

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas -Bioquímica

Márcio Martins Silveira

Comparação de parâmetros de dano oxidativo em atletas profissionais de voleibol de quadra, jogadores de vôlei de praia e indivíduos não treinados, quando submetidos a exercício em cicloergômetro

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Orientador: José Cláudio Fonseca Moreira

Porto Alegre

2004

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas -Bioquímica

Comparação de parâmetros de dano oxidativo em atletas profissionais de voleibol de quadra, jogadores de vôlei de praia e indivíduos não treinados, quando submetidos a exercício em cicloergômetro

MÁRCIO MARTINS SILVEIRA
mmsesef@terra.com.br

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

*“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará
assim uma máquina utilizável e não uma
personalidade. É necessário que adquira um sentimento,
um senso prático daquilo que vale a pena ser
empreendido daquilo que é belo, do que é moralmente
correto”*

(Albert Einstein)

*“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito
um se chama ONTEM e outro AMANHÃ
portanto HOJE é o dia certo para AMAR, ACREDITAR, FAZER e principalmente
VIVER “.*

(Dalai Lama)

SUMÁRIO

<u>AGRADECIMENTOS</u>	8
<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	10
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	11
<u>LISTA DE TABELAS</u>	12
<u>RESUMO</u>	13
<u>ABSTRACT</u>	17
<u>INTRODUÇÃO</u>	20
<u>1- REVISÃO DE LITERATURA</u>	22
<u>1.1 - FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO</u>	22
<u>1.2 - ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO</u>	24
<u>1.3 - RADICAIS LIVRES E EXERCÍCIO</u>	28
<u>1.4 - ESTRESSE OXIDATIVO</u>	32
<u>1.5 - SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO</u>	34
<u>1.5.1 - Catalase (CAT)</u>	34
<u>1.5.2 - Superóxido Dismutase (SOD)</u>	35
<u>1.5.3 - Outras Enzimas Com Papel Antioxidante</u>	35
<u>1.6 - SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICO</u>	36
<u>1.6.1 - Ácido Úrico (AU)</u>	37
<u>1.6.2 - Compostos Fenólicos</u>	38
<u>1.7 - LIPOPEROXIDAÇÃO E EXERCÍCIO</u>	40
<u>1.8 - DANO OXIDATIVO A PROTEÍNAS</u>	43
<u>1.9 - MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE DURANTE EXERCÍCIO AGUDO</u>	44
<u>1.10 ADAPTAÇÕES AO EXERCÍCIO</u>	47
<u>1.10.1 No exercício agudo</u>	47
<u>1.10.2 No exercício crônico/treinamento</u>	47
<u>1.11- VOLEIBOL</u>	50
<u>2- OBJETIVOS</u>	53
<u>2.1- OBJETIVO GERAL</u>	53
<u>2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	54
<u>3-PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</u>	55
<u>3.1- DELINEAMENTO DA PESQUISA</u>	55
<u>3.1.1 - População e Amostra</u>	55
<u>3.2- SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL</u>	56
<u>3.9- GRUPO EXPERIMENTAL</u>	56
<u>3.3 - TESTE NO CICLOERGÔMETRO</u>	62
<u>3.3.2 – Familiarização</u>	62
<u>3.3.3 - Teste máximo</u>	62
<u>3.3.4 - Determinação dos limiares ventilatóios</u>	63
<u>3.4 - TESTE MÁXIMO PROGRESSIVO</u>	66
<u>3.5- DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DO EXERCÍCIO</u>	67

3.6-TESTE AERÓBIO SUBMÁXIMO	67
3.7 - TESTE ANAERÓBIO	69
3.8- COLETA DA AMOSTRA SANGÜÍNEA	70
4-RESULTADOS:	71
4.1-ARTIGO I	71
<u>COMPARISON OF OXIDATIVE PARAMETERS BETWEEN PROFESSIONALS INDOOR VOLLEYBALL PLAYERS AND UNTRAINED SUBJECTS AFTER WINGATE TEST</u>	71
<u>ABSTRACT</u>	71
<u>INTRODUCTION</u>	72
<u>MATERIALS AND METHODS</u>	73
<u>Subjects</u>	73
<u>Experimental procedure</u>	74
<u>Blood samples</u>	74
<u>Analysis of malondialdehyde (MDA)</u>	75
<u>Analysis of protein carbonyls</u>	75
<u>Analysis of catalase (CAT) activity</u>	75
<u>Analysis of uric acid (UA) concentration</u>	76
<u>Analysis of plasma polyphenols</u>	76
<u>Analysis of plasma total reactive antioxidant potential (TRAP)</u>	76
<u>Statistical Analyses</u>	76
<u>RESULTS</u>	77
<u>DISCUSSION</u>	78
<u>REFERENCES</u>	84
4.2-ARTIGO II	93
<u>THE EFFECT OF ACUTE ANAEROBIC AND AEROBIC EXERCISES ON OXIDATIVE DAMAGE AND PROTECTION SYSTEMS IN BEACH VOLLEY PLAYERS AND UNTRAINED SUBJECTS</u> ...	93
<u>ABSTRACT</u>	93
<u>INTRODUCTION</u>	94
<u>MATERIALS AND METHODS</u>	96
<u>Subjects</u>	96
<u>Experimental procedure</u>	96
<u>Exercise protocolo</u>	97
<u>Blood samples</u>	97
<u>Analysis of malondialdehyde (MDA)</u>	98
<u>Analysis of protein carbonyls</u>	98
<u>Analysis of catalase (CAT) activity</u>	98
<u>Analysis of uric acid (UA) concentration</u>	99
<u>Analysis of plasma polyphenols</u>	99
<u>Statistics analysis</u>	99
<u>RESULTS</u>	100
<u>DISCUSSION</u>	101
<u>REFERENCES</u>	106
5-DISCUSSÃO.....	115
7- PERSPECTIVAS.....	125
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	126
<u>ANEXOS</u>	143

