



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



Efeitos da suplementação aguda com nitrato de sódio no balanço redox, na pressão arterial, no VO_2 pico e no desempenho de homens fisicamente ativos durante exercício máximo.

Aluno: Maria Carolina Siqueira

Orientador: Prof^a. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

UBERLÂNDIA – MG

2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



Efeitos da suplementação aguda com nitrato de sódio no balanço redox, na pressão arterial, no VO_2 pico e no desempenho de homens fisicamente ativos durante exercício máximo.

Aluno: Maria Carolina Siqueira

Orientador: Prof^a. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área:
Bioquímica)

UBERLÂNDIA - MG

2013



Efeitos da suplementação aguda com nitrato de sódio no balanço redox, na pressão arterial, no VO_2 pico e no desempenho de homens fisicamente ativos durante exercício máximo.

ALUNA: Maria Carolina Siqueira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho (Orientadora)

Examinadores: Prof^a. Dra. Nádia Carla Cheik (UFU)

Prof. Dr. Alexis Fonseca Welker (UNB)

Data da Defesa: 29/07/2013

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas

Prof^a. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação pessoal e profissional e, em especial, àqueles que tornaram possível a concretização desse trabalho.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais e irmão pelo apoio incondicional em todas as situações. À Prof^a. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho pela oportunidade, confiança, aprendizado e conhecimento compartilhado. Aos colegas de laboratório Renata, Miguel e Olga pelos ensinamentos e por disponibilizarem seu tempo para me ajudar sempre que foi preciso; Leandro e Zulmária pela amizade, presteza e solicitude e especialmente ao Erickson pela parceria e cumplicidade.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).



Sumário

Apresentação	1
Capítulo 1.....	3
Óxido nítrico: função	4
Produção enzimática de óxido nítrico	6
Produção não-enzimática de óxido nítrico	7
Óxido nítrico e exercício.....	9
Óxido nítrico e estresse oxidativo	13
Referências.....	16
Capítulo 2.....	21
Resumo	22
Introdução.....	23
Métodos	25
Participantes.....	25
Visitas e orientações.....	25
Suplementação	26
Protocolo de testes e mensuração do VO ₂ pico	26
Coleta sanguínea e análises laboratoriais	27
Análise Estatística.....	29
Resultados.....	29
Concentrações plasmáticas de NO ²⁻	29
Catalase.....	30
Peroxidação Lipídica.....	30
VO ₂ pico, potência máxima, distância e PA.....	30
Discussão	30
Conclusões.....	34
Referências.....	35
Legendas	40

Tabela e Figuras.....	41
Anexos	45



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



Lista de Abreviaturas

AMPK	Proteína quinase dependente de AMP
ATP	Trifosfato de adenosina
BH4	Tetrahidrobiopterina
Ca ²⁺	Cálcio
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina Mononucleotídeo
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
Hb	Hemoglobina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO [•]	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
O ₂	Oxigênio
O ²⁻	Ânion Superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



PKG Proteína quinase dependente de cGMP

VO₂ Capacidade de cada indivíduo em captar, transportar e utilizar O₂ para a produção de energia

VO₂ máximo Maior valor de VO₂ atingido durante um teste de esforço máximo, apresentando platô ao final, fase na qual mesmo que haja aumento na intensidade do exercício o valor do VO₂ não se altera

VO₂ pico Maior valor de VO₂ atingido durante um teste de esforço máximo, sem o aparecimento de um platô ao final



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Lista de Tabelas

Tabela 1.

Dados antropométricos dos voluntários.....44

Tabela 2.

Pressão arterial sistólica e diastólica de indivíduos do grupo placebo (NaCl) ou Nitrato (NaNO_3) no pré e pós-teste, VO_2 pico, potência máxima, distância percorrida pós-teste e FC pré e pós teste.....44



Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Ciclo nitrato/nitrito/óxido nítrico - Esquema mostrando a conversão do nitrato ingerido por meio da dieta em óxido nítrico.....09

Capítulo 2

Figura 1. Concentrações plasmáticas de nitrito do grupo Placebo (NaCl) e Nitrato (NaNO_3), após três horas de suplementação (pré-teste) e depois do teste de esforço máximo em cicloergômetro (pós-teste).....45

Figura 2. Avaliação da atividade da catalase em hemolisado de indivíduos do grupo Placebo (NaCl) ou Nitrato (NaNO_3), após três horas de suplementação (pré-teste) e depois do teste de esforço máximo em cicloergômetro (pós-teste) 45

Figura 3. Avaliação da atividade antioxidante total do plasma de indivíduos do grupo Placebo (NaCl) ou Nitrato (NaNO_3), após três horas de suplementação (pré-teste) e depois do teste de esforço máximo em cicloergômetro (pós-teste). 46

Figura 4. Concentração de TBARS no plasma de indivíduos do grupo Placebo (NaCl) ou Nitrato (NaNO_3), após três horas de suplementação (pré-teste) e depois do teste de esforço máximo em cicloergômetro (pós-teste).....46

Figura 5. Razão potência máxima/ $\text{VO}_{2\text{pico}}$ de indivíduos do grupo Placebo (NaCl) ou Nitrato (NaNO_3), depois do teste de esforço máximo em cicloergômetro (pós-teste).....47

Apresentação

Já é bem estabelecida na literatura a importância do óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$) em diversos processos intra e extracelulares (Moncada & Higgs, 1993; Burnett, 1995) estando essa molécula envolvida na regulação da pressão arterial, na formação da memória, na regulação de funções dos tratos respiratório, genitourinário e gastrointestinal, na imunidade não específica e na inflamação (Moncada & Higgs, 1993). Além disso, o $\text{NO}^{\bullet}$ vem sendo associado ao desempenho físico, tendo sido demonstrado que elevados níveis basais de nitrito – precursor de óxido nítrico – estão associados a melhoria da capacidade física de atletas altamente treinados (Totzeck et. al., 2012).

O $\text{NO}^{\bullet}$ é um radical livre, cuja síntese resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina (Dusse et. al., 2003). Essa reação pode ser catalisada por três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a a NO-sintase neuronal (nNOS), a NO-sintase endotelial e a a NO-sintase indutível (iNOS) (Tengan et. al, 2012). O nitrato (NO_3^-) circulante derivado tanto da produção endógena, a partir do óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$), quanto obtido de fontes dietéticas (vegetais de folhas verdes e beterraba, por exemplo) pode ser convertido *in vivo* a óxidos de nitrogênio bioativos como nitrito e este a óxido nítrico (Bescós et. al., 2011; Umbrello et. al., 2013). Tal conversão, de nitrito à óxido nítrico, é principalmente favorecida em situações de hipóxia. (Bailey et. al., 2009; Bescós et. al, 2011; Bescós et. al., 2012).

Além dos efeitos citados acima, a citotoxicidade também é geralmente atribuída ao $\text{NO}^{\bullet}$ (Beckman & Koppenol, 1996). A toxicidade dessa molécula está associada à sua reação com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) e a consequente produção de peroxinitrito (ONOO^-), o qual é potente e tóxico oxidante (Beckman & Koppenol, 1996). O aumento dos agentes oxidantes pode causar “estresse oxidativo”, que é definido como um desbalanço entre as espécies oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, gerando perturbações na sinalização e no controle redox ,levando ao dano molecular (Powers et. al., 2011).

Estudos recentes demonstram que a ingestão de nitrato inorgânico é capaz de reduzir o VO_2 pico para a realização de exercícios máximos e submáximos, podendo aumentar o tempo até a exaustão nesse tipo de atividade

(Larsen et. al., 2007; Bailey et. a., 2009; Larsen et. al., 2010; Bescós et. al., 2011; Larsen et. al., 2011). Entretanto, também há relatos na literatura de que a suplementação com nitrato não tem efeitos sobre o desempenho de pessoas treinadas na realização de testes físicos (Bescós et. al., 2012; Wilkerson et. al., 2012). Dessa forma, não há um consenso na literatura quanto ao real efeito da suplementação de nitrato no exercício com o objetivo de melhora do desempenho.

Assim, a partir do que foi apresentando acima, pode-se inferir que estudos utilizando a suplementação com nitrato inorgânico, no intuito de elucidar os efeitos da mesma sobre o desempenho durante o exercício físico e desbalanço redox se fazem relevantes.

O presente estudo foi delineado no intuito de examinar o efeito da suplementação com nitrato de sódio no balanço redox, no consumo de oxigênio, na pressão arterial e no desempenho de homens jovens submetidos a um teste agudo máximo em cicloergômetro.

A apresentação da dissertação foi dividida em capítulos, conforme as normas do Instituto de Genética e Bioquímica e, a formatação seguiu as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas, a ABNT. No capítulo 1, é apresentada uma revisão bibliográfica do assunto, incluindo tópicos referentes à produção endógena de óxido nítrico, fontes alternativas do mesmo, efeitos da suplementação para o exercício físico e também no balanço redox. No capítulo 2, mostramos a metodologia utilizada, os resultados obtidos e a discussão sob a forma de um artigo, que será submetido a uma revista científica indexada.

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

Óxido nítrico: função

O óxido nítrico é uma molécula gasosa, de sinalização, que contribui para a regulação de uma variedade de processos dos sistemas cardiovascular, nervoso e imune (Totzeck et al., 2012). Segundo Moncada & Higgs (1993), a síntese do óxido nítrico pelo endotélio vascular, é responsável pelo tônus vasodilatador, o qual é essencial para a regulação da pressão arterial. De acordo com esses autores, no sistema nervoso central, o NO^* atua como um neurotransmissor que regula várias funções incluindo a formação da memória. Já na periferia atua na mediação de algumas formas de vasodilatação neurogênica e também na regulação de funções gastrointestinais, respiratórias e do trato genitourinário, através de nervos noradrenérgicos e não colinérgicos, dependentes de NO^* . O óxido nítrico também contribui para a inibição da agregação e da adesão plaquetária, está envolvido na interação dos leucócitos com as paredes dos vasos, por inibir a ativação leucocitária e participa do controle homeostático vascular (Moncada & Higgs, 1993).

Além disso, essa molécula exerce um papel crucial na morte celular, por possuir a habilidade tanto de induzir quanto de proteger contra a apoptose, dependendo de seus níveis e da situação na qual a célula se encontra (Carnovale & Ronco, 2012). O NO^* pode ainda combinar-se com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) para formar o peroxinitrito (ONOO^-), o qual compartilha algumas propriedades com o NO^* , como a sua capacidade de difundir-se livremente por meio de vias intra e intercelulares, podendo atuar também como um potente oxidante (Carnovale & Ronco, 2012).

Por ser uma molécula pequena e lipofílica, o NO^* difunde-se rapidamente através das membranas das células endoteliais para a camada de músculo liso vascular subjacente causando relaxamento. Seu principal mecanismo de ação é mediado pela nitrosilação do ferro hêmico na guanilato ciclase, levando a um aumento na síntese de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (Umbrello et. al. 2013). Segundo Young & Leighton (1998), a ativação da proteína quinase dependente de cGMP (PKG) é um dos mecanismos de ação do cGMP. Este, por sua vez, ativa proteínas quinases que modulam as atividades quinase e fosfatase da miosina de cadeia leve, resultando em menor fosforilação da miosina e, eventualmente vasorelaxamento (Umbrello et. al, 2013).

De acordo com Umbrello et. al. (2013), o NO[•] pode também causar vasodilatação devido á abertura de canais de potássio, sensíveis á cálcio (Ca²⁺) e ATP, mediada por cGMP. Com a abertura desses canais iônicos, o efluxo de potássio hiperpolariza a membrana plasmática reduzindo o tônus vascular. O NO[•] também ativa esses canais de potássio sensíveis á Ca²⁺ e ATP de forma independente de cGMP, por S-nitrosilação (Umbrello et. al., 2013). Além disso, o NO[•] pode contribuir para a regulação dos níveis intracelulares de Ca²⁺, tanto por inibição do influxo de Ca²⁺ por canais de cálcio tipo L, dependente de cGMP, ou devido ao aumento da remoção de Ca²⁺ do citoplasma. Esses efeitos podem ser importantes, uma vez que as isoformas constitutivas da óxido nítrico sintase (enzima responsável pela produção de NO[•]) são reguladas por cálcio e calmodulina. Um aumento no conteúdo intracelular de Ca²⁺ ativa a calmodulina, levando á síntese de NO[•] (Umbrello et. al., 2013).

