried out.

[§]Autor correspondente: Luciano de Oliveira Siqueira – e-mail: luciano@upf.br

Afiliações: Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

Results: The supplemented group showed less lipid damage (reduction of TBARS $p < 0.005$) by glutathione consumption (reduction of non-protein Sh groups, $p < 0.05$) and less muscle damage (reduction of Creatine kinase mm $p < 0.05$).

Conclusion: Antioxidant supplementation proved to be effective in reducing oxidative stress, lipoperoxidation allowing a lower degree of muscle damage/fatigue determined by CK-mm activity.

Keywords: antioxidants, dietary supplements, bicycling, endurance training.

Key Points

- The supplemented group had less lipid damage than the control group.
- The supplemented group had less muscle damage than the control group.
- Acute antioxidant supplementation proved to be effective in reducing oxidative stress, lipoperoxidation in long-term cycling competition.

Suplementação antioxidante aguda e prevenção de dano lipídico e muscular de ciclistas em prova de longa duração: um estudo experimental

Introdução

Durante o esforço físico de longa duração, é possível que haja depleção de nutrientes e de antioxidantes necessários para o metabolismo o que, devido ao estresse oxidativo, pode predispor a lesões e comprometer o desempenho atlético(1). Além disso, em longo prazo, o desequilíbrio entre os antioxidantes ingeridos e os radicais livres produzidos pelo metabolismo pode resultar em dano de membranas, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos(2,3,4). Consequentemente, pode haver aceleração do processo de envelhecimento, desgastes osteoarticulares, fadiga crônica, *overtraining* (excesso de treinamento) e lesões de fibras musculares(4,6). Do ponto de vista esportivo, acarreta redução da função muscular com a liberação de enzimas musculares, alterações histológicas, dor muscular e perda de rendimento atlético(16-17).

Após uma prova de longa duração, as reservas antioxidantes parecem ser mobilizadas na tentativa de reduzir o estresse oxidativo promovido pelas espécies reativas de oxigênios (EROs). Ou seja, o

treinamento físico induz a produção de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) que auxiliam no processo de neutralização de radicais livres(2,16).

O equilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes pode preservar a integridade de membrana, de receptores e na própria bomba de sódio e potássio, evitando assim um distúrbio eletrolítico mediante a suplementação com antioxidantes(17,18). Esta homeostase redox poderia diminuir o processo de fadiga, ainda evitaria lesões musculares causadas pelo estresse eletrolítico provocado pelo estresse oxidativo(11, 20).

Ademais, após um exercício físico intenso uma acelerada absorção de água e eletrólitos pode prevenir alterações na homeostase hidroeletrólítica gerando um melhor rendimento físico. A reposição de eletrólitos, nutrientes e líquidos mantém o volume de fluido extracelular e abastece energeticamente o músculo(16).

A resposta adaptativa ao exercício físico é determinada por uma combinação de fatores: duração, intensidade, o tipo do

exercício, a frequência em que é realizado, mas também a qualidade e a quantidade da nutrição pré e pós atividade física(7,8).

Considerando os efeitos antioxidantes promovidos pela vitamina E e ácido graxo Ômega 3 (em meio lipídico) e da vitamina C (no meio hídrico), o objetivo do presente estudo foi analisar se a suplementação antioxidante vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) e ácido graxo Ômega 3 pode prevenir o dano oxidativo e melhorar o desempenho metabólico/energético durante uma prova de ciclismo de longa duração.

Métodos

Desenho de estudo e amostra

Trata-se de um ensaio clínico randomizado de participantes de uma prova de ciclismo de resistência (AUDAX 200 km). Os atletas foram entrevistados, procedida anamnese e de coleta de dados antropométricos, seguida de coleta de amostras de sangue antes e após a realização de uma prova de ciclismo de 200 km.

E-fliers (panfletos digitalizados) do projeto foram enviados por mail e publicados nas redes sociais pelos organizadores convidando todos 121 inscritos em uma prova de ciclismo de resistência de 200 km (AUDAX) realizado em 2016. Foram selecionados praticantes regulares de ciclismo, que praticam o esporte há mais de dois anos e participaram de pelo menos duas provas (AUDAX) nos dois anos antecedentes à prova. Todos os indivíduos deveriam ser não-fumantes e não usuários de medicamentos e/ou bebidas alcoólicas de forma regular. Após a aplicação dos critérios de inclusão, foram incluídos no estudo vinte indivíduos do sexo masculino, média de idade de $38\pm 5,8$ (anos); peso $82,5\pm 8,4$ (kg); estatura $1,73\pm 0,068$ (cm), caucasianos, IMC $27,42$ $\text{kg}/\text{cm}^2\pm 2,1$.

Aspectos éticos

O trabalho foi desenvolvido segundo declarações e diretrizes sobre pesquisas que envolvem seres humanos: o Código de Nuremberg, Declaração de Helsinque e resolução nº 466 de 12 de dezembro de

2012. O protocolo do estudo foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo sob número de registro 1.049.633 e CAAE: 44655815.8.0000.5342.