ANEXO 1 TERMO DE CONSENTIMENTO	144
ANEXO 2- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	147
ANEXO 3- PAR-Q: QUESTIONÁRIO SOBRE PRONTIDÃO PARA ATIVIDADE FÍSICA	149
ANEXO 4- RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 3 DIAS	151
ANEXO 5- QUESTIONÁRIO DE ATIVIDADES FÍSICAS	160
ANEXO 6-VALORES PERCENTIS PARA POTÊNCIA AERÓBIA MÁXIMA	162
ANEXO 7-CONVERSÃO DE PESO EM WATTS	164

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais por todo o amor, apoio, respeito, educação, exemplo de luta, financiamentos e confiança durante todos estes anos;
- Ao professor, Dr. José Cláudio Fonseca Moreira por toda a ajuda, ensinamentos e esclarecimentos, e quem considero um grande professor e amigo;
- Ao professor, Dr. Alvaro Reischak de Oliveira, por dar toda a atenção necessária, assim como me colocando no caminho da pesquisa científica, sempre disposto a ajudar;
- A professora, Dra. Regina Guaragna, por todo o conhecimento passado, ajuda e incentivo oferecidos, assim como pelas muitas oportunidades,
- Ao meu grande amor por toda a força e apoio que me deu, para que eu pudesse realizar este trabalho;
- A colega e amiga Ana Paula, por toda a ajuda que me deu durante a elaboração e desenvolvimento desse estudo, preparo das dietas e assim como por todo o companheirismo e troca de idéias;
- A colega e amiga Caroline por tudo. Pela ajuda, pelas risadas, pelas conversas e desabafos;
- Ao amigo e colega Clayton, por toda ajuda nesse estudo na realização dos testes;
- A colega Roberta pela ajuda, elaboração das dietas e troca de informações;

- A todos os voluntários, que literalmente deram seu sangue pela ciência, para que com esse estudo pudéssemos dar um passo a mais para o entendimento dos efeitos do exercício em nosso organismo,
- Aos funcionários do LAPEX-EsEF/UFRGS, Alex, Luciano, Carla, Luíz, Márcia, Dani;
- Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação-Bioquímica, Cléia e Regina, por toda ajuda;
- Aos colegas do Laboratório 25 da Bioquímica (Manuela, Fernanda, Martina, Mário, Evandro, Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol, ao Prof. Dr. Fábio Klamt, Ricardo Pinho, Guilherme, Michael, Amâncio, Marcos, Ramatis, Alfeu) e também aos colegas da sala 212 do LAPEX, por toda a paciência, ajuda e conhecimento transmitido;
- Ao colega Tiago, por toda a ajuda na estatística,
- Aos colegas de faculdade, e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o engrandecimento do meu conhecimento, da minha cultura, e principalmente por acreditarem em mim.
- Ao Sport Clube ULBRA, por ceder os atletas,

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
AGPI	Ácidos graxos poli insaturados
RNA	Ácido ribonucléico
AU	Ácido úrico
O₂^{•-}	Ânion superóxido
TRAP	Potencial antioxidante total não enzimático
CAT	Catalase
VO₂máx.	Consumo máximo de oxigênio
CP	Creatina fosfato
VE/VCO₂	Custo ventilatório de gas carbônico
VE/VO₂	Cústo ventilatório de oxigênio
GSSG	Dissulfeto de glutaciona
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EO	Estresse oxidativo
FC	Freqüência cardíaca
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
LDH	Lactato desidrogenase
MDA	Malondialdeído
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
VCO₂	Produção de gás carbônico
QR	Quociente respiratório
RL	Radical livre
RER	Taxa de troca respiratória

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fenólicos, a maior classe de antioxidantes da dieta e parte do amplo grupo de polifenóis encontrados nas plantas.....	40
Figura 2 - Ventilação em relação ao consumo de oxigênio.....	64
Figura 3 - Equivalentes ventilatorios do oxigênio e do dióxido de carbono em relação ao consumo de oxigênio.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais tipos de radicais e não radicais	30
---	----

RESUMO

Radical livre é qualquer substância, átomo ou molécula capaz de existir independente, e que possua elétrons desemparelhados em seu último orbital energético. Uma vez formados, começam uma série de reações, podendo levar a danos em biomoléculas (lipídeos, proteínas e também o DNA).