O NO[•] também está relacionado à inibição da respiração mitocondrial, por inibir competitivamente e reversivelmente a citocromo c oxidase (último complexo protéico da cadeia de transporte de elétrons, o qual recebe um elétron de cada uma das moléculas de citocromo c e transfere-os para uma molécula de O₂, convertendo assim o O₂ molecular em duas moléculas de H₂O). Enquanto a inibição da respiração, particularmente quando o suprimento de O₂ está elevado, pode ser prejudicial, esta pode servir também como um mecanismo para conservar o O₂ presente e prolongar os gradientes de O₂ na célula em estados de hipóxia (Kamga et. al., 2012). Além disso, o NO[•] pode otimizar indiretamente a fosforilação oxidativa, pela inibição parcial da citocromo c oxidase. Essa inibição reduz o vazamento de prótons, mantendo a produção de ATP em um grau mais elevado do que o consumo de O₂, aumentando assim, a taxa de ATP produzido por O₂ consumido (razão P/O) (Larsen et. al., 2012).

A ligação do NO[•] à citocromo c oxidase também pode provocar eventos de sinalização intracelular, incluindo o desvio de O₂ para substratos não respiratórios e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) com potenciais efeitos deletérios. Esses eventos estimulados pelo NO[•] agem como gatilhos pelos quais a mitocôndria modula as cascatas de transdução de sinais na indução de mecanismos de defesa celular e respostas adaptativas (Larsen, et. al., 2012).

Produção enzimática de óxido nítrico

O NO^{*} é produzido enzimaticamente através de três isoformas da NO sintase, a NO sintase neuronal (nNOS ou tipo I), a NO sintase indutível (iNOS ou tipo II), e a NO sintase endotelial (eNOS ou tipo III) (Tengan et. al., 2012). De acordo com Carnovale & Ronco (2012), a nNOS e a iNOS são principalmente citosólicas, sendo a iNOS encontrada também nos peroxissomos dos hepatócitos; por outro lado a eNOS tem sido identificada na membrana plasmática, no retículo endoplasmático rugoso e também no núcleo de hepatócitos de ratos, sendo reconhecida como uma proteína de membrana. Essas enzimas catalisam a formação de NO^{*} a partir de L-arginina e oxigênio (O₂), com L-citrulina sendo gerada como produto. São necessários quatro cofatores para a síntese de NO^{*}, sendo estes s tetrahydrobiopterina (BH₄), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a flavina mononucleotídeo (FMN) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Boveris et. al., 2000). É válido ressaltar que a atividade das três isoformas de NOS é variavelmente dependente da quantidade de O₂ (Ho et. al., 2012).

Tanto a eNOS quanto a a nNOS são constitutivamente expressas, exibindo um perfil de ativação Ca²⁺/calmodulina dependente, contribuindo para o rápido aumento de NO^{*} em resposta á interações de hormônios e seus receptores. Em contraste, a expressão da iNOS está intimamente relacionada a processos pró-inflamatórios e infecciosos, não tendo seus efeitos regulados por Ca²⁺ e apresentando liberação de NO^{*} por longos períodos de tempo e em altas concentrações (Stefano & Kream, 2011; Carnovale & Ronco, 2012).

Segundo Umbrello et. al. (2013), em indivíduos saudáveis, a eNOS é responsável pela maioria das ações hemodinâmicas, contribuindo para a regulação do fluxo sanguíneo nos diferentes leitos vasculares de acordo com a variação das necessidades metabólicas. O NO^{*} produzido a partir da iNOS é tradicionalmente considerado o principal responsável pela hiporeatividade e hipotensão vasculares observadas em estados inflamatórios. Em relação a nNOS, dados recentes sugerem um importante papel do NO^{*} produzido por essa isoforma na regulação do tônus microvascular, enquanto o NO^{*} gerado pela

eNOS regula as alterações do tônus em resposta a agonistas ou ao estresse por cisalhamento. Isso sugere uma potencial regulação independente do fluxo sanguíneo basal e estimulado (Umbrello et. al., 2013).

Produção não-enzimática de óxido nítrico

Em condições de hipóxia fisiológica, a produção de NO^* pelas NOS pode estar prejudicada devido a falta de O_2 . Nessas situações, o nitrito (NO_2^-), considerado anteriormente somente um metabólito do metabolismo do NO^* , é considerado uma fonte alternativa de NO^* bioativo. Elevações substanciais na quantidade de nitrito plasmática podem ocorrer por meio da ingestão de nitrato (NO_3^-) pela dieta.

Segundo Bailey et. al. (2009), o ânion NO_3^- é relativamente inerte e seus efeitos biológicos são provavelmente conferidos à sua conversão à NO_2^- . O nitrato advindo da alimentação é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal superior e sua bioviabilidade é de quase 100%. A maior parte do nitrato inorgânico absorvido é excretada na urina, sendo apenas 25% do nitrato plasmático ativamente captado pelas glândulas salivares e liberado na saliva. Na boca, bactérias anaeróbias facultativas, presentes na superfície da língua, reduzem nitrato à nitrito, por utilizar o nitrato como um acceptor final de elétrons alternativo, durante o processo de respiração para produzir ATP. O nitrito salivar pode ser convertido à NO^* no estômago, devido ao ambiente ácido, onde o nitrito é protonado para formar ácido nitroso, o qual é então decomposto, formando NO^* e outros óxidos de nitrogênio (Castiglione et. al., 2012). Uma parte do nitrito é absorvida de maneira intacta, aumentando a circulação plasmática desse ânion (Bescós et. al., 2011). A maior parte do nitrito salivar “escapa” da conversão a NO^* no estômago e se difunde na circulação sistêmica; o NO_2^- é transportado da circulação arterial para os vasos de resistência, onde a baixa pressão de O_2 favorece sua redução a NO^* , causando vasodilatação e reduzindo a pressão arterial (Castiglione et. al. 2012).

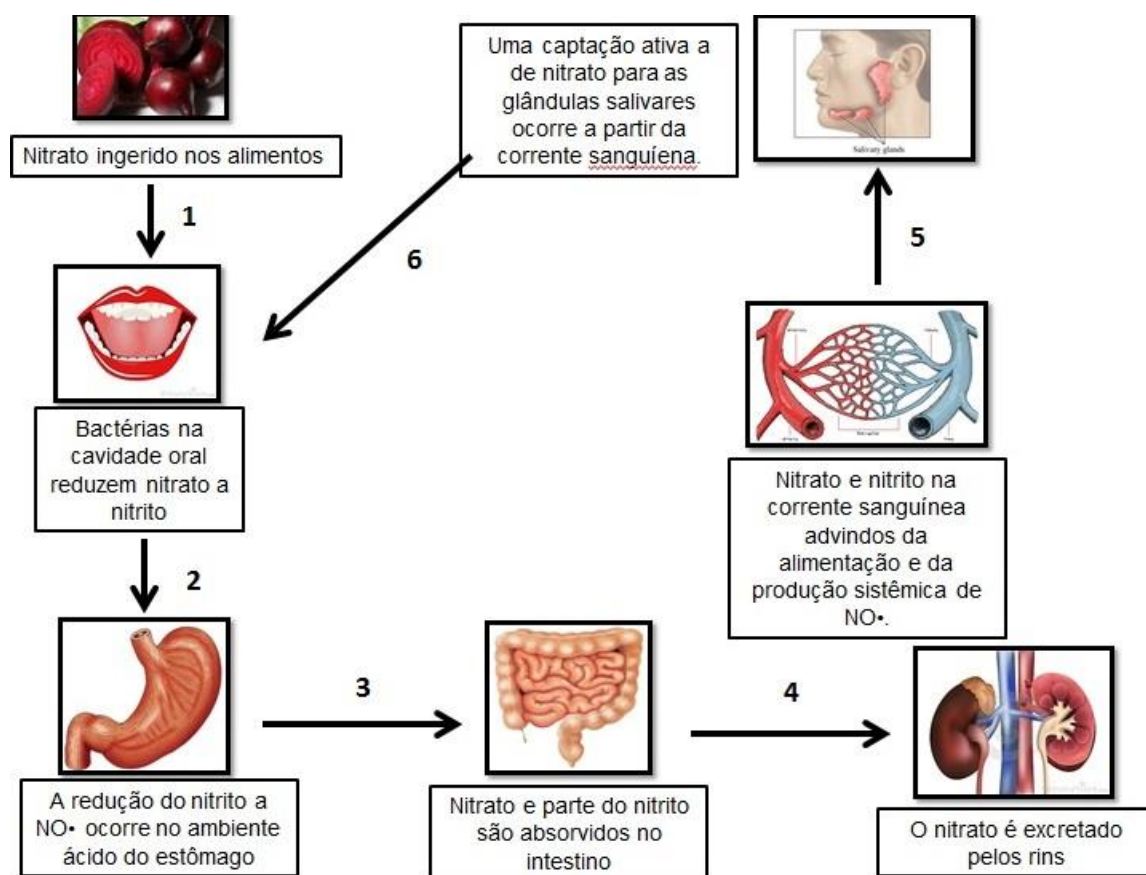


Figura 1- Ciclo nitrato/nitrito/ NO $\cdot$ – (1) o nitrato absorvido da alimentação e, na cavidade oral é reduzido a nitrito por ação de bactérias. (2) no ambiente ácido gástrico ocorre a redução não enzimática do nitrito a NO $\cdot$ e (3) parte do nitrato e o nitrito que não foi convertido a NO $\cdot$ são absorvidos pelo intestino e, então, (4) o nitrato é excretado pelos rins. (5) o nitrato e o nitrito presentes na corrente sanguínea originados a partir da produção sistêmica de NO $\cdot$. (6) Captação ativa do nitrato a partir da corrente sanguínea para as glândulas salivares e reinício do ciclo. **Adaptada de:** Lundberg et al. NatureRevDrugsDisc. 7:156 (2008)

O NO $_2^-$ pode ser reduzido a NO $\cdot$ bioativo por meio da sua reação com uma série de proteínas desoxigenadas contendo grupamentos heme, inclusive na mitocôndria (Kamga et. al., 2012, Larsen et.al., 2012). De acordo com Patel et. al. (2011), de maneira geral, o nitrito é reduzido a NO $\cdot$ por regulação da saturação fracionária da hemoglobina (Hb), sofrendo, portanto, uma regulação alostérica por mecanismos que controlam a afinidade da Hb pelo O $_2$. Isso permite estabelecer uma relação direta entre a demanda de O $_2$ e as alterações no fluxo sanguíneo. Segundo esses autores, muitas outras proteínas também têm demonstrado capacidade de reduzir o nitrito a NO $\cdot$ em baixas pressões de O $_2$ no tecido vascular, mas não há ainda uma relação clara entre essas

atividades e a saturação fracionária da Hb. Nas células vermelhas as enzimas capazes de realizar esse processo incluem a anidrase carbônica e a xantina oxidoreductase. A hipótese é de que em baixas pressões de O_2 e em pH reduzido, essas e outras vias de redução de nitrito não dependentes de Hb tornam-se mais proeminentes, hipótese esta, que ainda precisa ser testada. Outro mecanismo de estímulo que tem sido proposto para a sinalização do NO^* , dependente da saturação fracionária da Hb envolve a S-nitrosohemoglobina (hemoglobina ligada ao óxido nítrico) ou a liberação de ATP (a partir da enzima citocromo C oxidase). Esses compostos também têm sido sugeridos como possíveis responsáveis pela resposta vasodilatadora atribuída ao nitrito (Patel, et. al., 2011).

As células vermelhas, devido a reações que envolvem a Hb presente no eritrócito tanto consomem quanto produzem NO^* (via reação com o nitrito). O consumo de NO^* é menos eficiente em baixas pressões de O_2 devido ao fato de que o NO^* reage com a oxi-Hb mais lentamente do que com a desoxi-Hb. A produção de NO^* é substancialmente elevada em baixas pressões de O_2 , devido à reação do nitrito com a desoxi-Hb. O efeito final é que relativamente mais NO^* é produzido do que consumido nas células vermelhas, uma vez que estas, desoxigenadas, permitem gradientes de O_2 relevantes (Patel et. al., 2011).