Variáveis de estudo

As variáveis desfecho foram dano oxidativo e desempenho metabólico-energético. A variável de exposição foi a suplementação antioxidante (vitamina E, Vitamina C e ácido graxo Ômega 3). Idade; medidas antropométricas – peso (kg), altura (m); Índice de Massa Corporal (IMC) foram as covariáveis utilizadas para caracterizar a amostra. As condições climáticas constituíram-se em uma covariável de caracterização do ambiente no qual foi realizado o estudo, fator importante a ser considerado em esportes de longa duração(12).

Dano oxidativo

Dano oxidativo (variável desfecho) foi examinado por meio da análise dos parâmetros sanguíneos: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que avalia o grau de dano lipídico induzido por radicais livres; Grupamentos tiólicos proteicos e não proteicos, como medida indireta da glutathione, o principal antioxidante endógeno corporal; Determinação de nitratos como medida indireta da produção de óxido nítrico; Polifenóis, compostos fenólicos com potencial antioxidantes; e albumina modificada pela isquemia.

TBARS: para a avaliação da peroxidação lipídica, foi medida a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por meio de uma reação ácida aquecida(5). Trezentos microlitros de soro foram misturadas com 600uL de ácido tricloroacético (TCA) 15% e centrifugadas a 10.000rpm por 10 min. 500uL o sobrenadante foi adicionado a 500uL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. As amostras foram aquecidas em um banho-maria a 100°C durante 20 minutos. As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foram quantificadas pela absorbância em 535nm no espectrofotômetro utilizando

uma curva padrão de 1,1,3,3, tetrametoxipropano e os resultados expressos em nmol.

Grupos sulfídricos totais e não protéicos: para a quantificação dos grupos sulfídricos totais (-SH totais) do plasma, a amostra foi diluída na proporção de 1:500 em tampão fosfato de potássio 1M, pH 7,0. Em 2 ml da diluição foi adicionado 20 μ L de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 30 mM. A absorbância de uma amostra referência, sem a adição de DTNB, foi descontada do valor obtido, a fim de subtrair a absorbância causada por substâncias interferentes, tais como o grupo heme no plasma. O desenvolvimento de cor se dá pela reação dos grupos tióis com DTNB e, conseqüentemente, liberação de DTNB, a qual pode ser medida espectrofotometricamente em 412 nm ($\epsilon=13.600/M.cm$).

A produção de NO foi avaliada indiretamente pela leitura colorimétrica do nitrito nas diferentes amostras pelo reagente de Griess. Preparou-se uma solução de estoque de nitrito de sódio a 1M para elaboração de curva padrão e iniciado a curva com 5nmol. Para dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess foi, inicialmente, preparada solução Griess (*Griess reagent modified* - Sigma) e armazenada separadamente a 4°C em frascos de vidro e protegidos da luz. 400uL de soro foi adicionado a 400uL de TCA 50%, agitado em vortex e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. 500uL de sobrenadante foram adicionados a 500uL do reativo de Griess e incubado a 37°C por 30 min. Em seguida, procedeu-se a leitura espectrofotométrica da reação a 540nm utilizando padrão de nitrito de sódio como curva padrão.

A determinação de polifenóis foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. A solução de Folin 1N foi preparada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Merck). Em tubo de ensaio foram adicionados 100 μ L de plasma e 300 μ L de ácido tricloroacético, centrifugado a 10.000RPMs. 100 μ L do sobrenadante foi misturado a 100 μ L da solução de Folin, 200 μ L de solução saturada de carbonato de sódio e o volume foi completado com água

deionizada até 1900 μ L. A solução reagiu no escuro á temperatura ambiente por 30 minutos e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro semi-automatizado (Biosystems BTS 350) a 750nm utilizando uma curva padrão de ácido tânico 0,5mg/ml. Os resultados foram expressos em nmol de polifenóis/g de proteína.

As dosagens séricas de Albumina modificada pela isquemia (IMA), que é um indicador de dano oxidativo, foram realizadas pelo teste de ligação do cobalto com albumina. 200 μ L de soro foram incubados com 50 μ L de solução de cloreto de cobalto a 16,8nM e 1,0 ml de tampão fosfato salino pH 8,6. A mistura amostra/cobalto/tampão foi incubada por 10min para permitir a ligação do cobalto á albumina e procedida a leitura espectrofotométrica em 500nm. Após a leitura, adicionou-se 50 μ L de Ditiotreitól (DDT) 9,7mM. O DDT reage com o cobalto livre (não sequestrado pelo N-terminal da proteína) formando um produto corado. A mistura foi incubada a 37°C por mais 2 minutos e lida em esectrofotômetro em 500nm. Os resultados da IMA se deu pela subtração das duas leituras e expressos em unidades de absorbância (ABSU).

Desempenho metabólico/energético

O desempenho metabólico/energético foi examinado por meio da análise dos parâmetros sanguíneos:

Perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total e frações) foram determinadas espectrofotometricamente utilizando kits de análise bioquímica comercial (Labtest®), seguindo as normas do fabricante com leitura em espectrofotômetro semi-automatizado Biosystems BTS350.