Os radicais livres podem ser gerados, entre outras formas, pelo exercício físico aeróbio, que eleva o consumo de oxigênio (VO_2) entre 10-15 vezes mais que em situação de repouso, essa elevação induz uma maior atividade mitocondrial, onde aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na mitocôndria, como receptor de elétrons, é liberado na forma de superóxido. Porém, especula-se que as espécies reativas de oxigênio, são geradas no exercício anaeróbio por um aumento na atividade da xantina oxidase, pela liberação de prótons, provocada pela acidose láctica (que em estudos *in vitro*, mostrou ser um potente fator pró-oxidante), por uma atividade aumentada da óxido nítrico sintase, pela autooxidação de catecolaminas, pela síndrome de isquemia/reperfusão, entre outras fontes.

O organismo, para se proteger desses danos oxidativos, possui dois tipos de proteção antioxidante, a enzimática: como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase, e o sistema antioxidante não-enzimático, onde, podemos citar dentro de uma vasta lista: ácido úrico, vitaminas E, A e C, bilirrubina, albumina e compostos fenólicos, entre outros.

O treinamento físico induz adaptações antioxidante ao organismo dos indivíduos, onde os sujeitos são expostos cronicamente a condição de estresse oxidativo, que é onde a formação de espécies reativas de oxigênio é maior que a capacidade protetora, e isto faz com que ocorra um aumento na atividade ou conteúdo dos antioxidantes, ou então que a produção desses oxidantes seja menor.

Com isso, o objetivo desse estudo foi comparar o estresse oxidativo induzido pelo exercício, através de aspectos bioquímicos e fisiológicos

comparando atletas profissionais de voleibol de quadra, jogadores de vôlei de praia e indivíduos não treinados.

Todos os sujeitos foram voluntários, do sexo masculino, não fumantes, sem fazer uso de drogas/suplementos/medicamentos, não ingeriram bebidas alcoólicas, assim como também não praticaram atividade física exaustiva 48 h antes dos testes. Os sujeitos executaram um teste máximo de carga progressiva para determinar o consumo máximo de oxigênio, servindo para determinação da carga do teste aeróbio submáximo de 1 hora, que foi igual para todos os voluntários (10% abaixo do segundo limiar ventilatório), além do teste anaeróbio Wingate com 30 segundos de duração. Os indivíduos receberam a prescrição de uma dieta padrão, que se constituiu 100% da RDA para cada indivíduo.

Para observar o *status* antioxidante enzimático foi analisada a atividade da catalase (CAT), como antioxidante não enzimático foram analisados: a concentração de ácido úrico, concentração de compostos fenólicos no plasma, além do potencial antioxidante total não enzimático. Como indicador de lipoperoxidação utilizou-se a mensuração de malondialdeído, através da técnica do TBARS, e a fim de verificar os danos oxidativos a proteínas usamos a técnica da 2,4 dinitrofenil hidrazina.

Como resultados observamos que os atletas de voleibol de quadra são mais altos, possuem massa corporal e massa magra, assim como a potência anaerobia maior que os indivíduos não treinados, não diferindo dos jogadores de vôlei de praia.

Quanto aos parâmetros bioquímicos, no exercício anaeróbio a atividade da enzima catalase, foi significativamente menor nos indivíduos não treinados quando comparados aos atletas de voleibol de quadra logo após o exercício, e não houve diferença nos valores dos jogadores de vôlei de praia.

Não houve diferença significativa na concentração de ácido úrico entre os grupos, porém houve diferença entre os valores de repouso e os 20 min de recuperação.

Na concentração de compostos fenólicos plasmáticos, os jogadores de vôlei de praia tiveram valores superiores aos indivíduos não treinados e aos atletas de voleibol de quadra.

No potencial antioxidante total não enzimático (TRAP), não observamos diferenças significativas.

Nos níveis de lipoperoxidação, analisados pelos níveis de malondialdeído que é um subproduto da peroxidação lipídica, observamos que os atletas de voleibol de quadra apresentaram valores significativamente diminuídos logo após o exercício, quando comparados aos valores de repouso, assim como quando comparados aos valores obtidos nos indivíduos não treinados. Nos jogadores de vôlei de praia não houve diferença significativa.

Os danos oxidativos a proteínas notamos que após o exercício anaeróbio de 30 segundos, houve um aumento significativo nos níveis de carbonilação de proteínas plasmáticas nos indivíduos não treinados quando comparados com valores de repouso e também comparados aos valores dos atletas.