Óxido nítrico e exercício

O VO_2 representa a capacidade de cada indivíduo em captar, transportar e utilizar O_2 para produção de energia, sendo sua mensuração a principal ferramenta utilizada para avaliar a aptidão cardiorrespiratória. Os valores máximos alcançados em testes físicos são utilizados como parâmetros para classificar a população entre sedentários, fisicamente ativos e atletas, onde pessoas melhor condicionadas apresentam maiores valores de VO_2 ao final do teste. O maior valor de VO_2 atingido durante um teste de esforço máximo pode ser denominado VO_2 pico ou VO_2 máximo. A diferença entre eles é somente o aparecimento de um platô, fase na qual mesmo que haja aumento na intensidade do exercício o valor do VO_2 não se altera. Nesse caso, o indivíduo atingiu o VO_2 máximo e os aumentos subsequentes na intensidade do exercício são financiados pelo metabolismo anaeróbio. Geralmente, atletas atingem VO_2

máximo, enquanto o restante da população, quando submetida a um teste para avaliação cardiorrespiratória apresenta o VO_2 pico, que aumenta até o fim do teste em consequência do aumento da intensidade do esforço, não apresentando platô.

Estudos recentes têm demonstrado que a ingestão de nitrato inorgânico (seja em forma de suco de beterraba ou de nitrato de sódio) é capaz de reduzir o VO_2 pico para a realização de exercícios máximos e submáximos, podendo aumentar o tempo até a exaustão em exercícios de alta intensidade. A redução do VO_2 pico está relacionada ao conceito de economia de movimento, o qual coloca que para uma mesma atividade, o indivíduo com menor VO_2 pico é mais eficiente, uma vez que utiliza menos substrato para desenvolver o mesmo trabalho.

Larsen et. al. (2007) testaram o efeito da administração com nitrato inorgânico sobre parâmetros metabólicos e circulatórios durante a realização de uma sessão aguda de exercício físico. Nove voluntários participaram do estudo, sendo homens, bem treinados com idade de 28 ± 6 anos. Durante dois períodos de três dias, separados por 10 dias, os voluntários foram suplementados com nitrato de sódio a 0.1 mmol/kg de peso corporal/por dia dissolvido em 250 ml de água ou placebo (cloreto de sódio na mesma concentração do nitrato de sódio) e instruídos a evitar todos os alimentos com conteúdo de nitrato considerado entre alto e moderado (carnes vermelhas, beterraba, morango, uva, chá, espinafre), além de produtos contendo tabaco e bebidas alcóolicas. A dosagem diária de nitrato correspondeu à quantidade normalmente encontrada em porções de 150g – 250g de vegetais ricos em nitrato como beterraba, alface e espinafre. Para verificar o efeito da suplementação com nitrato no desempenho físico, foi realizado um teste submáximo de carga incremental em cicloergômetro com cinco estágios (intensidades de 45, 60, 70 80 e 85% do VO_2 pico, previamente calculado um teste anterior), durando cinco minutos cada estágio, sem descanso entre os estágios, e após 8 minutos de repouso um teste com carga constante na intensidade do VO_2 máximo até a exaustão. Como resultado, esses autores encontraram que a suplementação com nitrato de sódio resulta em menor custo de O_2 durante a realização de exercício submáximo realizado em cicloergômetro, sem aumento na concentração de lactato e nos parâmetros cardiorrespiratórios

avaliados (ventilação, produção de dióxido de carbono, frequência cardíaca e taxa de troca respiratória), o que sugere uma produção de energia mais eficiente.

Em um segundo estudo realizado pelo mesmo grupo (Larsen et.al., 2009), com desenho experimental semelhante (nove voluntários homens, não fumantes com idade de 30 ± 2.3 anos), verificou-se que redução do VO_2 pico em exercício de alta intensidade realizado após suplementação com nitrato de sódio durante dois dias (0.1 mmol/kg de peso corporal/dia). Apesar da redução no VO_2 pico o tempo até a exaustão durante a realização do exercício incremental em cicloergômetro não foi reduzido, comparado ao grupo placebo.

Outros autores propuseram um estudo para verificar se a suplementação com nitrato inorgânico na forma de suco de beterraba poderia reduzir o custo de O_2 para a realização de exercício submáximo e aumentar o tempo até a exaustão em exercício de alta intensidade em homens saudáveis. Participaram do estudo oito participantes homens, fisicamente ativos, com idade de 26 ± 7 anos, não fumantes e que não utilizavam nenhum tipo de suplemento alimentar. Após a realização de um teste para a determinação do VO_2 pico os voluntários foram randomicamente divididos em grupo placebo e experimental, realizando por seis dias suplementação com nitrato (5.5 mmol/dia administrado sob a forma 0.5 litros de suco de beterraba/dia) ou placebo (suco de groselha preta não contendo nitrato). Os sujeitos foram orientados a se absterem de alimentos ricos em nitrato durante todo o período do estudo. Nos três últimos dias de suplementação os voluntários realizaram sessões de exercícios de moderada e alta intensidades em cicloergômetro. Verificou-se que durante a realização de exercício de intensidade moderada após a suplementação com nitrato, a extração fracional de O_2 pelos músculos (analisada por um sistema de espectroscopia infravermelha) foi reduzida, assim como a captação pulmonar de O_2 após a realização desse tipo de exercício. Durante a realização de exercício intenso o componente lento do VO_2 foi reduzido e o tempo até a exaustão foi aumentado, devido á suplementação com nitrato (Bailey et. al, 2009).

Um estudo propôs verificar o efeito de uma única dose de nitrato de sódio ingerida antes do início de uma sessão aguda exercício no tempo de exaustão de 11 atletas de endurance (homens, ciclistas e triatletas com idade de 34.3 ± 4.8

anos) em exercício de alta intensidade. Três horas após suplementação com uma dose de nitrato de sódio de $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal ou a mesma quantidade de placebo (cloreto de sódio), os voluntários completaram um teste intermitente em cicloergômetro em intensidades submáximas (entre 2 e 3.5 W/kg de peso corporal) e outro teste de carga incremental até a exaustão voluntária. Os autores verificaram que a suplementação com uma única dose de nitrato de sódio aumentou os níveis plasmáticos de nitrito na mesma proporção quando comparada com a suplementação realizada por dois dias. Além disso, os resultados encontrados após a realização dos exercícios demonstraram, ao contrário de outros estudos que o VO_2 em intensidades de exercício de baixa a moderada não é otimizado pela suplementação; entretanto, em intensidades máximas o VO_2 pico foi significativamente reduzido, sem alterar o tempo até a exaustão (Bescós et.al., 2011).

Os mecanismos pelos quais a suplementação com nitrato reduz o custo de O_2 para a realização de exercício físico ainda não estão totalmente elucidados, mas acredita-se que pode ser devido a melhoria na eficiência mitocondrial. Foi demonstrado que a suplementação com nitrato de sódio por três dias (0.3 mmol/kg de peso corporal/dia) aumenta a eficiência fosforilativa mitocondrial de humanos, avaliada pela razão P/O (O_2 consumido por ATP produzido), a qual correlacionou-se com a redução no custo de VO_2 pico durante a realização de exercício em cicloergômetro. Além disso, a ingestão de nitrato inorgânico reduziu a expressão da translocase ADP/ATP , uma proteína envolvida na condutância de prótons, a qual é responsável por desfazer o gradiente de prótons, aumentando a dissipação de energia e reduzindo a produção de ATP e consequentemente a eficiência mitocondrial (Larsen et. al., 2011).

Outro estudo, utilizando exercício para a extensão do joelho e por espectroscopia por ressonância magnética para acessar as alterações metabólicas musculares encontrou que a redução nos níveis de fosfocreatina foi atenuada e o *turnover* de ATP foi menor, após a suplementação com nitrato, quando comparados ao grupo placebo. Esses resultados indicam que o nitrato também tem efeitos fora da mitocôndria, possivelmente nos filamentos contráteis de actina e miosina ou estruturas ligantes ao cálcio (Bailey et. al., 2010).

Como se pode observar os resultados acerca dos estudos envolvendo suplementação com nitrato inorgânico e exercício apresentam controvérsias. Uma das razões que podem explicar os diferentes resultados encontrados são as distintas metodologias aplicadas nos estudos como, por exemplo, a duração do período de suplementação, os diferentes protocolos de exercício utilizados e o estado de treinamento dos indivíduos, o que torna difícil a comparação de resultados.

Óxido nítrico e estresse oxidativo

Por ser um agente redutor fraco, o $\text{NO}^\bullet$ pode agir com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), um radical livre com capacidade oxidante, produzindo peroxinitrito (ONOO^-), reação essa que ocorre rapidamente (reação 1), cerca de três vezes mais rápido do que a dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ainda mais rápido do que a reação do $\text{NO}^\bullet$ com proteínas que contem grupo heme. Assim essa é a primeira reação que ocorre quando ambos estão presentes.



Segundo Powers & Jackson (2008), o peroxinitrito (ONOO^-) ou sua forma protonada (ONOOH) é um potente agente oxidante capaz de levar à depleção de grupos tiol, danos no DNA e nitração de proteínas. Um efeito adicional da formação de ONOO^- é a redução da biodisponibilidade do superóxido e do $\text{NO}^\bullet$.

O aumento da formação de agentes pró-oxidante pode causar um desbalanço entre as espécies oxidantes e antioxidantes, em favor das moléculas oxidantes, levando a perturbações na sinalização do controle redox e dano molecular (Powers et. al., 2011). Os danos oxidativos incluem danos no DNA, alteração na estrutura de lipídeos e proteínas, levando a sua inativação, dentre outros. Já é bem descrito na literatura que o exercício agudo, aumenta a produção de espécies pró-oxidantes, o que pode levar ao desbalanço redox (Bloomer & Goldfarb, 2004; Bloomer et. al., 2005; Fisher-Wellman & Blooman, 2009). Entretanto, sabe-se que o exercício regular leva ao aumento da atividade antioxidante, estimulado pelo aumento dos radicais livres (Nojima et. al., 2008; Schaun et. al., 2011; Syu et. al., 2011). Assim, certo nível de radicais livres é

importante para a adaptação do organismo ao exercício físico, o que estimula o aumento defesas antioxidantes, mas um nível exacerbando dessas moléculas gera desbalanço redox, o que pode levar ao dano oxidativo de biomoléculas e causar efeitos deletérios sistêmicos.

A relação entre a ingestão de nitrato inorgânico e o dano oxidativo ainda não é bem estabelecida. Poucos estudos abordam essa temática e por essa razão, fazer inferências sobre o real efeito da suplementação com nitrato de sódio no balanço redox ainda não é possível.

Carlström et. al (2010), testaram se a suplementação crônica com nitrato de sódio (oito semanas), em duas concentrações diferentes (0.1 ou 1 mmol de nitrato/kg de peso corporal/dia) desempenhava efeitos terapêuticos em ratos com doença cardiovascular e renal. No que se refere ao dano oxidativo, mensurado a partir das dosagens de malondialdeído (MDA) plasmático e de VI F2-isoprostanos (iPF2 α -VI) e 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG), ambos na urina, verificou-se redução no estresse oxidativo tanto em baixas quanto em altas concentrações de nitrato, o que sugere um papel protetor do NO^{*} gerado a partir da ingestão de nitrato inorgânico, nos danos oxidativos causados nessas doenças. Os possíveis efeitos do NO^{*} na redução do estresse oxidativo podem estar relacionados, à eliminação do O₂^{••} pelo NO^{*} derivado do nitrato e também à inibição da produção de EROs a partir dos sistema mitocondrial, da xantina oxidase, da NADPH oxidase e do citocromo 450 pela produção de óxidos de nitrogênio a partir do nitrato.

Em relação à redução da produção mitocondrial de EROs, essa pode ser devida à nitrosilação e consequente inibição do complexo I da cadeia de transporte de elétrons, demonstrado por Shiva et. al. (2007) em um modelo de isquemia e reperfusão, situação que acontece, por exemplo, na realização de exercício resistido, assim como em algumas doenças, aumentando a produção de EROs. Esses autores demonstraram que o nitrito, em concentrações nanomolares, atenua a transferência de elétrons e reduz efetivamente a geração de EROs durante a reperfusão, por modificação e inibição do complexo I por nitrosilação pós-translacional, amenizando a inativação oxidativa dos complexos II e IV e da aconitase, impedindo assim a permeabilidade mitocondrial por abertura do poro de transição e a liberação do citocromo c. Essa inibição parece

ocorrer somente em situações de hipóxia ou de estresse redox, não acontecendo em situações de homeostase, nas quais a inibição do complexo I resultam em aumento na produção de EROs (Shiva et. al., 2007).