Perfil proteico (albumina, proteínas totais, ureia) foram determinadas espectrofotometricamente utilizando kits de análise bioquímica comercial (Labtest®), seguindo as normas do fabricante com leitura em espectrofotômetro semi-automatizado Biosystems BTS350.

A glicose foi determinada espectrofotometricamente utilizando kits de análise bioquímica comercial (Labtest®) seguindo

as normas do fabricante com leitura em espectrofotômetro semiautomatizado Biosystems BTS350.

Cálcio, cloro, fósforo e magnésio: a determinação se deu utilizando kits de análise bioquímica comercial (Labtest®) seguindo as normas do fabricante com leitura em espectrofotômetro semiautomatizado Biosystems BTS350.

Sódio e potássio: amostras de soro foram previamente diluídas 1:200, seguida de análise bioquímica pelo princípio da fotometria de chama (Micronal B-462).

Além desses, foram examinados parâmetros indicativos de dano muscular relacionado ao desempenho metabólico/energético: creatina quinase (CK); lactato desidrogenase (LDH); Aspartato aminotransferase (TGO/AST). A creatinina foi determinada espectrofotometricamente utilizando kits de análise bioquímica comercial (Biotecnica®) seguindo as normas do fabricante com leitura em espectrofotômetro semiautomatizado Biosystems BTS350. E os demais parâmetros foram determinados utilizando-se kits de análise bioquímica comercial (Labtest®) seguindo as normas do fabricante com leitura em espectrofotômetro semiautomatizado Biosystems BTS350.

Intervenção

A intervenção experimental consistiu em administração de uma cápsula de vitamina C 1000mg (Sundown Naturals/Brasil), uma cápsula de vitamina E 400UI (Aché/Brasil) e uma cápsula de óleo Ômega 3 1000mg (Laboratório Catarinense/Brasil) 30 minutos antes da competição e outra no meio da prova, ao se completar 100 km.

Covariáveis

Para fins de aplicação dos critérios de inclusão e comprovação de indivíduos não fumantes ou consumidores regulares de álcool, aplicou-se questionários que avaliam o consumo de álcool mediante aplicação do Teste de Identificação de Distúrbio de Uso do Álcool (AUDIT) conforme descrito por Piccinelli et al.(15), a análise da dependência a nicotina aplicou-se o Questionário de Tolerância de

Fagerström, em pacientes adultos fumantes. Na entrevista, coletou-se dados pessoais e antropométricos, recordatório alimentar das últimas 12h, (peso e altura) e calculou-se o IMC pela fórmula: peso(kg)/altura(m²) e consumo de água no decorrer da prova.

Procedimento experimental

Os voluntários para participar do estudo, assinaram o TCLE e foram listados e alocados aleatoriamente em dois grupos por meio de sorteio (moeda): Grupo suplementado (GS) (10 indivíduos); e Grupo Controle (GC) (10 indivíduos), totalizando uma amostra de 20 indivíduos.

Ao GS com antioxidante, foi fornecido uma cápsula de vitamina C 1000mg (Sundown Naturals/Brasil), uma cápsula de vitamina E 400UI (Aché/Brasil) e uma cápsula de óleo Ômega 3 1000mg (laboratório Catarinense/Brasil) 30 minutos antes da competição. Uma segunda dose de suplementação foi feita no meio da prova, ao completar 100 km. Os suplementos são aprovados para comercialização pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e *Food Drug and Administration* (FDA). Enquanto isso, o GC não recebeu nenhum tipo de suplementação especial.

Após a aplicação dos questionários e dos suplementos, procedeu-se a coleta de 10 ml de sangue na fossa ante cubital antes e imediatamente após o término da prova. As amostras de sangue foram transferidas para tubos contendo anticoagulantes específicos para cada análise bioquímica proposta, mantido em gelo e posteriormente processado e analisado.

As condições climáticas foram aferidas antes do início da competição.

Análise estatística

Os resultados foram avaliados em medidas de tendência central (média) e medidas de dispersão (desvio e erro padrão). A seguir, de forma pareada os resultados finais (pós-prova) foram subtraídos dos resultados iniciais (repouso) a fim de determinar a variação de concentração dos analitos avaliados. Procedeu-se análise da estatística descritiva dos resultados e compilados numa planilha.

Para as diferenças de concentrações dos analitos coletados em repouso e pós-esforço dos atletas GC e GS, determinou-se a distribuição normal mediante testes de Shapiro-Wilk. Para amostras de distribuição não gaussiana (não normal), foram aplicados testes não paramétricos de Wilcoxon-Mann-Whitney. Para comparação de grupos, considerou-se $p < 0,05$ como estatisticamente significativa.

Resultados

Participaram do estudo 20 indivíduos caucasianos, do sexo masculino apresentan-

do as seguintes médias: idade $38 \pm 5,8$ (anos), peso $82,5 \pm 8,4$ (kg); estatura $1,73 \pm 0,06$ (cm); IMC $27,42 \text{ kg/cm}^2 \pm 2,1$. Todos eram praticantes regulares de ciclismo, que praticavam o esporte há mais de dois anos e participaram de pelo menos duas provas (AUDAX) de 200 km nos últimos dois anos. Nenhum indivíduo era fumante ou faziam uso de medicamentos e/ou bebidas alcoólicas de forma regular.