No exercício aeróbio, que foi realizado somente nos grupos de jogadores de vôlei de praia e indivíduos não treinados, no grupo de indivíduos não treinados não encontramos diferenças significativas na atividade da enzima catalase. Porém quando comparamos somente os indivíduos não treinados entre os dois tipos de exercício, encontramos um decréscimo significativo logo após o exercício anaeróbio quando comparado ao exercício aeróbio.

A concentração de ácido úrico foi diminuída no grupo de indivíduos não treinados logo após o exercício de 1 h.

A concentração de compostos fenólicos no plasma os jogadores apresentam níveis maiores aos 20 min de recuperação que os indivíduos não treinados.

Os níveis de lipoperoxidação aumentaram significativamente após o exercício, no grupo de indivíduos não treinados comparados com os valores de repouso, assim como os níveis de carbonilação protéica, que além de apresentar aumento significativo em relação aos valores de repouso, foram maiores que dos jogadores de vôlei de praia logo após o exercício.

Com estes resultados apresentados, podemos concluir que os voluntários que praticam exercício físico regularmente, tanto em caráter competitivo profissional como os atletas de voleibol de quadra, quanto os não profissionais, aqui os jogadores de vôlei de praia, apresentam menores níveis de danos a biomoléculas (lipídeos e proteínas). Os atletas profissionais apresentam maior atividade da enzima antioxidante catalase, após o exercício. Os jogadores de vôlei de praia apresentam concentrações de compostos fenólicos superiores aos demais grupos. Os níveis de ácido úrico plasmáticos foram semelhantes nos 3 grupos estudados, durante o exercício anaeróbico, e um decréscimo após o exercício aeróbico nos indivíduos não treinados. Sugerindo que os indivíduos que praticam exercício regular apresentam estar melhor protegidos contra o estresse oxidativo, provavelmente devido a adaptações induzidas pelo exercício físico/treinamento.

Unitermos: Espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo, voleibol de quadra, vôlei de praia, sujeitos não treinados, enzimas antioxidantes, lipoperoxidação, danos oxidativo a proteína, sistema antioxidante não enzimático.

ABSTRACT

Free radical is any substance, atoms or molecules able to exist independently with unpaired electrons in its last energetic orbital. Once formed, several reactions begin, may leading to damage in biomolecules (lipids, proteins and DNA).

Aerobic exercise can produce free radicals since it rises oxygen consumption (VO_2) 10 to 15 times higher than in resting conditions. This elevation causes a higher mitochondrial activity, and approximately 5% of the oxygen used in mitochondria as electrons receiver is released as superoxide anion. However, speculations shows that oxygen reactive species are generated during anaerobic exercise by a rising in xanthine oxidase activity, due to proton releasing, caused by lactic acidosis (in studies *in vitro*, it seemed to be a strong prooxidante factor), by a higher activity of nitric oxid sintase, by catecolamin autooxidation, by eschemia/reperfusion syndrome, and others.

The body has two kinds of protections againd oxidative damage, the enzymatic: as catalase, superoxide dismutase and glutathiona peroxidase, and nonenzymatic antioxidant system, where we can find: uric acid, vitamins E, A and C, phenolic compounds, bilirrubin, albumin and others.

Physical training leads to antioxidante adaptations as subjects are exposed continuously to oxidative stress, where oxygen reactive species formation is higher than protection capacity. It causes an increase in antioxidants activity or content, or it makes oxidants production lesser.

The purpose of this study was to compare oxidative stress induced by exercise, throught biochemestries and physiological aspects comparing professional idoor volleyball players, beach volley players and untrained subjects.

All subjects were volunteers, male, non smoking. They were not using drug/suplements/medicantion and they did not drink alchoolic neither they practiced exhaustve physical activity 48h before the tests. Subjects executed a maximal test of progressive loads to establish their maximal oxygen consumption. The same test was used to determinate submaximal aerobic 1 hour test workloads

which was the same to all volunteers (10% below second ventilatory threshold), besides Wingate 30seconds anaerobic test. Subjects received a prescription to a pattern diet which was composed by 100% RDI.

Catalase activity (CAT) was analyzed to observe enzymatic antioxidant status. Nonenzymatic antioxidant analyzed were: uric acid concentrations, phenolic compounds concentration in plasma and total nonenzymatic antioxidant potential. Malondialdehyde measuring was used to indicate lipid peroxidation through TBARS tecnic. To verify oxidative damage in protein we used 2,4 dinitrophenylhydrazine tecnic.

Results showed that indoor volleyball athletes are higher, have body mass and lean mass as well as anaerobic power higher than untrained subjects and beach volley players.

Regarding biochemistry parameters, during anaerobic exercise catalase enzyme activity was lesser in untrained subjects when compared to indoor volleyball athletes right after exercise. There were no difference in beach volley players.

There were no significant differences in uric acid concentration between groups. However there was difference between resting values and at 20 minutes recovery.

Beach volley players had higher phenolic compounds levels than untrained subjects and volleyball indoor athletes.

We did not find significant differences in TRAP.