Já é descrito na literatura, que o exercício físico agudo, tanto aeróbio quanto anaeróbio, promove alterações no estado redox do organismo, devido ao aumento na produção de radicais livres (Bloomer & Goldfarb, 2004; Bloomer et. al., 2005; Fisher-Wellman & Blooman, 2009; Berzosa et. al., 2011). Entretanto, não há relatos a respeito do efeito da suplementação com nitrato no estado redox do organismo, durante a realização de exercício agudo. Essa avaliação se faz importante uma vez que a suplementação com nitrato inorgânico vem sendo utilizada buscando melhoria no desempenho de atletas e pessoas fisicamente ativas.

Referências

1. BAILEY, S.J.; WINYARD, P.; VANHATALO, A.; BLACKWELL, J.R.; DIMENNA, F.J.; WILKERSON, D.P.; TARR, J.; BENJAMIN, N.; JONES, A.M. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. *J Appl Physiol*. 2009 Oct;107(4):1144-55.
2. BAILEY, S.J.; FULFORD, J.; VANHATALO, A.; WINYARD, P.G.; BLACKWELL, J.R.; DIMENNA, F.J.; WILKERSON, D.P.; BENJAMIN, N.; JONES, A.M. Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. *J Appl Physiol*. 2010 Jul;109(1):135-48.
3. BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424-37.
4. BERZOSA, C.; CEBRIÁN, I.; FUENTES-BROTO, L.; GÓMEZ-TRULLÉN, E.; PIEDRAFITA, E.; MARTÍNEZ-BALLARÍN, E.; LÓPEZ-PINGARRÓN, L.; REITER, R.J.; GARCÍA, J. J. Acute exercise increases plasma total antioxidant status and antioxidant enzyme activities in untrained men. *J Biomed Biotechnol*. 2011:540-58.
5. BESCÓS, R.; RODRÍGUEZ, F.A.; IGLESIAS, X.; FERRER, M.D.; IBORRA, E.; PONS, A. Acute administration of inorganic nitrate reduces VO₂(peak) in endurance athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2011 Oct;43(10):1979-86.
6. BESCÓS, R.; FERRER-ROCA, V.; GALILEA, P.A.; ROIG, A.; DROBNIC, F.; SUREDA, A.; MARTORELL, M.; CORDOVA, A.; TUR, J.A.; PONS, A. Sodium nitrate supplementation does not enhance performance of endurance athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2012 Dec;44(12):2400-9.

7. BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A. H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can J Appl Physiol*. 2004 Jun;29(3):245-63.
8. BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A.H.; WIDEMAN, L.; MCKENZIE, M. J., CONSITT, L.A. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res*. 2005 May; 19(2):276-85.
9. BOVERIS, A.; COSTA, L.E.; PODEROSO, J.J.; CARRERAS, M.C.; CADENAS, E. Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;899:121-35.
10. CARLSTRÖM, M.; PERSSON, A.E.; LARSSON, E.; HEZEL, M.; SCHEFFER, P.G.; TEERLINK, T.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.O. Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. *Cardiovasc Res*. 2011 Feb 15;89(3):574-85.
11. CARNOVALE, C.E.; RONCO, M.T. Role of nitric oxide in liver regeneration. *Ann Hepatol*. 2012 Sep-Oct;11(5):636-47.
12. CASTIGLIONE, N.; RINALDO, S.; GIARDINA, G.; STELITANO, V.; CUTRUZZOLÀ, F. Nitrite and nitrite reductases: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Aug 15;17(4):684-716.
13. DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Clínica*. 2003, 39(4):343-50.
14. FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R.J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*. 2009 Jan 13;8:1.

15. HO, J.J.; MAN, H.S.; MARSDEN, P.A. Nitric oxide signaling in hypoxia. *J Mol Med (Berl)*. 2012 Mar;90(3):217-31.
16. KAMGA, C.; KRISHNAMURTHY, S.; SHIVA, S. Myoglobin and mitochondria: a relationship bound by oxygen and nitric oxide. *Nitric Oxide*. 2012 May 15;26(4):251-8.
17. LANSLEY, K.E.; WINYARD, P.G.; BAILEY, S.J. VANHATALO, A.; WILKERSON, D.P.; BLACKWELL, J.R.; GILCHRIST, M.; BENJAMIN, N.; JONES, A.M. Acute dietary nitrate supplementation improves cycling time trial performance. *Med Sci Sports Exerc*. 2011 Jun;43(6):1125-31.
18. LARSEN, F.J.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.O.; EKBLOM, B. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007 Sep;191(1):59-66.
19. LARSEN, F.J.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.O.; EKBLOM, B. Dietary nitrate reduces maximal oxygen consumption while maintaining work performance in maximal exercise. *Free Radic Biol Med*. 2010 Jan 15;48(2):342
20. LARSEN, F.J.; SCHIFFER, T.A.; BORNIQUEL, S.; SAHLIN, K.; EKBLOM, B.; LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. *Cell Metab*. 2011 Feb 2;13(2):149-59.
21. LARSEN, F.J.; SCHIFFER, T.A.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.O. Regulation of mitochondrial function and energetics by reactive nitrogen oxides. *Free Radic Biol Med*. 2012 Nov 15;53(10):1919-28.
22. LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Feb;7(2):156-67.

23. MONCADA, S.; HIGGS A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993 Dec 30;329(27):2002-12.
24. PATEL, R.P.; HOGG, N.; KIM-SHAPIRO, D.B. The potential role of the red blood cell in nitrite-dependent regulation of blood flow. *Cardiovasc Res.* 2011 Feb 15;89(3):507-15.
25. POWERS, S.K.; JACKSON, M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008 Oct;88(4):1243-76.
26. POWERS, S.K.; NELSON, W.B.; HUDSON, M. B. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med.* 2011 Sep 1; 51(5):942-50.
27. SHIVA, S.; SACK, M.N.; GREER, J.J.; DURANSKI, M.; RINGWOOD, L.A.; BURWELL, L.; WANG, X.; MACARTHUR, P.H.; SHOJA, A.; RAGHAVACHARI, N.; CALVERT, J.W.; BROOKES, P.S.; LEFER, D.J.; GLADWIN, M.T. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med.* 2007 Sep 3;204(9):2089-102.
28. STEFANO, G.B.; KREAM, R.M. Reciprocal regulation of cellular nitric oxide formation by nitric oxide synthase and nitrite reductases. *Med Sci Monit.* 2011 Oct;17(10):RA221-6.
29. TENGAN, C.H.; RODRIGUES, G.S.; GODINHO, R.O. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. *Int J Mol Sci.* 2012 Dec 14;13(12):17160-84.
30. TOTZECK M, HENDGEN-COTTA UB, RAMMOS C, FROMMKE LM, KNACKSTEDT C, PREDEL HG, KELM M, RASSAF T. Higher endogenous nitrite

levels are associated with superior exercise capacity in highly trained athletes. Nitric Oxide. 2012 Aug 15;27(2):75-81.

31. UMBRELLO M, DYSON A, FEELISCH M, SINGER M. The Key Role of Nitric Oxide in Hypoxia: Hypoxic Vasodilation and Energy Supply-Demand Matching. Antioxid Redox Signal. 2013 Mar 1.

32. WILKERSON, D.P.; HAYWARD, G.M.; BAILEY, S.J.; VANHATALO, A.; BLACKWELL, J.R.; JONES, A. M. Influence of acute dietary nitrate supplementation on 50 mile time trial performance in well-trained cyclists.

33. YOUNG, M.E.; LEIGHTON, B. Fuel oxidation in skeletal muscle is increased by nitric oxide/cGMP--evidence for involvement of cGMP-dependent protein kinase. FEBS Lett. 1998 Mar 6;424(1-2):79-83.

Capítulo 2

Efeitos da suplementação aguda com nitrato de sódio no balanço redox, na pressão arterial, no VO_2 pico e no desempenho de homens fisicamente ativos durante exercício máximo

(Submetido e formatado segundo as normas da revista European Journal of Applied Physiology)

Resumo

A suplementação de nitrato inorgânico apresenta inúmeros efeitos na saúde e respostas fisiológicas ao exercício. Diante disso, a proposta do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação aguda com nitrato de sódio, no desempenho (potência máxima e distância percorrida), no VO_2 pico e no balanço redox de homens jovens, saudáveis, submetidos a um teste de esforço máximo em cicloergômetro. A amostra foi composta por 12 homens ($23 \pm 3,39$ anos, $179,41 \pm 7,72$ cm, $72,86 \pm 10,14$ kg). Os indivíduos foram submetidos aleatoriamente a duas suplementações: nitrato de sódio ou placebo (cloreto de sódio) a $10 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de peso corporal de forma duplo cego cruzado e com intervalo de 96 horas entre as fases. Os voluntários foram submetidos a um teste incremental em cicloergômetro até a exaustão voluntária e foram avaliados marcadores do estado redox, FC, pressão arterial, o VO_2 pico e o desempenho no teste. Três horas após a suplementação com nitrato de sódio as concentrações plasmáticas de nitrito plasmático foram maiores no grupo suplementado em relação ao grupo placebo tanto antes ($48,50 \pm 12,64 \text{ } \mu\text{Mol/L}$ vs $67,45 \pm 20,78 \text{ } \mu\text{Mol/L}$) quanto após o teste de esforço máximo ($54,75 \pm 11,82 \text{ } \mu\text{Mol/L}$ vs $80,33 \pm 22,87$). Além disso, a suplementação aguda com nitrato de sódio não reduziu o VO_2 pico ($42,81 \pm 6,69 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}$ placebo vs $42,46 \pm 5,45$ nitrato), não alterou tanto a pressão arterial sistólica ($117 \pm 8,02 \text{ mmHg}$ placebo vs $120,3 \pm 6,97 \text{ mmHg}$ nitrato) quanto a diastólica ($81,17 \pm 11,86 \text{ mmHg}$ placebo vs $81,0 \pm 9,20 \text{ mmHg}$ nitrato) e não melhorou o desempenho ($7,52 \pm 1,32 \text{ km}$ placebo vs $7,58 \pm 1,27 \text{ km}$ nitrato). Avaliando o balanço redox há indícios de alterações do mesmo, entretanto, outras análises precisam ser realizadas para tal confirmação. Podemos concluir que a suplementação aguda de nitrato não melhora o desempenho de indivíduos saudáveis e submetidos a um teste de esforço máximo.

Palavras-chave: óxido nítrico, nitrato, nitrito, consumo de oxigênio, desempenho, estado redox.

Introdução

O nitrato (NO_3^-) e o nitrito (NO_2^-), considerados anteriormente moléculas indesejadas com efeitos potencialmente deletérios ou como produtos finais do metabolismo do óxido nítrico (NO^*) têm ganhado relevância por ser uma fonte alternativa de produção dessa molécula (Bescós et. al., 2011). O NO^* é um radical livre, cuja síntese resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina (Dusse et. al., 2003). Essa reação pode ser catalisada por três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a a NO-sintase neuronal (nNOS), a NO-sintase endotelial e a a NO-sintase indutível (iNOS) (Tengan et. al, 2012). Em condições de hipóxia fisiológica e acidose metabólica, a produção enzimática de NO^* pode estar prejudicada. Nessas situações, o nitrito (NO_2^-), é uma fonte alternativa de NO^* bioativo (Bescós et. al., 2011). O NO_3^- advindo da alimentação é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal superior, sendo captado pelas glândulas salivares e liberado na saliva. Na boca, bactérias anaeróbias facultativas, reduzem NO_3^- à NO_2^- , que pode ser convertido à NO^* no estômago, sendo uma parte absorvida de maneira intacta, aumentando sua concentração plasmática (Lundberg e Govoni, 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que a ingestão de nitrato inorgânico é capaz de reduzir o VO_2 pico para a realização de exercícios máximos e submáximos, podendo aumentar o tempo até a exaustão nesse tipo de atividade (Larsen et. al., 2007; Bailey et. a., 2009; Larsen et. al., 2010; Bescós et. al., 2011; Larsen et. al., 2011). A redução do VO_2 pico pode estar relacionada à melhoria na eficiência fosforilativa mitocondrial, mensurada pela quantidade de oxigênio consumida por ATP produzido, conhecida como razão P/O (Hinkle et. al., 2005). Além disso, a queda nos valores de VO_2 pico pode ser devida também, a um menor custo de ATP para a produção muscular de força, o que tem relação com uma redução na taxa de *turnover* de ATP nos miócitos por redução das alterações nos fosfatos de alta energia, o que reduz o estímulo para a fosforilação oxidativa (Bailey et. al., 2010)

Nessa perspectiva, Bailey et. al. (2009) verificaram que três dias de suplementação com suco de beterraba (rico em NO_3^-) reduzem significativamente o custo de O_2 para a realização de exercício submáximo e

aumenta o tempo até a exaustão em exercício de alta. Outro estudo demonstrou que a suplementação aguda com nitrato de sódio ($0.1 \text{ mmol.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) reduz significativamente o VO_2 pico sem aumentar o tempo até a exaustão em exercício de alta intensidade (Larsen et. al., 2010). Corroborando esses achados, outros autores, verificaram que a suplementação aguda com nitrato de sódio (10 mg.kg^{-1}) reduziu o VO_2 pico sem alterar a carga máxima de trabalho em exercício de alta intensidade, não promovendo efeito em exercício de intensidade moderada (Bescós et. al., 2011).