A competição teve início às 06:00h, quando a temperatura estava em torno de $3,4^\circ\text{C}$ (Tabela 1).

Tabela 1 – Condições climáticas no dia da realização da prova

Hora	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Umidade (%)	Pressão (hPa)	Vento (m/s)	Dir. ($^\circ$)	Chuva (mm)
06:00	3,4	58	943.9	2.1	18	0
12:00	8,6	50	945.6	3.1	5	0
18:00	17,8	33	943.5	4.1	18	0

A análise estatística dos resultados demonstrados na Tabela 2 mostra uma elevação estatisticamente significativa ($p=0,04$) na concentração de glicose após 200 km comparado com o repouso do GC. No GS houve uma diminuição da concentração de glicose após 200 km quando comparado com o repouso.

As concentrações de proteínas totais e albumina se mantiveram praticamente iguais no repouso e após 200 km em ambos os grupos, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,04$) entre os grupos controle e suplementado.

Não houve diferença significativa dos níveis de ureia ($p < 0,35$) comparado com o repouso. No entanto, análise comparativa entre os grupos mostrou uma elevação de 74% no GC e de 50,5% no GS.

A análise estatística dos demais parâmetros metabólicos: colesterol, LDL, HDL, triglicerídeos e creatinina não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$).

O GC teve acesso ao mesmo volume de água e eletrólitos que o GS. A análise do questionário pré e pós-prova constatou-se que o consumo médio de água de todos os participantes independentemente do grupo, foi de 2,78L ($\pm 1,17$) combinado ao uso de isotônico comercial no volume médio de

$0,85 \pm 0,39$ considerado adequado para as condições climáticas do dia (inverno).

A análise da atividade da lactato desidrogenase (LDH) pré e pós prova apontou uma elevação de da sua atividade em ambos os grupos: GC (53%) e GS (61%). Como a elevação foi proporcional em ambos os grupos, não houve diferença significativa entre os grupos GC e GS.

A análise dos resultados de aminotransferases TGO/AST mostra que houve uma elevação de 35% no GC e de 51% no GS, no entanto, esta elevação não mostrou diferença significativa entre os grupos.

O dano oxidativo lipídico determinado pela dosagem de TBARS mostra uma redução estatisticamente significativa no GS (41% de redução; $p=0,003$). O menor dano lipídico de membrana no GS pode ter contribuído para uma menor atividade da creatina quinase neste grupo (elevação de 788% no GC contra 145% no GS).

O GS apresentou uma redução estatisticamente significativa na concentração de grupamentos SH não proteicos ($p=0,045$). Este biomarcador é uma medida indireta da glutathione, um dos principais antioxidantes plasmáticos, o que justificaria o menor dano lipídico e da atividade da CK-mm.

Tabela 2 – Efeito da suplementação de vitaminas E e C e de ácido graxo Ômega 3 sobre dano oxidativo e desempenho metabólico/energético de atletas de ciclismo em percurso de longa duração (200 km)

Parâmetros sanguíneos	Repouso (A)		Após 200 km (B)		Variação percentual Geral de A para B		P
	GC (média±DP)	GS (média±DP)	GC (média±DP)	GS (média±DP)	GC (%)	GS (%)	
	<i>Desempenho metabólico/energético</i>						
Glicose (mg/dl)	87,0 ± 7,0	88,6 ± 8,7	98,0 ± 9,0	69,5 ± 6,5	+13%	-21%	0,004*
Colesterol (mg/dl)	205,0 ± 40,9	225,0 ± 39,4	200,0 ± 35,0	204,3 ± 29,1	-2,5%	-9,4%	0,050*
LDL (mg/dl)	96,0 ± 34,0	128,8 ± 30,9	99,3 ± 28,3	122,0 ± 31,5	+3,4%	-5,1%	0,508
HDL (mg/dl)	49,4 ± 16,9	63,6 ± 12,4	49,6 ± 16,1	64,0 ± 15,4	+0,4%	+0,6%	0,841
Triglicérides (mg/dl)	282,6 ± 184,9	162,0 ± 87,0	213,2 ± 156,5	128,5 ± 70,2	-24,4%	-20,5%	0,606
Proteínas totais (g/dl)	8,3 ± 0,4	7,7 ± 0,3	8,3 ± 0,3	7,7 ± 0,4	0	0	0,704
Albumina (g/dl)	4,2 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,0 ± 0,1	+2,4%	+2,4%	0,403
Ureia (mg/dl)	36,0 ± 5,6	49,2 ± 8,1	62,8 ± 16,4	74,0 ± 3,7	+74,0%	+50,5%	0,350
Creatinina (mg/dl)	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,0	9,0%	0	0,255
Sódio (mmol/L)	146,6 ± 2,4	144,2 ± 1,1	144,2 ± 2,5	144,0 ± 2,2	-1,2%	-0,1%	0,149
Potássio (mmol/L)	4,4 ± 0,4	4,4 ± 0,3	4,8 ± 0,5	4,5 ± 0,2	+10%	+2,5%	0,559
Cloro (mmol/L)	106,6 ± 7,9	100,0 ± 5,6	101,8 ± 2,8	100,8 ± 3,1	-4,5%	0%	0,279
Magnésio (mg/dl)	2,3 ± 0,4	3,8 ± 3,5	2,2 ± 0,3	4,4 ± 4,6	-3,0%	+17%	0,361
Cálcio (mg/dl)	10,2 ± 0,8	9,3 ± 1,5	10,3 ± 0,9	9,5 ± 1,7	+1,6%	+2,6%	0,457
Fósforo (mg/dl)	6,2 ± 1,0	6,4 ± 0,4	7,2 ± 0,9	6,7 ± 0,5	+17%	+4,7%	0,241