When observed lipid peroxidation levels, analyzed by malondialdehyde levels which is a subproduct of lipid peroxidation, indoor volleyball athletes showed significant lesser values right after exercise when compared to resting values as well as when compared to untrained subjects. There were no significant difference in beach volley players.

Regarding oxidative damage in proteins we observed that after 30 seconds of anaerobic exercise there was a significant rise in protein oxidative damage in untrained subjects when compared to resting values as well as when compared to athletes values.

During aerobic exercise, executed only by both beach volley athletes and untrained we did not find significant differences in catalase enzyme activity. However, when we compared only untrained subjects and the two kinds of exercise, we find a decrease right after anaerobic exercise when compared to aerobic exercise.

Uric acid concentration was lesser in untrained group right after 1 hour of exercise.

Phenolic compounds plasmatic concentration was higher at 20 minutes recovery in playeres than in untrained subjects.

Lipid peroxidation increase after exercise in untrained subjects compared to resting values as well as oxidatiive damage in protein levels, that besides presenting an increase comparing to resting values, they were also higher than beach voley players right after exercise.

Based on our results we can conclude that volunteers who practiced physical exercise regurarly, professional athletes like indoor volleyball players and beach volley athletes who were not professional presented lesser levels of damage in biomolecules (lipids and proteins). Professional athletes showed higher catalase activity, after exercise. Beach volley players presented phenolic compounds concentrations higher than the other groups. Plasmatic uric acid levels were similar in the 3 studied groups during anaerobic exercise, and there was a decrease after aerobic exercise in untrained subjects. It suggests that active individuals are better protected agains oxidative stress, probably due to adaptations induced by physical exercise.

Keywords: oxigen reactive species, oxidative stress, indoor volleyball, beach volley, untrained subjects, atioxidant enzymes, lipid peroxidation, protein oxidative damage, antioxidants nonenzymatic system.

INTRODUÇÃO

A prática da atividade física pela população em geral é importante porque o envelhecimento caracteriza-se pelo declínio progressivo das reservas funcionais de vários sistemas de órgãos, supostamente atenuado pelo exercício físico praticado regularmente. A inatividade e consumo exagerado de alimentos calóricos, fumo e álcool promove um pronunciado declínio do rendimento cardiovascular, massa muscular e força física, lipoproteínas de alta densidade (HDL), metabolismo de triglicerídeos e mudanças negativas na composição corporal (aumento na adiposidade). Por outro lado, varias evidências demonstram que a prática regular de exercícios físicos exerce efeitos benéficos no organismo. Essas evidências relacionam-se com os efeitos do exercício físico sobre o sistema cardiovascular, respiratório e as funções metabólicas, geralmente deterioradas pela inatividade e o envelhecimento. Esses efeitos são geralmente acompanhados de mudanças positivas na composição corporal (diminuição do percentual de gordura) (TESSARI, 2000).

Apesar da atividade física prolongada promover diversos efeitos positivos no organismo do praticante, cogita-se desde o início da década de 1970 que a elevação da demanda energética de tecidos e órgãos do corpo pelo esforço físico estimula, simultaneamente ao aumento do consumo de oxigênio nos mesmos e a formação de espécies químicas tóxicas derivadas do oxigênio. De fato, existem evidências de que o aumento do consumo favorece a maior formação intracelular de intermediários reativos do oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). No

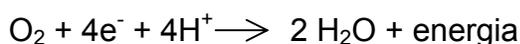
final da década de 1960 foi estimado que para cada 25 moléculas de oxigênio consumidas no metabolismo celular, há formação de uma de superóxido (McCORD & FRIDOVICH, 1969). Além disso, foi calculado que 3 a 5 % do total de oxigênio consumido pelo corpo gera espécies reativas de oxigênio (EROs) (CHANCE *et al.*, 1979).

1- REVISÃO DE LITERATURA

1.1 - FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

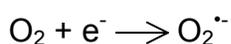
Em razão da sua configuração eletrônica, o oxigênio tem forte tendência a receber um elétron de cada vez. A conversão univalente do oxigênio à água processa-se da seguinte maneira:

Reação 1: redução tetravalente do oxigênio

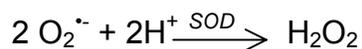


A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera a formação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (reação 2).

Reação 2:

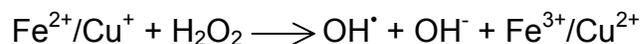


O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através do processo chamado dismutação (PAL, 1994). Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e que acelera a reação a 10⁴ vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico (reação3).

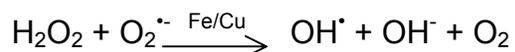
Reação 3:

Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon hidrogênio é formado o radical hidroxil (OH^{\cdot}), que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e assim influenciar enzimas, membranas ou ácidos nucleicos (JENKINS, 1988).

O radical hidroxil pode ser formado quando o H_2O_2 reage com íons ferro ou cobre (reação 4). A reação é conhecida como Reação de Fenton.