Sabe-se que na adaptação fisiológica ao exercício físico o óxido nítrico desempenha função importante, uma vez que o aumento da vasodilatação proporciona melhor aporte de oxigênio para a musculatura ativa. Entretanto, por ser um agente redutor fraco, o $\text{NO}^{\bullet}$ pode reagir com ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) produzindo peroxinitrito (ONOO^-), reação essa que ocorre rapidamente (Powers & Jackson, 2008). Dessa forma, na presença de $\text{O}_2^{\bullet-}$ o $\text{NO}^{\bullet}$ em altas concentrações pode aumentar o dano oxidativo, dependendo da condição fisiológica, uma vez que o peroxinitrito é um potente agente oxidante capaz de levar à depleção de grupos tiol, danos no DNA e nitração de proteínas.

O aumento da formação de agentes pró-oxidantes pode causar um desbalanço entre as espécies oxidantes e antioxidantes, em favor das moléculas oxidantes, levando a perturbações na sinalização do controle redox e dano molecular (Powers et. al., 2011). Os danos oxidativos incluem danos no DNA, alteração na estrutura de lipídeos e proteínas, levando a sua inativação, dentre outros. Já é bem descrito na literatura que o exercício agudo, aumenta a produção de espécies pró-oxidantes, o que pode levar ao desbalanço redox (Bloomer & Goldfarb, 2004; Bloomer et. al., 2005; Fisher-Wellman & Blooman, 2009). Entretanto, sabe-se que o exercício regular leva ao aumento da atividade antioxidante, estimulado pelo aumento dos radicais livres (Nojima et. al., 2008; Schaun et. al., 2011; Syu et. al., 2011) Assim, certo nível de radicais livres é importante para a adaptação do organismo ao exercício físico, o que estimula o aumento defesas antioxidantes, mas um nível exacerbando dessas moléculas gera desbalanço redox, o que pode levar ao dano oxidativo de biomoléculas e causar efeitos deletérios sistêmicos.

A relação entre a ingestão de nitrato inorgânico e o dano oxidativo ainda não é bem estabelecida. Poucos estudos abordam essa temática e, por essa razão, fazer inferências sobre o real efeito da suplementação com nitrato de sódio no balanço redox ainda não é possível. Dessa forma, a proposta do presente estudo é avaliar o efeito da suplementação aguda com nitrato de sódio no balanço redox, no desempenho (potência máxima, distância percorrida), e no VO_2 pico de homens submetidos a um teste máximo. Nossa hipótese é de que a suplementação reduz o VO_2 pico e melhora o desempenho em teste incremental até a exaustão, promovendo um desbalanço redox em favor dos pró-oxidantes.

Métodos

Participantes

Os voluntários foram recrutados na Universidade Federal de Uberlândia. Participaram do estudo, 12 homens jovens (idade de $23 \pm 3,39$ anos, altura de $179,41 \pm 7,72$ cm, peso corporal de $72,86 \pm 10,14$ kg e percentual de gordura de $12,31 \pm 3,53\%$) (Tabela 1), fisicamente ativos, não fumantes, que não apresentavam nenhum tipo de doença crônica, doença cardiovascular e limitação fisiológica ou ortopédica para a realização de exercício físico. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (parecer número 306.988/2013 – anexo I) e cada participante preencheu um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I), no qual os riscos da sua participação na investigação proposta foram explicados.

Visitas e orientações

Os voluntários visitaram o laboratório em três ocasiões. Na primeira visita foi feita avaliação da composição corporal por bioimpedância (Balança de bioimpedância tetrapolar, Tanita BC558), familiarização com o cicloergômetro (Ergo 167 Cycle, Ergo-Fit, Pirmasens, Germany), com o analisador de gases (Fitmate Pro, Cosmed Srl, Italy) e com o protocolo de testes. As duas visitas seguintes, foram para a realização dos testes físicos, executados em condições idênticas (22°C), sempre no período da manhã (das 9 às 10:30). Para a realização dos testes os voluntários foram orientados a se absterem de qualquer tipo de atividade física vigorosa por um período de 48

horas. Cada voluntário repetiu o segundo teste no mesmo horário do teste anterior, sendo cada teste separado por um período de 96 horas.

Suplementação

Os participantes foram aleatoriamente divididos em um estudo cruzado e duplo-cego, recebendo uma única dose de nitrato de sódio (10 mg. Kg^{-1} de peso corporal) ou placebo (cloreto de sódio), dissolvidos em 250 ml de água. As duas bebidas eram indistinguíveis pelo gosto ou aparência. Os indivíduos receberam a bebida pronta (nitrato ou placebo) e foram orientados a ingeri-la três horas antes do teste, devido à cinética do nitrato e o pico de nitrito circulante, como demonstrado por outros autores (Bescós et. al., 2011). Durante esse período foi aconselhado que os voluntários permanecessem em repouso e não ingerissem nenhum tipo de alimento ou bebida, a não ser água para garantir um estado de hidratação adequado. Foi recomendada uma dieta restrita em alimentos contendo nitrato (vegetais verdes, beterraba, morango, uva, chá e carnes vermelhas) 48 horas antes da realização dos testes. Além disso, foi sugerido que fosse evitado o consumo de álcool, de produtos à base de cafeína e de suplementos dietéticos. Os testes foram separados por um período mínimo de 96 horas.

Protocolo de testes e mensuração do VO_2 pico

O teste físico no cicloergômetro consistiu de um teste incremental até exaustão voluntária, com incrementos de 45 watts a cada dois minutos e rotação fixa de 90 rpm. Os critérios para finalização do teste seguiram as recomendações do Colégio Americano de Medicina do Esporte (Garber et. al., 2011). A potência máxima atingida no teste foi calculada através da seguinte fórmula, de acordo com Stegmann et. al.(1981):

**potência = rotação (rpm) X carga total alcançada ao final do teste
(soma dos incrementos realizados a cada dois minutos)**

O consumo de oxigênio (VO_2) foi mensurado por meio de um analisador de gases computadorizado (Fitmate Pro, Cosmed Srl, Italy). A calibração e a utilização do aparelho foram feitas de acordo com o manual de instruções do fabricante. O VO_2 pico foi considerado o maior valor de VO_2 atingido durante a realização do teste.

Durante todo o teste a frequência cardíaca (FC) foi monitorada através de um frequencímetro (Polar FS2C). Além da FC e do VO_2 , a pressão arterial (PA) também foi monitorada, antes e após o teste.

Coleta sanguínea e análises laboratoriais

Antes do início do teste e cinco minutos após o término, foi coletado sangue da veia anticubital (10 ml), por meio de punção venosa. O sangue foi coletado em tubos Vacutainer® contendo anticoagulante (EDTA). Após a coleta, o sangue foi imediatamente centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C para a separação do plasma e das células sanguíneas, a partir das quais foi preparado o hemolisado. As análises sanguíneas foram realizadas imediatamente após a coleta.

A determinação do nitrito plasmático foi feita a partir da reação de Griess (Giustarini et. al., 2008), sendo as amostras sanguíneas imediatamente centrifugadas após a coleta para evitar a reação do nitrito com a hemoglobina. Para o ensaio, 50µL do plasma foram incubados com 50µL do reagente Griess (sulfanilamida 1% em ácido fosfórico a 2,5%, e N-(1-Naphtyl) etilenodiamida dicloridrato a 0,1%) a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi mensurada espectrofotometricamente a 570 nm utilizando uma leitora de microplaca (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). O conteúdo de nitrito foi calculado, baseado em uma curva padrão, construída com NaNO_2 nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.12 µM.

Ainda no plasma foram avaliados a atividade antioxidante total e a peroxidação lipídica. A atividade antioxidante total foi avaliada por meio da redução do ferro no seu estado férrico (Fe^{3+}) para seu estado ferroso (Fe^{2+}) em pH baixo, formando o complexo ferro-tripiridiltriazina (TPTZ) de coloração azul intensa, lido espectrofotometricamente a 593 nm (Benzie & Stain, 1996). Os reagentes incluem tampão acetato de sódio (300 mM. L^{-1} , pH 3.6), e 16 ml de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ por litro de tampão; 10 mmol . L^{-1} de TPTZ preparado em HCL a 40 mmol . L^{-1} e cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 20 mM, preparado no tampão acetato de sódio (300 mM. L^{-1} , pH 3.6). O reagente de trabalho foi preparado adicionando-se 25 ml de tampão acetato de sódio, 2.5 ml da solução de TPTZ e

2.5 ml da solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, sendo aquecido a 37°C por cinco minutos. Na microplaca foram adicionados 10 μL da amostra, 25 μL de água destilada e 250 μL do reagente de trabalho, incubados a 37°C por seis minutos. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 593 nm utilizando uma leitora de microplaca (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). A atividade antioxidante total foi calculada, baseada em uma curva padrão contruída a partir de trolox, nas concentrações de 1000, 800, 400, 200, 200 e 50 μM . Os reagentes foram preparados imediatamente antes do experimento, com excessão do tampão acetato que pode ser preparado antes e armazenado em geladeira.

A peroxidação lipídica foi medida através da formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondealdeído – MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído, e outros aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Esses complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente. Utilizou-se tampão KPE (potássio, fosfato e EDTA) para diluir as amostras (1:4 v/v), preparado a partir de 6,8g de KH_2PO_4 em 500 ml de H_2O , 8,4 g de K_2HPO_4 em 500 ml de H_2O . Para o reagente final misturou-se 80 ml da solução de KH_2PO_4 a 420 ml da solução de K_2HPO_4 , juntamente com 930 mg de EDTA. Após a diluição, adicionou-se 100 μL de ácido tricloacético a 10% (TCA 10%) a 200 μL de amostra, resfriando-as por 15 minutos a 4°C e centrifugando-as logo em seguida a 6000 rpm por 15 minutos, a 4°C . Após a centrifugação 250 μL do sobrenadante foram retirados de cada amostra e então 300 μL do ácido tiobarbitúrico (TBA) a 50 mmol foram adicionados. Após a adição de TBA as amostras foram encubadas por 120 minutos a 95°C , e depois resfriadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados à microplaca 150 μL de amostra em duplicada, as quais foram lidas espectrofotometricamente a 532nm. A concentração dos produtos de peroxidação lipídica foi calculada baseada em uma curva padrão construída a partir de malondialdeído nas concentrações de 100, 50, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 μmol .

A atividade da catalase foi medida no hemolisado, por meio da decomposição do peróxido de hidrogênio, lida a 240 nm em espectrofotômetro

(Aebi, 1984). O reagente de trabalho, preparado imediatamente antes do experimento é composto por tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4 50mM e Na_2HPO_2 50mM) e peróxido de hidrogênio a 30%. A proporção é de 1000ml de tampão para 340 μL de peróxido. Antes da leitura as amostras foram diluídas em tampão fosfato (1:10 v/v). Todas leituras foram feitas em cubeta de quartzo. O branco foi lido previamente às amostras, contendo apenas tampão fosfato (1000 μL) e em seguida, as amostras foram lidas em duplicata, adicionando-se à cubeta 1000 μL da solução de trabalho e 10 μL do hemolisado diluído. O consumo do peróxido de hidrogênio foi monitorado durante 30 segundos, anotando-se as absorbâncias a cada intervalo de 15 segundos. O cálculo da atividade da catalase é dado pela equação: $[(t_0 - t_{30}) \cdot 10] / [\text{proteína}] \cdot 30$, sendo t_0 o tempo de leitura inicial, t_{30} o tempo de leitura final, 10 o fator de diluição da amostra e 30 o tempo total de leitura. A quantificação de proteína total é necessária para o cálculo. A dosagem de proteína total das amostras foi realizada de acordo com o protocolo de Bradford (1976) adaptado para microplaca. Em cada poço da microplaca foi adicionado 5 μL do hemolisado diluído (1:350 v/v), 95 μL de água deionizada e 200 μL do reagente de Bradford. O ensaio foi realizado em duplicata e lido à 595nm à temperatura ambiente.

Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk antes das análises. Nenhuma transformação foi necessária para as variáveis analisadas. As concentrações de nitrito, assim como a atividade antioxidante total, a peroxidação lipídica e a atividade da catalase, pré e pós exercício foram transformadas em média e comparadas entre os grupos placebo e suplemento utilizando teste t pareado bicaudal. O VO_2 pico pós teste, do grupo suplementado e do grupo placebo também foram transformados em média e analisados utilizando teste t pareado bicaudal. Para todas as análises, o nível de significância foi de $p < 0,05$. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão da média.

Resultados

Concentrações plasmáticas de NO^{2-}

A média dos valores das concentrações plasmáticas de NO^{2-} pré e pós teste nos grupos placebo e suplemento estão representadas na Fig. 1. Como esperado, os voluntários que receberam uma única dose de nitrato de sódio apresentaram elevações nas $[\text{NO}^{2-}]$ quando comparados ao grupo placebo, tanto pré quanto pós teste.

Marcadores de estresse oxidativo

Catalase

A atividade da catalase nos grupos placebo e suplemento pré e pós teste está representada na Fig. 2 No grupo placebo não houve diferença significativa, enquanto no grupo suplementado a atividade de catalase pós teste apresentou uma redução, comparado ao pré teste.

Atividade Antioxidante Total

A atividade antioxidante total está representada na Fig. 3. O grupo placebo apresentou um aumento significativo pós teste, enquanto não foi encontrada diferença no grupo suplementado.

Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica, indicada pelas substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico, está representada na Fig. 4. Não houve diferença significativa pré e pós exercícios com nenhum dos dois tratamentos, placebo ou nitrato de sódio.

VO_2 pico, potência máxima, distância e PA

As médias do VO_2 pico, da potência máxima e da distância percorrida nos testes, assim como da PA pré e pós, nos grupos placebo e suplemento estão representados na Tabela 2. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de nenhuma dessas variáveis após o tratamento com nitrato de sódio. A razão potência máxima/ VO_2 pico está representada na Fig. 5. Não houve diferença significativa entre os grupos placebo e suplementado.

Discussão

O principal achado do estudo é que a suplementação aguda com nitrato de sódio inibe a atividade da catalase e não promove alterações tanto na atividade antioxidante total, quanto na peroxidação lipídica. Além disso, o nitrato

não foi eficiente em reduzir o VO_2 pico e a PA e não melhorou o desempenho no teste máximo em cicloergômetro. Esse foi o primeiro estudo avaliando o balanço redox após a suplementação com nitrato de sódio em um teste físico máximo.

A catalase é uma das enzimas que compõem o sistema endógeno de defesa antioxidante. Sua principal função é quebrar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um composto reativo capaz de gerar radicais livres, em H_2O e O_2 . De forma interessante, a atividade da catalase apresentou redução pós teste somente no grupo suplementado. Entretanto, estudos têm demonstrado aumento na atividade da catalase após exercício físico de alta intensidade, o que representa um mecanismo protetor tecidual contra a geração de H_2O_2 (Berzosa et. al, 2011; Aguiló et. al., 2004; Terblanche, 1999; Ji & Fu, 1992).

A redução da catalase no grupo que recebeu nitrato de sódio pode ser devido ao fato de que o NO tem a capacidade de ligar-se a proteínas que contem ferro em sua estrutura. A catalase, assim como a hemoglobina apresenta grupamentos heme, os quais são imprescindíveis para a conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 . De acordo com Brown (1995), a ligação do NO^* ao ferro presente no sítio ativo da catalase, pode ter sido a causa da redução da atividade da enzima antioxidante. A ligação do NO à catalase inibe a atividade da enzima, provavelmente por competição com o H_2O_2 . As consequências dessa inibição estão relacionadas ao aumento dos níveis de H_2O_2 e subsequentemente do dano tecidual (Brown, 1995).

A o processo de peroxidação lipídica refere-se a uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os ácidos graxos insaturados, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, morte celular (Benzie, 1996). Por outro lado, a atividade antioxidante total do plasma representa a capacidade que os antioxidantes não enzimáticos tem em conjunto de resistir ao dano oxidativo (Benzie & Stream, 1996). O ácido úrico representa cerca de 60% da resposta antioxidante avaliada no ensaio, enquanto ácido ascórbico, α -tocoferol, proteínas e bilirrubina representam 15, 5, 10 e 5%, respectivamente (Benzie & Stream, 1996).

Apesar da redução na atividade da catalase no grupo suplementado, não houve aumento da peroxidação lipídica, assim como da atividade antioxidante total, a qual só aumentou no grupo placebo. Outros estudos também não verificaram aumentos na peroxidação lipídica após a realização de exercício agudo (Leaf et. al., 1997; Groussard et. al., 2003; Bloomer et. al., 2006). Leaf et. al. (1997) justificaram que a manutenção nos valores de peroxidação lipídica pode ser devida ao fato de que o malondealdeído, assim como outros produtos de peroxidação lipídica, podem ser eliminados do plasma por vários mecanismos incluindo excreção, catabolismo ou redistribuição para outros tecidos. Corroborando os achados de Leaf et. al. (1997), Groussard et. al. (2003), assumiram que no período pós exercício houve remoção do malondealdeído plasmático e também por essa razão não foram encontradas diferenças entre os níveis pré e pós-teste.

No que se refere à capacidade antioxidante total do plasma, há relatos na literatura tanto de aumento quanto manutenção nos valores pré e pós exercício agudo. Foi demonstrado por Popovic et. al., (2012) que a atividade antioxidante total do plasma não aumenta em animais submetidos a um teste agudo de natação até a exaustão. Para esses autores, uma vez que o estado antioxidante exibe diferenças na magnitude da resposta em órgãos distintos e de acordo com o protocolo de exercício utilizado, alterações podem facilmente ser perdidas quando a amostra é avaliada somente em um ponto após o exercício. Outro estudo verificou aumento da atividade antioxidante total do plasma em uma sessão aguda exercício resistido, mas não observou alterações após a realização de exercício aeróbico em indivíduos eutróficos (Vincent et. al., 2004). Os resultados encontrados por esses autores sugerem que a mobilização das defesas antioxidantes varia de acordo com o tipo de exercício realizado (Vincent et. al., 2004). Entretanto, em nosso estudo, o exercício realizado foi o mesmo tanto na condição placebo quanto na condição suplemento, o que de acordo com os estudos citados acima, não justifica as diferenças encontradas pós teste, nos dois grupos.

O que pode justificar as respostas encontradas por nós em relação à atividade antioxidante total, é o fato de que o ácido úrico pode ligar-se diretamente e irreversivelmente ao NO•, formando 6-aminouracil (Gersch et. al.,

2008), o que reduz as concentrações tanto de ácido úrico, quanto de $\text{NO}^\bullet$. O ácido úrico é responsável por cerca 60% da resposta antioxidante total do plasma (Benzie & Strain 1996), e o fato de a suplementação com nitrato poder aumentar os níveis $\text{NO}^\bullet$ pode ter relação com a redução nas concentrações de ácido úrico, e consequentemente, na atividade antioxidante total. De acordo com Gersh et. al. (2008) a reação do ácido úrico com o $\text{NO}^\bullet$ pode ser parcialmente bloqueada pela glutathione. Entretanto devido à redução da atividade da catalase pode ser que a produção de H_2O_2 tenha aumentado assim como o consumo de glutathione, uma vez que esta é oxidada no processo de metabolização do H_2O_2 . Dessa forma, os níveis de glutathione não teriam sido eficientes para bloquear a reação entre o ácido úrico com o $\text{NO}^\bullet$.

Em relação a PA ao VO_2 pico e ao desempenho no teste não foram observadas alterações após a suplementação. No que se refere à PA nossos dados corroboram os achados de Miller et. al. (2012), que não observaram redução na PA após três dias de suplementação em idosos saudáveis. De acordo com os autores, a não redução da PA após a suplementação pode ser devida à variabilidade na mensuração da PA e ao tamanho reduzido da amostra ($n=8$). Outro fato interessante é que apesar de a suplementação aguda proporcionar aumento dos níveis plasmáticos de nitrito, comparada ao placebo, a elevação foi consideravelmente menor, quando comparada a outros estudos (Bescós et. al., 2011; Miller et. al., 2012). Bescós et. al. (2012) reportaram que a menor capacidade em aumentar o nitrito plasmático após a ingestão de nitrato pode estar relacionada a modificações na microflora da cavidade oral, onde o nitrato é convertido à nitrito, ou ao uso de produtos bucais antibacterianos. Pode ser que o aumento nas concentrações plasmáticas de nitrito não tenha sido suficiente para gerar respostas adaptativas na PA, assim como no VO_2 pico e no desempenho no teste físico.

Assim, os resultados encontrados no presente estudo apontam para um possível efeito pró-oxidante da suplementação com nitrato de sódio, apesar de não ter sido encontrado diferença significativa na peroxidação lipídica. Pode ser que a longo prazo, a inibição da atividade da catalase juntamente com a redução nos níveis de ácido úrico tenha efeitos deletérios para o organismo, devido à redução nas defesas antioxidantes, refletindo em desbalanço redox e dano

oxidativo. Além disso, nos achados questionam a utilização desse tipo de suplementação para melhora do desempenho de homens jovens fisicamente ativos em teste incremental até a exaustão.

Conclusões

Concluindo, a suplementação aguda com nitrato de sódio inibiu a atividade da catalase e não promoveu alterações tanto na atividade antioxidante total, quanto na peroxidação lipídica de homens jovens saudáveis, submetidos a um teste máximo em cicloergômetro, sugerindo um possível efeito pró-oxidante. Além disso, agudamente, o nitrato de sódio não promoveu alterações no VO_2 pico e na pressão arterial, bem como no desempenho em teste máximo. Outros estudos se fazem necessários no intuito de elucidar os mecanismos de ação pelos quais o NO^{2-} e $\text{NO}^\bullet$ podem gerar dano oxidativo e investigar o efeito da suplementação crônica nos marcadores discutidos por nós e em outros indicadores de desbalanço redox. Antes disso, a utilização desse tipo de suplementação para melhora do desempenho físico deve ser vista com cautela.

Referências

1. AEBI, H. E. Catalase. Methods in enzymatic analysis. Basel: Verlag Chemie; 1984. p. 273– 86.
2. AGUILÓ, A.; TAULER, P.; FUENTESPINA, E.; TUR, J.A.; CÓRDOVA, A.; PONS, A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav.* 2005 Jan 31;84(1):1-7.
3. BAILEY, S.J.; WINYARD, P.; VANHATALO, A.; BLACKWELL, J.R.; DIMENNA, F.J.; WILKERSON, D.P.; TARR, J.; BENJAMIN, N.; JONES, A.M. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. *J Appl Physiol.* 2009 Oct;107(4):1144-55.
4. BENZIE, I.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr.* 1996 May;47(3):233-61.
5. BENZIE, I.F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996 Jul 15;239(1):70-6
6. BERZOSA, C.; CEBRIÁN, I.; FUENTES-BROTO, L.; GÓMEZ-TRULLÉN, E.; PIEDRAFITA, E.; MARTÍNEZ-BALLARÍN, E.; LÓPEZ-PINGARRÓN, L.; REITER, R.J.; GARCÍA, J. J. Acute exercise increases plasma total antioxidant status and antioxidant enzyme activities in untrained men. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:540458.
7. BESCÓS, R.; RODRÍGUEZ, F.A.; IGLESIAS, X.; FERRER, M.D.; IBORRA, E.; PONS, A. Acute administration of inorganic nitrate reduces VO(2peak) in endurance athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2011 Oct;43(10):1979-86.

8. BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A.H.; WIDEMAN, L.; MCKENZIE, M. J., CONSITT, L.A. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res*. 2005 May; 19(2):276-85.
9. BLOOMER, R.J.; FALVO, M.J.; FRY, A.C.; SCHILLING, B.K.; SMITH, W.A.; MOORE, C. A. Oxidative stress response in trained men following repeated squats or sprints. *Med Sci Sports Exerc*. 2006 Aug;38(8):1436-42.
10. BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A. H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can J Appl Physiol*. 2004 Jun;29(3):245-63.
11. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
12. BROWN, G. C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem*. 1995 Aug 15;232(1):188-91.
13. CARNOVALE, C.E.; RONCO, M.T. Role of nitric oxide in liver regeneration. *Ann Hepatol*. 2012 Sep-Oct;11(5):636-47.
14. FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R.J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*. 2009 Jan 13;8:1.
15. GARBER, C.E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M.R.; FRANKLIN, B.A.; LAMONTE, M.J.; LEE, I.M.; NIEMAN, D.C.; SWAIN, D.P.; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2011 Jul;43(7):1334-59.

16. GERSCH, C.; PALII, S.P.; KIM, K.M.; ANGERHOFER, A.; JOHNSON, R.J.; HENDERSON, G.N.
17. GIUSTARINI, D.; ROSSI, R.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods Enzymol.* 2008;440:361-80.
18. GROUSSARD, C.; RANNOU-BEKONO, F.; MACHEFER, G.; CHEVANNE, M.; VINCENT, S.; SERGENT, O.; CILLARD, J.; GRATAS-DELAMARCHE, A. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise.
19. HINKLE, P.C. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jan 7;1706(1-2):1-11.
20. JI, L.L.; FU, R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol.* 1992 Feb;72(2):549-54.
21. LANSLEY, K.E.; WINYARD, P.G.; BAILEY, S.J.; VANHATALO, A.; WILKERSON, D.P.; BLACKWELL, J.R.; GILCHRIST, M.; BENJAMIN, N.; JONES, A.M. Acute dietary nitrate supplementation improves cycling time trial performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2011 Jun;43(6):1125-31.
22. LARSEN, F.J.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.O.; EKBLOM, B. Dietary nitrate reduces maximal oxygen consumption while maintaining work performance in maximal exercise. *Free Radic Biol Med.* 2010 Jan 15;48(2):342.
23. LEAF, D.A.; KLEINMAN, M.T.; HAMILTON, M.; BARSTOW, T.J. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med Sci Sports Exerc.* 1997 Aug;29(8):1036-9.
24. MILLER, G.D.; MARSH, A.P.; DOVE, R.W.; BEAVERS, D.; PRESLEY, T.; HELMS, C.; BECHTOLD, E.; KING, S.B.; KIM-SHAPIRO, D.

Plasma nitrate and nitrite are increased by a high-nitrate supplement but not by high-nitrate foods in older adults. *Nutr Res.* 2012 Mar;32(3):160-8.

25. NOAKES, T. D. *Lore of running*. 4ed. Human Kinetics, 2004. 931p.

26. NOJIMA, H.; WATANABE, H.; YAMANE, K.; KITAHARA, Y.; SEKIKAWA, K.; YAMAMOTO, H.; YOKOYAMA, A.; INAMIZU, T.; ASAHARA, T.; KOHNO, N. Effect of aerobic exercise training on oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2008 Feb;57(2):170-6.

27. POPOVIC, L.M.; MITIC, N.R.; RADIC, I.; MIRIC, D.; KISIC, B.; KRDZIC, B.; DJOKIC, T. The effect of exhaustive exercise on oxidative stress generation and antioxidant defense in guinea pigs. *Adv Clin Exp Med.* 2012 May-Jun;21(3):313-20.

28. POWERS, S.K.; JACKSON, M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008 Oct;88(4):1243-76.

29. POWERS, S.K.; NELSON, W.B.; HUDSON, M. B. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med.* 2011 Sep 1; 51(5):942-50.

30. SENTÜRK, U.K.; GÜNDÜZ, F.; KURU, O.; AKTEKIN, M.R.; KIPMEN, D.; YALÇIN, O.; BOR-KÜÇÜKATAY, M.; YEŞİLKAYA, A.; BAŞKURT, O. K. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. *J Appl Physiol.* 2001 Nov;91(5):1999-2004.

31. SCHAUN, M. I.; DIPP, T.; ROSSATO, J. D. A. S.; WILHELM, E.N.; PINTO, R.; RECH, A.; PLENTZ, R.D.; HOMEM DE BITTENCOURT, P.I., REISCHAK-OLIVEIRA, A. The effects of periodized concurrent and aerobic training on oxidative stress parameters, endothelial function and immune response in

sedentary male individuals of middle age. *Cell Biochem Funct.* 2011 Oct;29(7):534-42

32. STEGMANN,H.; KINDERMANN,W.; AND SCHNABEL,A. Lactate kinetics and individual anaerobic threshold. *Int J Sports Med.* 1981 Aug;2(3):160-5.

33. SYU, G.D.; CHEN, H.I.; JEN, C. J. Severe exercise and exercise training exert opposite effects on human neutrophil apoptosis via altering the redox status. *PLoS One.* 2011;6(9):e24385.

34. TERBLANCHE, S.E. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. *Cell Biol Int.* 2000;23(11):749-53.

35. TOZZI-CIANCARELLI, M.G.; PENCO, M.; DI MASSIMO, C. Influence of acute exercise on human platelet responsiveness: possible involvement of exercise-induced oxidative stress. *Eur J Appl Physiol.* 2002 Jan;86(3):266-72.

36. VINCENT, H.K.; MORGAN. J.W.; VINCENT, K.R. Obesity exacerbates oxidative stress levels after acute exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2004 May;36(5):772-9.

Legendas

Tabela 1.

Dados antropométricos dos voluntários. Dados expressos como média $\pm$ DP. *Diferenças significativas (Teste *t de Student* pareado, $P < 0.05$). Placebo e Nitrato foram administrados a 10 mg.kg^{-1} de peso corporal; $n=12$.

Tabela 2.

Pressão arterial sistólica e diastólica de indivíduos do grupo placebo (NaCl) ou Nitrato (NaNO_3) no pré e pós-teste, VO_2 pico, potência máxima, distância percorrida pós-teste e FC pré e pós teste. Dados expressos como média $\pm$ DP. *Diferenças significativas (Teste *t de Student* pareado, $P < 0.05$). Placebo e Nitrato foram administrados a 10 mg.kg^{-1} de peso corporal; $n=12$.

Figura 1. Concentrações plasmáticas de nitrito do grupo Placebo (NaCl) e Nitrato (NaNO_3), após três horas de suplementação (pré-teste) e depois do teste de esforço máximo em cicloergômetro (pós-teste). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) da média. * Diferenças significativas (Teste *t de Student* pareado, $P < 0.05$). Placebo e Nitrato foram administrados a 10 mg.kg^{-1} de peso corporal; $n=12$.

Figura 2. Avaliação da atividade da catalase em hemolisado de indivíduos do grupo Placebo (NaCl) ou Nitrato (NaNO_3), após três horas de suplementação (pré-teste) e depois do teste de esforço máximo em cicloergômetro (pós-teste). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) da média. *Diferenças significativas (Teste *t de Student* pareado, $P < 0.05$). Placebo e Nitrato foram administrados a 10 mg.kg^{-1} de peso corporal; $n=12$.

Figura 3. Avaliação da atividade antioxidante total do plasma de indivíduos do grupo Placebo (NaCl) ou Nitrato (NaNO_3), após três horas de suplementação (pré-teste) e depois do teste de esforço máximo em cicloergômetro (pós-teste). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) da média. *Diferenças significativas (Teste *t de Student* pareado, $P < 0.05$). Placebo e Nitrato foram administrados a 10 mg.kg^{-1} de peso corporal; $n=12$.

Figura 4. Concentração de TBARS no plasma de indivíduos do grupo Placebo (NaCl) ou Nitrato (NaNO_3), após três horas de suplementação (pré-teste) e depois do teste de esforço máximo em cicloergômetro (pós-teste). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) da média. *Diferenças significativas (Teste *t de Student* pareado, $P < 0.05$). Placebo e Nitrato foram administrados a 10 mg.kg^{-1} de peso corporal; $n=12$.

Figura 5. Razão potência máxima/ $\text{VO}_{2\text{pico}}$ de indivíduos do grupo Placebo (NaCl) ou Nitrato (NaNO_3), depois do teste de esforço máximo em cicloergômetro (pós-teste). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) da média. *Diferenças significativas (Teste *t de Student* pareado, $P < 0.05$). Placebo e Nitrato foram administrados a 10 mg.kg^{-1} de peso corporal; $n=12$.

Tabela e Figuras

Tabela 1

Idade	23,6±3,39
Altura (m)	1,78±0,07
Peso corporal (kg)	72,86±10,14
Percentual de gordura	12,31±3,53
Massa magra (kg)	61,04±7,67

Tabela 2

	Placebo pré-exercício	Placebo pós-exercício	NaNo3 pré-exercício	NaNo3 pós-exercício
Pressão Sistólica (mmHg)	117,8±8,02	125,5±13,78	120,3±6,97	120,5±13,86
Pressão Diastólica (mmHg)	81,17±11,86	58,83±9,08	81,00±9,20	58,5±9,8
VO ₂ pico (ml . Kg ⁻¹ . m ⁻¹)	-	48,90±6,413	-	47,05±6,484
Potência (watts)	-	283,1±44,37	-	283,1±35,97
Distância (m)	-	7,52±1,32	-	7,58±1,27
FC (bpm)	70,92±11,84	115,3±10,67	74,25±12,66	115,6±11,54