(continua)

Parâmetros sanguíneos	Repouso (A)		Após 200 km (B)		Variação percentual Geral de A para B		P
	GC (média±DP)	GS (média±DP)	GC (média±DP)	GS (média±DP)	GC (%)	GS (%)	
<i>Dano oxidativo</i>							
TBARS	0,16 ± 0,11	0,17 ± 0,09	0,16 ± 0,07	0,10 ± 0,07	0%	-41,1%	0,003*
Creatina quinase – CK (UI/L)	115,6 ± 3,3	143,4 ± 8,2	789,8 ± 29,1	350,5 ± 11,4	+788%	+145%	0,001*
Lactato desidrogenase – LDH (UI/L)	261,0 ± 7,5	183,2 ± 9,6	400,4 ± 10,7	295,3 ± 7,1	+53,0%	+61,0%	0,174
Aspartato aminotransferase (TGO/AST) (UI/L)	29,2 ± 0,9	25,6 ± 2,9	39,0 ± 3,3	38,8 ± 6,8	+35,0%	+51,0%	0,393
Grupamentos SH totais (ηM)	8,8 ± 0,1	8,2 ± 0,1	8,8 ± 0,2	8,1 ± 0,1	0%	-1,1%	0,787
Grupamentos SH não proteicos (ηM)	2,2 ± 0,04	2,3 ± 0,15	2,3 ± 0,34	1,9 ± 0,14	+5,0%	-17,0%	0,045*
Albumina modificada pela isquemia (abs)	0,02 ± 0,006	0,01 ± 0,001	0,06 ± 0,035	0,07 ± 0,001	+200,0%	+600,0%	0,653
Polifenóis (ηM)	0,95 ± 0,6	0,96 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1	+48,0%	+38,0%	0,499
Óxido Nítrico – NOS (μM)	0,7 ± 0,01	0,7 ± 0,04	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,04	0%	-14,0%	0,242

Suplementação antioxidante: uma cápsula de vitamina C 1000mg (Sundown Naturals/Brasil), uma cápsula de vitamina E 400UI (Aché/Brasil) e uma cápsula de ácido graxo Ômega 3 1000mg (laboratório Catarinense/Brasil) 30 minutos antes da competição.

GS: grupo suplementado; P: p-valor resultado do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Discussão

Sobre desempenho metabólico/energético, comparando-se a dosagem de concentração de glicose em repouso com a dosagem após o percurso de 200 km de ciclismo, no GC houve uma elevação significativa ($p < 0,04$), enquanto no GS, houve uma redução significativa. O exercício prolongado que atinge o ponto de fadiga pode esgotar quase que completamente os estoques de glicogênio hepático e muscular; ocasionando conseqüentemente uma queda da glicose sanguínea. Tal complicação poderia ser prevenida pelo uso da reposição de glicose durante um evento competitivo em concentrações adequadas e condizentes com a duração e intensidade do esforço(11-13). Os atletas pós-competição relataram que ingeriram pouca quantidade de carboidratos para não perderem tempo durante a prova, conseqüentemente gerando uma diminuição dos níveis de glicose. Desta forma, a diferença de concentração de glicose entre os grupos se deu mais em razão da estratégia do grupo de atletas que necessariamente a relação com a suplementação antioxidante.

Ademais, a análise dos resultados das concentrações de proteínas totais e albumina não mostraram diferença significativa após 200 km, em ambos os grupos (GC e GS). Estes achados demonstram que o protocolo de esforço analisado e o condicionamento físico dos participantes não apresentaram um quadro de proteólise ou hiperatividade neoglicogênica nas condições propostas, ao mesmo tempo em que a suplementação antioxidante não apresentou nenhuma influência sobre esse comportamento bioquímico.