Reação 4:

Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre H_2O_2 e superóxido, conduzindo à produção de radical hidroxil (reação 5), a chamada Reação de Haber-Weiss.

Reação 5:

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

oxigênios *singlets*, que são formas de oxigênio spin-alteradas. Esses metabólitos derivados do oxigênio, considerados em conjunto, são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs), em função da sua aumentada reatividade para as biomoléculas (FISCHER, 1987), e em geral alteram o tamanho e a forma dos compostos com os quais eles interagem. Além disso, o radical superóxido pode reagir diretamente com o óxido nítrico (NO), gerando peroxinitrito. Este pode levar à formação de um oxidante com características do radical hidroxil (reação 6).



Cada EROs tem suas próprias características, mostrando diferentes reatividades e tempos de meia-vida (PAL, 1994; DEL MAESTRO, 1980).

1.2 - ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiológicos como envelhecimento, câncer, arteroesclerose, inflamação, ferimentos na mucosa gástrica, doenças cardiovasculares, etc (SANBONGI *et al.*, 1997).

Elétrons de moléculas ou átomos ocupam regiões de espaço conhecidas como orbitais. Cada orbital pode manter no máximo dois elétrons. Por exemplo, dois elétrons que formam uma ligação covalente ocupam o mesmo orbital

(molecular), mas tem *spins* opostos. Se um orbital conter somente um elétron, esse elétron é dito ser desemparelhado. Um radical livre é definido como uma espécie capaz de existir independente, por se difundir pelo sistema (por isso o termo livre) que contém um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL, 1992). O elétron não pareado no orbital mais externo confere uma reatividade relativamente alta à molécula devido à forte tendência a adquirir o segundo elétron no orbital (BOVERIS, 1998). Essa definição ampla inclui uma extensa lista de compostos (HALLIWELL, 1992, BOVERIS, 1998). Radicais livres são quimicamente escritos pela representação da espécie química seguida por um ponto (*) que indica um elétron não pareado (PRYOR, 1973; BOVERIS, 1998). Classicamente, as reações dos radicais livres são divididas em: Reações de iniciação, Reações de propagação, Reações de finalização (término).

Nas reações de iniciação um radical livre é formado por uma espécie química não estável ($AB + C \Rightarrow A^{\bullet} + D + E$). Na fase de propagação, reage com uma molécula estável, gerando um radical livre diferente ($A^{\bullet} + CD \Rightarrow AC + D^{\bullet}$). E nas reações de finalização, dois radicais livres eliminam seus elétrons não pareados formando um produto estável ($A^{\bullet} + B^{\bullet} \Rightarrow A-B$). A reatividade química do radical livre é determinada pelo número total de elétrons desemparelhados; conseqüentemente, a reatividade varia muito em diferentes radicais livres (BOVERIS, 1998).

A cadeia de transporte de elétrons responsabiliza-se por mais de 90% do oxigênio total que consumimos, e todas outras reações no corpo que requerem oxigênio dispõem de apenas 5-10%. Na cadeia de transporte de elétrons o oxigênio é o aceptor final de elétrons do NADH e do FADH₂ que são derivados da oxidação de fontes energéticas. Nesta via, o oxigênio libera energia suficiente para regenerar a molécula de adenosina trifosfato (ATP), o resto do oxigênio que consumimos é utilizado por outras oxidases (enzimas que reduzem o oxigênio à água e peróxido de hidrogênio) e oxigenases (enzimas que diretamente incorporam o O₂ em moléculas essencialmente oxidadas). Apesar dessas últimas oxidações não gerarem ATP, elas são importantes em rotas metabólicas específicas, como no catabolismo de aminoácidos, detoxificação de drogas, e síntese de hormônios esteróides (MARKS *et al.*, 1996).

O papel do O₂ no dano celular é refletida em eventos que ocorrem durante a isquemia (uma condição causada por uma diminuição no fornecimento de O₂ que diminui a produção de ATP), e em outras condições que aumentam a conversão de O₂ para EROs (MARKS *et al.*, 1996).

Quando se forma o superóxido então uma outra espécie é gerada espontaneamente ou enzimaticamente através da dismutação para peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Quando o fluxo de elétrons é menor a geração de H₂O₂ pelo O₂ é mais proeminente (BURKITT *et al.*, 1989).