Figura 1

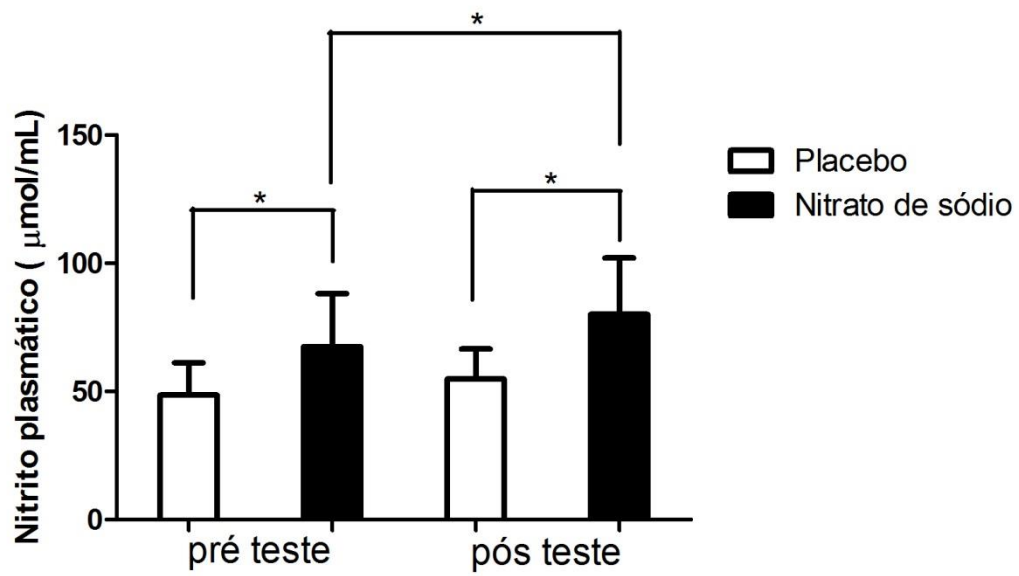


Figura 2

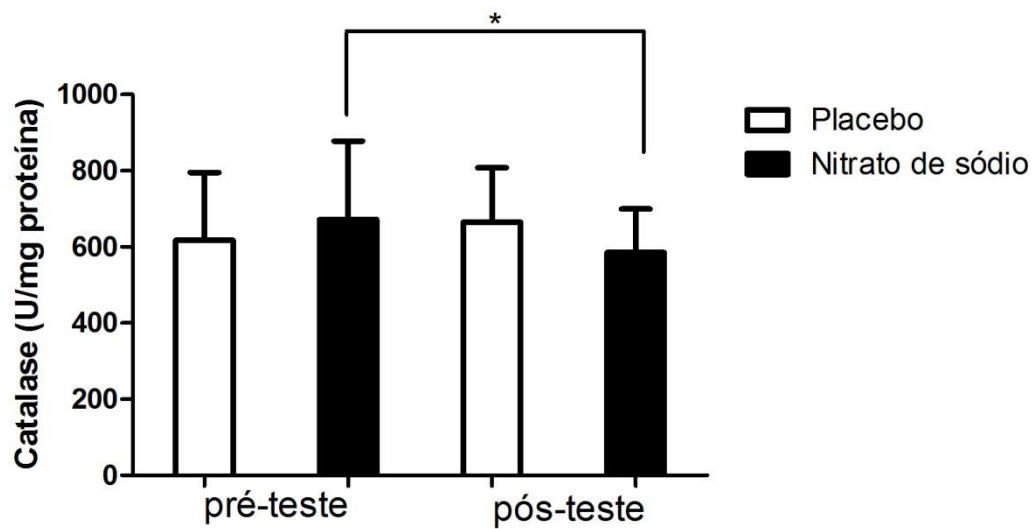


Figura 3

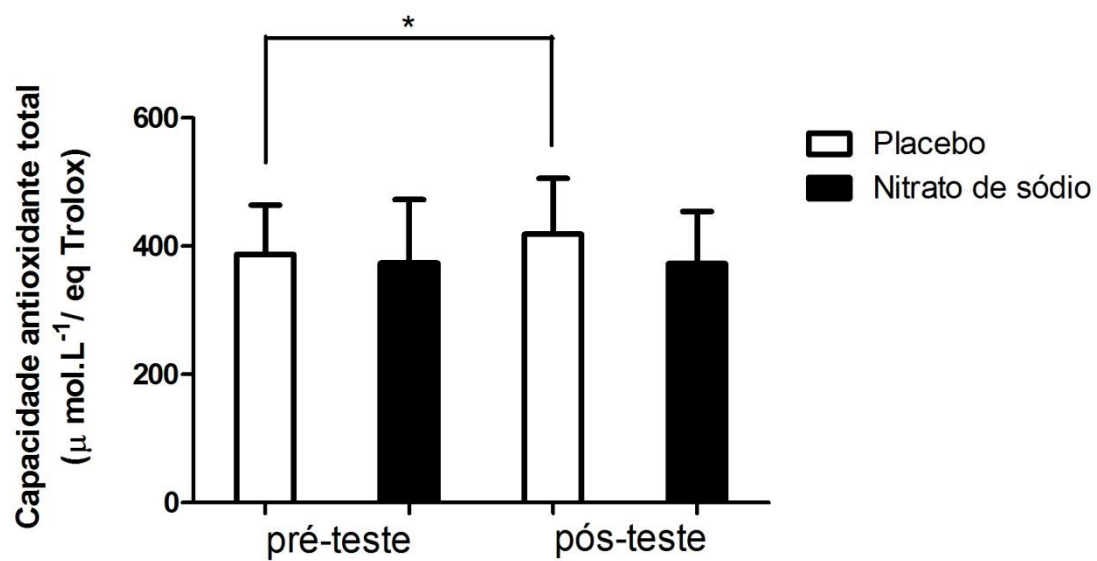


Figura 4

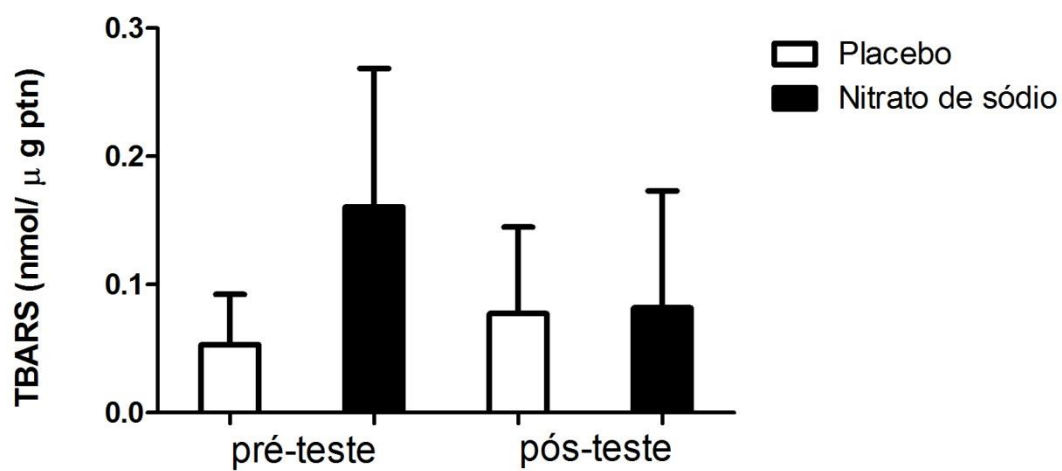
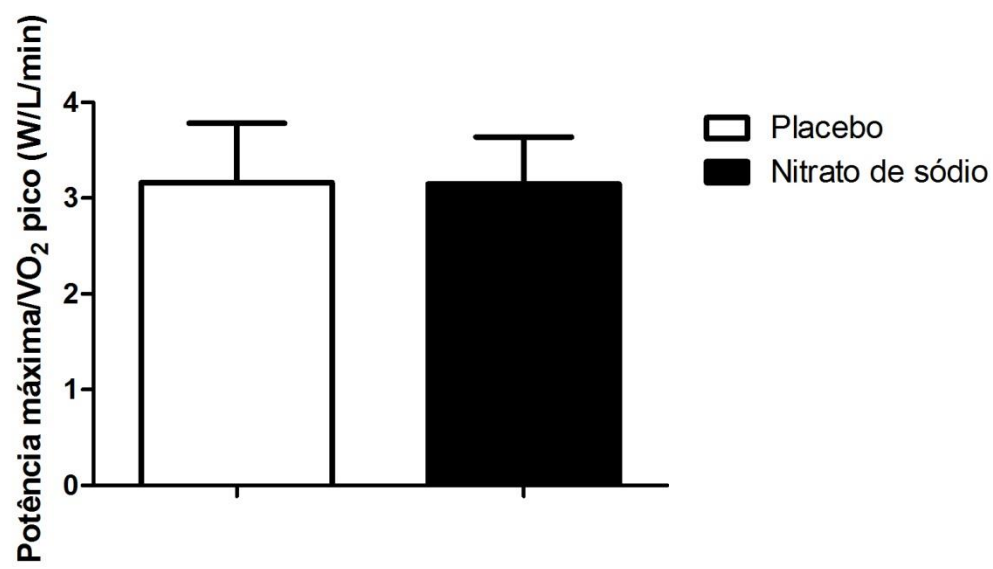


Figura 5



Anexos

Anexo I- Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM NITRATO NAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E SALIVARES DE ÓXIDO NÍTRICO EM SUJEITOS FISICAMENTE ATIVOS APÓS UM TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO

Pesquisador: Foued Salmen Espindola

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 07412112.3.0000.5152

Instituição Proponente: Instituto de Genética e Bioquímica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 306.988

Data da Relatoria: 22/03/2013

Apresentação do Projeto:

Estudo de caráter experimental no qual será testada a hipótese de que o nitrito salivar correlaciona-se com o nitrito plasmático após uma sessão aguda de exercício, com e sem suplementação com nitrato de sódio.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar se a concentração de nitrito salivar reflete o comportamento do nitrito plasmático em resposta ao exercício.

Secundário: Comparar a dinâmica de NO na saliva e no sangue para validar o NO salivar como marcador de intensidade e verificar se a suplementação com nitrato de sódio altera a concentração de nitrito salivar em resposta ao exercício.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Riscos: Com relação ao teste físico agudo, não há relatos na literatura sobre eventuais problemas físicos ou psíquicos, durante ou após os testes. Embora a probabilidade destas lesões ocorrerem sejam mínimas, acreditamos que estes podem sofrer lesões musculares de grau 1 ou 2 devido aos

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 306.988

esforços máximos que serão submetidos durante os testes físicos.

Benefícios: Os voluntários que serão suplementados terão o benefício de melhorar o desempenho e a recuperação após as atividades que requeiram grandes esforços físicos, pois, nesta situação, ocorrem alterações metabólicas e energéticas que poderão ser aliviadas pelos suplementos. Além disso, todos os voluntários passarão por uma avaliação antropométrica, o que lhes fornecerá dados sobre a sua composição corporal que podem ser úteis como parâmetros de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa interessante, bem delineada, possibilitando facilidade quanto à utilização da saliva como fluido para diagnóstico durante a intervenção física; a utilização da saliva como fluido para diagnóstico durante a intervenção física é uma alternativa para acompanhar as alterações ocasionadas pelo exercício tanto em períodos curtos como no decorrer de toda a atividade, oferecendo vantagens em relação ao sangue, uma vez que apresenta coleta simples e não invasiva.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pendência apontada no parecer 192.589 foi atendida.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: janeiro de 2014.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 306.988

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

¿ O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

¿ O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

¿ O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária ¿ ANVISA ¿ junto com seu posicionamento.

¿ Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Anexo II

– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar da pesquisa **“Efeitos da suplementação aguda com nitrato de sódio no balanço redox, na pressão arterial, no VO_2 pico e no desempenho de homens fisicamente ativos durante exercício máximo”**, sob a responsabilidade dos pesquisadores, Prof^a. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, Erickson Messias Bezerra dos Santos, Maria Carolina Siqueira, Miguel Maurício Díaz Gómez, Renata Roland Teixeira e Olga Lucia Bocanegra Jaramillo.

Você realizará dois testes incrementais em cicloergômetro até a exaustão voluntária, com rotação constante de 90 rotações por minuto e incrementos de 45 watts a cada dois minutos, três horas após a ingestão de duas bebidas diferentes, uma em cada dia de teste. No período entre a ingestão da bebida e a realização dos testes é aconselhado que você permaneça em repouso e não faça ingestão de nenhum tipo de alimento ou bebida, a não ser água para garantir um estado de hidratação adequado. É recomendada uma dieta restrita em alimentos contendo nitrato (vegetais verdes, beterraba, morango, uva, chá e carnes vermelhas) 48 horas antes da realização dos testes. Além disso, você deve evitar o consumo de álcool, de produtos à base de cafeína e de suplementos dietéticos. Os testes serão separados por um período de 96 horas.

Serão realizadas três visitas, sendo uma no Laboratório de Fisiologia do Desempenho (LAFID) localizado na Faculdade de Educação Física da Universidade Federal de Uberlândia, e as outras duas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI), localizado no bloco 2E do Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia. Na primeira visita será realizada uma avaliação da composição corporal por bioimpedância familiarização com o cicloergômetro, com o analisador de e com o protocolo de testes. As duas visitas seguintes, serão para a realização dos testes físicos, executados em condições idênticas (22°C), sempre no período da manhã (das 9 às 10:30). Para a realização dos testes é necessário que você não pratique nenhum tipo de atividade física vigorosa por um período de 48 horas pré-teste.

Será coletado sangue antes de iniciar o teste e cinco minutos após o término do teste. Nestes mesmos tempos e também ao final do teste será aferida a pressão arterial. A frequência cardíaca será monitorada desde antes do início do teste até cinco minutos após sua finalização. O consumo de oxigênio será avaliado durante todo o teste, por meio de um analisador de gases.

O procedimento da coleta de sangue será realizado pela Dra. Renata Roland Teixeira, técnica do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, graduada em Ciências Biológicas e técnica em análises clínicas, pela Universidade Federal de Uberlândia, com experiência nesse tipo de procedimento. O sangue será coletado por punção venosa e será analisado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (LABIBI/UFU). Serão realizadas em cada visita três coletas de sangue, sendo coletado um volume de 5 ml em cada coleta.

Em relação aos riscos proporcionados pelo teste físico e pela suplementação, não há relatos na literatura sobre eventuais problemas físicos psicológicos ou estomacais durante ou após os testes. Em caso de mal estar, ou algum problema físico, o teste será imediatamente interrompido e você será encaminhado para o hospital mais próximo.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá perda ou ganho financeiro por participar desta pesquisa. O benefício previsto é a possibilidade de uma avaliação física e cardiológica, fornecida em uma devolutiva ao final do estudo.

Você é livre para desistir de participar da pesquisa a qualquer momento sem lhe causar prejuízo. Uma cópia deste termo de consentimento Livre e Esclarecimento ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa você poderá entrar em contato com os pesquisadores no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da

Universidade Federal de Uberlândia, localizado na Av Pará, nº 1720 Bloco E sala 39a, Campus Umuarama, Uberlândia – MG, CEP: 38400-902, telefone: (34) 3218-2477, e com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, localizado na Av. João Naves de Ávila, nº 2121 Bloco 1A, sala 224, Campus Santa Mônica, Uberlândia – MG, CEP: 38408-100, telefone: (34) 3239-4131.

De acordo,

Uberlândia, _____ de _____ de 200__.

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa - RG: _____

Anexo III – Imagens do teste e do analisador de gases