A determinação da função renal pode ser analisada mediante quantificação de ureia e creatinina sérica(16). A alteração da concentração de creatinina pode estar relacionada ao exercício extenuante por motivos de degradação da creatina muscular, redução do fluxo sanguíneo direcionado aos rins, lesão renal discreta e até mesmo pela possível hipovolemia encontrada em atletas de alta

performance(14). Por outro lado, a dosagem de ureia plasmática além de avaliar a função renal serve também como medida indireta da proteólise e ser considerada um marcador de *overtraining* quando analisada em conjunto com a concentração de proteínas e albumina, visto que a ureia é a principal via de excreção do nitrogênio corporal(11, 16). A análise dos resultados da ureia mostrou uma elevação de 74% no GC (74%) e de 50,5% no GS (50,5%), no entanto, sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Sendo assim, considerando que a análise de proteínas totais e albumina não apresentaram diferença significativa, a elevação da concentração de ureia parece estar mais relacionada a função renal que a uma condição de proteólise ou atividade neoglicogênica. Este achado é reforçado pelo fato de que a concentração de creatinina (produto da degradação da fosfocreatina do músculo esquelético e biomarcador de função renal) apresentou uma elevação de 9% no GC e 0% no GS, indicando a associação de ureia e creatinina com as alterações hemodinâmicas e volêmicas dos rins durante a prova.

Quanto ao perfil lipídico, a análise estatística dos resultados mostrou que a suplementação não o afetou de maneira efetiva em curto espaço de tempo, uma vez que não houve diferença estatística significativa nas medidas de colesterol total e triglicerídeos tanto no GC como no GS. A diminuição dos níveis de triglicerídeos se dá pelo consumo dos triglicerídeos plasmáticos e musculares durante o primeiro estágio do exercício de *endurance*(11), que se manteve estável tanto no GC quanto GS. Contreras-Duarte et al.(4). mostraram que a administração de vitamina C e E produz efeitos modeladores do metabolismo lipídico (aumento do HDL e decréscimo dos níveis de apolipoproteína B) e cardioprotetor na doença arterial coronariana em ratos. Além disso, a partir de um estudo prospectivo de base populacional, Lee et al.(10), em estudo de coorte prospectivo, de amostra populacional (n=875), com seguimento de 22 anos, demonstraram correlação inversa

entre a ingesta dietética de vitamina antioxidantes (A,C e E) e a incidência de doenças cardiovasculares fatais e não fatais; naqueles que tiveram eventos cardíacos adversos durante o estudo, a incidência de dislipidemia era 18% maior no início. Por outro lado, ensaios clínicos randomizados não comprovaram redução de desfechos cardiovasculares primordiais com a suplementação de vitaminas antioxidantes(13). No presente estudo, não houve variação de parâmetros metabólicos, o que corrobora com efeito antioxidante cardioprotetor da suplementação de vitamina C, vitamina E e/ou Ômega 3.

A análise dos resultados do perfil eletrolítico dos atletas não mostrou diferença significativa entre os grupos, nem no repouso ou pós-prova, conforme demonstrado na Tabela 1. No entanto, a variação do percentual dos eletrólitos foi mais evidente no GC enquanto no GS, o perfil eletrolítico pareceu se manter mais estável pós-prova.

O exercício de longa duração pode gerar um quadro de desidratação, que assim como uma elevada produção de suor de forma recorrente ou aguda podem desencadear um desequilíbrio nos eletrólitos, causando um prejuízo na qualidade do treinamento ou do rendimento em competição(15). A temperatura (mínima 3,4°C e máxima de 17,8°C) e a umidade relativa (50%) no dia da prova não eram favoráveis à indução de distúrbio hidroeletrólítico por fator ambiental.

A análise do questionário pré e pós prova constatou-se que a média de consumo de água de todos os participantes, independentemente do grupo, foi de 2,78 L ($\pm 1,17$) combinado ao uso de isotônico comercial no volume médio de 0,85 L ($\pm 0,39$). Considerando as condições climáticas, o consumo de líquidos durante o exercício foi considerado adequado para prevenir uma excessiva desidratação e/ou desequilíbrio de eletrólitos.

Os resultados indicaram aumento de 7,7% na medida plasmática do potássio no GC versus 1,2% de aumento no GS. Essa diferença sugere manutenção da homeostase da bomba Na/K mediante

suplementação de vitamina C, vitamina E e Ômega 3. Acredita-se que o maior aporte de antioxidantes atenua o dano oxidativo de radicais livres ao receptor da bomba Na/K, preservando as trocas bidirecionais entre as células e o interstício. Consequentemente, mediante condições climáticas adversas, supõe-se que a suplementação possa prevenir o déficit de potássio intracelular e a ocorrência de câimbras.

O magnésio, durante o exercício, é redistribuído aos locais com maior taxa metabólica para síntese de energia e prevenção de estresse oxidativo. Logo, após o exercício, ocorre restauração do magnésio para as concentrações plasmáticas prévias ao exercício. É micronutriente importante para a contração muscular, tendo seu equilíbrio homeostático prejudicado pela peroxidação lipídica e ação de radicais livres(19). Considerando a carência de magnésio como fator determinante de lesões musculares mais graves e processo de regeneração mais difícil, ressalta-se a diferença de variação encontrada no estudo: redução de 5,2% no GC e aumento de 17,2% no GS.

A elevação da concentração de fósforo plasmática pode provocar a redução da concentração intracelular, comprometendo a oferta de fosfato para produção de ATP, predispondo a fadiga e o desgaste precoce(3,5-6). Os resultados indicam maior estabilidade do fósforo intracelular no grupo suplementando quando comparado com o controle, o que sugere uma menor predisposição a fadiga.