A maioria dos metabólitos produzidos pela redução de um elétron do O_2 são EROs: superóxido (O_2^-), o radical livre hidroxil (OH^\bullet), e a forma parcialmente reduzida, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mostrados na tabela 1. Os radicais livres são capazes de reagir indiscriminadamente com moléculas com as quais entram em contato, extraindo elétrons e gerando novos radicais livres em reações citotóxicas na cadeia oxidativa. O radical hidroxil é o mais reativo das EROs e, provavelmente, o iniciador da cadeia de reações que formam lipoperóxidos e radicais orgânicos. O peróxido de hidrogênio, entretanto, não atua como um radical, mas sim como um agente oxidante e na presença de Fe^{+2} ou outro metal de transição, e gera o radical hidroxil pela reação de Fenton (HALLIWELL & GUTERIGDE, 1999). Devido ao fato do peróxido de hidrogênio ser lipossolúvel, estável e poder difundir, ele pode causar muitos danos nas membranas que contenham Fe^{+2} , nos locais de formação. O ânion superóxido, que pode ser formado do O_2 livre pela doação de um elétron para um outro radical, é altamente reativo, mas possui lipossolubilidade limitada e não pode se difundir muito. Entretanto, o O_2^- pode também formar os radicais mais reativos como o hidroxil e hidroperóxido pela reação com peróxido de hidrogênio, na reação de Haber-Weiss (MARKS *et al.*, 1996).

Radicais livres podem aumentar durante o exercício como resultado de consumo de oxigênio mitocondrial e fluxo de transporte de elétrons aumentados. Esses radicais livres, apesar de serem fisiologicamente produzidos no organismo durante reações metabólicas normais; com o consumo de oxigênio basal e o conteúdo corporal de citocromo oxidase, uma enzima chave no metabolismo

oxidativo, podem exercer efeitos danosos quando não detoxificados ou quando produzidos em quantidades excessivas (JANSKY, 1961; POLIDORI *et al.*, 2000).

1.3 - RADICAIS LIVRES E EXERCÍCIO

Recentemente tem sido relatado que a produção de radicais livres depende do aumento no consumo de oxigênio, estabelecendo uma clara relação com o exercício. Esse aumenta os processos metabólicos pelo aumento no consumo de oxigênio de acordo com a duração e a intensidade do exercício causando uma maior produção de radicais livres, caracterizando uma situação de estresse oxidativo. Isso tem sido demonstrado também no caso de exercício intenso ou em exercício prolongado (ALESSIO, 1993; DAVIES *et al.*, 1982 e DUTHIE *et al.*, 1990). No exercício de resistência aeróbia a taxa de consumo de oxigênio pode aumentar em até 10 vezes estimulando a atividade mitocondrial e o metabolismo oxidativo, produzindo superóxido e peróxido de hidrogênio, podendo resultar num estresse oxidativo que provoque danos, como por exemplo: lipoperoxidação (JI, 1995). Essa lipoperoxidação, iniciada pelos radicais livres, diminui a função de “barreira” das membranas celulares e pode estar associada com necrose de fibras musculares e liberação de enzimas ocasionando dano muscular (DAVIES *et al.*, 1982). Existem dados sugerindo uma relação entre aumento de radicais livres e diminuição da integridade da membrana após o exercício (MAUGHAN *et al.*, 1988), o aumento na lipoperoxidação pode ser também por um aumento nos níveis de catecolaminas no sangue, elevação da temperatura corporal, um

acrécimo na auto-oxidação da hemoglobina ou um erro no metabolismo do oxigênio associado com o aumento na taxa de utilização do O₂ (KANTER *et al.*, 1988).

As taxas metabólicas elevadas e sustentadas durante uma série de exercícios sucessivos e isolados podem aumentar a taxa de oxidação das moléculas de DNA e RNA em humanos (ADELMAN *et al.*, 1988). Davis *et al.* (1982), mostraram que o exercício exaustivo provoca uma diminuição no controle da respiração mitocondrial, causando um aumento nos radicais livres e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e sugerindo que o treinamento de resistência aeróbia induz ao dano pelos radicais livres. O que está bem estabelecido é que diferentes formas de exercício resultam em diferentes níveis de estresse oxidativo (LIU *et al.*, 2000).

A produção de radicais livres durante o exercício pode não ser limitada ao metabolismo aeróbio. Durante os períodos de exercício anaeróbio intenso, os radicais livres podem ser gerados por:

- Atividade da enzima xantina oxidase,
- Isquemia/reperfusão induzida pelo exercício,
- Atividade aumentada da enzima ciclooxigenase,
- Atividade aumentada da enzima óxido nítrico sintase (NOS),
- Ativação de leucócitos (CHIEN *et al.*, 1978; SJÖDIN *et al.*, 1990; PFEIFFER *et al.*, 1999 e CHAO *et al.*, 1999).

Fontes não mitocondriais de radicais livres são aumentadas com exercício intenso através de vários mecanismos (SJÖDIN *et al.*, 1990). Intervalos de exercício intenso podem aumentar o estresse oxidativo devido à transição de isquemia e re-oxigenação ocorrendo nos músculos em exercício (McBRIDE *et al.*, 1998).

Tabela 1 - Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio

Radicaís Livres	Espécies reativas de O₂
Superóxido, O ₂ ^{•-}	Peróxido de hidrogênio, H ₂ O ₂
Hidroxil, OH [•]	Ácido hipocloroso, HOCl
Peroxil, RO ₂ [•]	Ozônio, O ₃
Alcoxil, RO [•]	Oxigênio singlet, O ₂ ¹
Hidroperoxil, HO ₂ [•]	Peroxinitrito, ONOO ⁻

* O ponto sobrescrito (•) é usado para simbolizar um radical.