A glutathiona, medida indiretamente pela dosagem de grupamentos SH não proteicos, é um peptídeo promotor da homeostase tiólica, balanço redox e do combate a agentes eletrofilicos(7). Seus valores mostram uma redução estatisticamente significativa no GC combinada a uma elevação no GS. A vitamina C parece induzir o afluxo hepático de glutathiona durante o exercício, proporcionando aumento do poder antioxidante para aqueles que forem suplementados(20).

Os atletas em condições de sobrecarga de treinamento apresentavam maiores índices de lipoperoxidação, avaliada pelo nível de

substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Estudos, como Górnicka et al.(6), demonstram efeito protetor da suplementação de vitamina E contra o dano lipídico. Já a suplementação com vitamina C, não demonstrou alcance nas concentrações de TBARS. Conclui-se que, após exercício exaustivo, a suplementação com Vitamina E pode ser eficiente para reduzir o estresse oxidativo e a quantidade de lesões às células, comprovada no presente estudo com a redução de 41% da Lipoperoxidação contra 0% do GC.

A creatinina quinase (CK) é um marcador de dano muscular diretamente proporcional à intensidade e duração do exercício(9). Em indivíduos saudáveis, o pico da atividade sérica da CK ocorre em 6 horas após o exercício e retorna ao normal em 24 horas(9). A análise dos resultados mostra uma elevação pós-prova em ambos os grupos. No entanto, a análise estatística dos resultados aponta uma elevação estatisticamente superior no GC quando analisado com o GS. A menor elevação nos índices de CK do GS sugere que a suplementação de vitamina C, E e/ou Ômega 3, que são capazes de reagir com os radicais livres e assim impedir os seus efeitos deletérios a membranas dos miócitos, corroborados pela redução do dano lipídico medido pelo TBARS.

A análise dos resultados no perfil eletrolítico mostra certa estabilidade dos atletas suplementados, que em condições desfavoráveis de clima poderão se beneficiar da suplementação proposta. A realização de novas análises em condições de elevada temperatura e de tempo úmido poderão confirmar estes achados. Assim, a menor flutuação sérica dos eletrólitos evidenciada no GS mostra-se promissor e com necessidade de estudos mais aprofundados para resultados mais consistentes.

Somando-se a isso, a análise dos resultados mostra que a suplementação proposta diminuiu a Lipoperoxidação e as medidas de dano muscular (CK), podendo ser um adjuvante para melhorar o rendimento, evitar fadiga e aprimorar a recuperação pós-treino.

Pontos fortes e limitações do estudo

Dentre os pontos que ressaltam a relevância do presente estudo está que há escassez de estudos que tenham comparado a suplementação entre competidores de ciclismo de longa distância, sobretudo em alta quilometragem, como foi aqui investigada (200 km). Outro ponto forte do estudo foi o método aleatório de alocação dos participantes nos grupos GC e GS, o que assegura minimizar possíveis vieses.

Dentre as limitações estão: o tamanho amostral estrito em razão da rigidez dos critérios de inclusão propostos, a disponibilidade de participação dos atletas e a metodologia de coleta endovenosa. Estudos futuros com maior número amostral podem contribuir para corroborar os achados do presente estudo.

Conclusão

O objetivo do presente estudo foi analisar se a suplementação antioxidante vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) e ácido graxo ômega 3 pode prevenir o dano oxidativo e melhorar o desempenho metabólico/energético durante uma prova de ciclismo de longa duração de 200 km.

A suplementação antioxidante (GS) não mostrou diferença estatística significativa quando comparado com o GC, mas foi capaz de manter os níveis de eletrólitos com variações menos evidentes. Além disso, a suplementação pode proporcionar uma maior integridade muscular melhorando o rendimento e a recuperação pós-treino do atleta; ademais, eleva as defesas antioxidantes minimizando o dano muscular do ponto de vista bioquímico demonstrado pela redução da atividade de enzimas marcadoras de dano muscular. Do ponto de vista ergogênico, a suplementação proposta torna-se um importante adjuvante no treinamento podendo impedir lesões, dores, fadiga e perda de rendimento atlético.

Declaração de conflito de interesses

Não há nenhum conflito de interesses em relação ao presente estudo.

Declaração de financiamento

O presente trabalho teve apenas financiamento próprio.

Referências

1. Antunes HKM, Santos RF, Cassilhas R, Santos RVT, Bueno OFA, Mello MT de. Exercício físico e função cognitiva: uma revisão. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. [Online] 2006;12(2): 108–114. Available from: doi:10.1590/S1517-86922006000200011
2. Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. [Online] 2010;48(6). Available from: doi:10.1515/CCLM.2010.179 [Accessed: 23rd September 2021]
3. Brewer CP, Dawson B, Wallman KE, Guelfi KJ. Effect of sodium phosphate supplementation on repeated high-intensity cycling efforts. *Journal of Sports Sciences*. [Online] 2015;33(11): 1109–1116. Available from: doi:10.1080/02640414.2014.989536
4. Contreras-Duarte S, Chen P, Andía M, Uribe S, Irrázaval P, Kopp S, et al. Attenuation of atherogenic apo B-48-dependent hyperlipidemia and high density lipoprotein remodeling induced by vitamin C and E combination and their beneficial effect on lethal ischemic heart disease in mice. *Biological Research*. [Online] 2018;51(1): 34. Available from: doi:10.1186/s40659-018-0183-6
5. Esterbauer H, Cheeseman KH. [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*. [Online] Elsevier; 1990. p. 407–421. Available from: doi:10.1016/0076-6879(90)86134-H [Accessed: 23rd September 2021]
6. Górnicka M, Drywień M, Frackiewicz J, Dębski B, Wawrzyniak A. Alpha-Tocopherol May Protect Hepatocytes Against Oxidative Damage Induced by Endurance Training in Growing Organisms. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*. [Online] 2016;25(4): 673–679. Available from: doi:10.17219/acem/62922
7. Huber PC, Almeida WP, Fátima Â de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*. [Online] Sociedade Brasileira de Química; 2008;31: 1170–1179. Available from: doi:10.1590/S0100-40422008000500046
8. Jeukendrup AE. Periodized Nutrition for Athletes. *Sports Medicine*. [Online] 2017;47(S1): 51–63. Available from: doi:10.1007/s40279-017-0694-2
9. Laufs U, Scharnagl H, Halle M, Windler E, Endres M, März W. Treatment Options for Statin-Associated Muscle Symptoms. *Deutsches Aerzteblatt Online*. [Online] 2015; Available from: doi:10.3238/arztebl.2015.0748 [Accessed: 23rd September 2021]
10. Lee C-H, Chan R, Wan H, Woo Y-C, Cheung C, Fong C, et al. Dietary Intake of Anti-Oxidant Vitamins A, C, and E Is Inversely Associated with Adverse Cardiovascular Outcomes in Chinese—A 22-Years Population-Based Prospective Study. *Nutrients*. [Online] 2018;10(11): 1664. Available from: doi:10.3390/nu10111664
11. Lopes RF. *Comportamento de alguns marcadores fisiológicos e bioquímicos de uma prova de triathlon olímpico*. [Online] 2006. Available from: https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/6296 [Accessed: 23rd September 2021]
12. McDermott BP, Anderson SA, Armstrong LE, Casa DJ, Chevront SN, Cooper L, et al. National Athletic Trainers' Association Position Statement: Fluid Replacement for the Physically Active. *Journal of Athletic Training*. [Online] 2017;52(9): 877–895. Available from: doi:10.4085/1062-6050-52.9.02
13. Myung S-K, Ju W, Cho B, Oh S-W, Park SM, Koo B-K, et al. Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. [Online] 2013;346(jan18 1): f10–f10. Available from: doi:10.1136/bmj.f10
14. Passaglia DG, Emed LGM, Barberato SH, Guerios ST, Moser AI, Silva MMF, et al. Efeitos agudos do exercício físico prolongado: avaliação após ultramaratona de 24 horas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. [Online] Sociedade Brasileira de Cardiologia - SBC; 2013;100: 21–28. Available from: doi:10.1590/S0066-782X2012005000118

15. Piccinelli M, Tessari E, Bortolomasi M, Piasere O, Semenzin M, Garzotto N, et al. Efficacy of the alcohol use disorders identification test as a screening tool for hazardous alcohol intake and related disorders in primary care: a validity study. *BMJ*. [Online] 1997;314(7078): 420–420. Available from: doi:10.1136/bmj.314.7078.420
16. Siqueira L de O, Bortoluzzi J, Zanin F, Savi S, Deliberal AP, Canal PC, et al. Análise da suplementação de carboidratos e solução isotônica sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos de jogadores profissionais de futebol em condições reais de treinamento. *Revista Brasileira de Ciências do Esporte*. [Online] 2012;34(4): 999–1016. Available from: doi:10.1590/S0101-32892012000400014
17. Souza J de, Gottfried C. Muscle injury: Review of experimental models. *Journal of Electromyography and Kinesiology*. [Online] 2013;23(6): 1253–1260. Available from: doi:10.1016/j.jelekin.2013.07.009
18. Ye Y, Li J, Yuan Z. Effect of Antioxidant Vitamin Supplementation on Cardiovascular Outcomes: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Hernandez AV (ed.) *PLoS ONE*. [Online] 2013;8(2): e56803. Available from: doi:10.1371/journal.pone.0056803
19. Zhang Y, Xun P, Wang R, Mao L, He K. Can Magnesium Enhance Exercise Performance? *Nutrients*. [Online] 2017;9(9): 946. Available from: doi:10.3390/nu9090946
20. Zoppi CC, Antunes-Neto J, Catanho FO, Goulart LF, Moura NM e, Macedo DV de. Blood oxidative stress, antioxidant enzymes and muscle damage biomarkers changes during a competitive season in soccer players. *Revista Paulista de Educação Física*. [Online] 2003;17(2): 119–130. Available from: doi:10.11606/issn.2594-5904.rpef.2003.137562