Evidências recentes revelam que a produção de radicais livres, gerados pelo exercício físico, pode promover a fadiga muscular. O mecanismo por meio do qual os radicais livres produzem a fadiga muscular permanece desconhecido. Alguns cientistas argumentam que a produção de radicais livres durante o exercício intenso ou prolongado pode acarretar lesão do retículo sarcoplasmático, resultando numa menor liberação de Ca⁺² durante a despolarização do músculo (POWERS & HOWLEY, 2001).

Apesar do lucro para a saúde do treinamento de exercícios e um VO_{2máx} alto estar bem estabelecido, existe um paradoxo bioquímico, no qual, embora o

oxigênio seja essencial para a saúde cardiovascular e desempenho esportivo, também muito oxigênio ou metabolismo inapropriado do mesmo pode ser prejudicial.

Shröder e colaboradores, (2000) estudando jogadores profissionais de basquete em período de uma longa temporada de competição (duas sessões de treinamento por dia e um a dois jogos por semana, acompanhado de um período muito curto de recuperação) verificaram um aumento contínuo do estresse oxidativo durante essa temporada.

A resposta inflamatória no dano celular por exercícios longos e duradouros pode causar um aumento na liberação de neopterin pelos macrófagos após ativação de citocina (DUFAUX *et al.*, 1989). Essa resposta, quando induzida pelo exercício, pode participar no disparo da produção de EROs (CAMUS *et al.*, 1993). O músculo esquelético contém vários mecanismos de proteção reagindo naturalmente contra lesões, causadas por substâncias reativas de oxigênio. Esse mecanismo de defesa inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), que mostrou aumentar sua atividade com o exercício aeróbio em jogadores de futebol (BRITES *et al.*, 1999), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Apesar dessas enzimas estarem ativas em situações basais, elas não estão sempre em níveis adequados para a prevenção da lipoperoxidação induzida pelo exercício (ROBERTSON *et al.*, 1991). Nas últimas décadas, tem se evidenciado a ocorrência de adaptação das enzimas antioxidantes, o que é uma mudança

fundamental no músculo esquelético em resposta ao treinamento, e isso ocorre em grande parte nas enzimas oxidativas mitocondriais (JI, 1992).

Os níveis celulares de antioxidantes são influenciados por numerosos fatores fisiológicos, patológicos e nutricionais tais como: altas pressões de O₂, envelhecimento, processos inflamatórios, radiação, medicamentos e níveis de vitaminas E, A e C. Evidências sugerem haver troca de certos antioxidantes entre tecidos durante o estresse oxidativo induzido pelo exercício. A eficiência dos sistemas antioxidantes celulares é de vital importância na determinação do dano celular e tecidual causado pelas EROs (JI, 1992).

1.4 - ESTRESSE OXIDATIVO

O exercício físico, quando realizado com a devida moderação, traz benefícios aos sistemas orgânicos. Entretanto quando ultrapassa os limites fisiológicos, acarreta danos ao organismo (CHAO, 1999).

Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo (EO), quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (SIES, 1986). Quando as EROs são produzidas mais rapidamente do que podem ser removidos pelos mecanismos de defesa celulares (MARKS *et al.*, 1996).

O termo estresse oxidativo serve para as circunstâncias nas quais a reação por radicais livres resulte em dano tecidual ou na produção de compostos conhecidamente tóxicos ou danosos aos tecidos (HALLIWELL & GUTERIDGE, 1999).

Um dos principais mecanismos de lesão nesse caso é a lipoperoxidação (LPO). As membranas das células de mamíferos contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) que podem sofrer lesão peroxidativa. Os ácidos graxos saturados e os monoinsaturados são mais resistentes ao ataque dos radicais livres que os poliinsaturados (CHILD et al., 1999).

Karmazyn *et al.*, (1979) demonstraram que a LPO alteraria a permeabilidade das membranas, induzindo a formação de poros hidrofílicos. Del Maestro *et al.*, (1981) determinaram ainda que os produtos da degradação podem difundir-se do local das reações e dar origem a edema celular, alterações da permeabilidade vascular, inflamação e quimiotaxia, além de alterar a atividade das enzimas fosfolipases e de induzir liberação de ácido araquidônico e, sob a ação da enzima ciclooxigenase, subsequente formação de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Hoschstein & Jain, (1981) demonstraram uma associação de LPO e polimerização de proteínas de membrana ao envelhecimento eritrocitário. De acordo com Correti *et al.*, (1991), a lesão mitocondrial provocada pela ação das EROs gera diminuição nos níveis de ATP, provocando falha nos transportadores e uma consequente sobrecarga de cálcio intracelular.

Embora os radicais livres possam alterar enzimas por ação direta sobre elas, a atividade enzimática pode também ser influenciada indiretamente através de mudanças na estrutura celular (JENKINS, 1988).

Na cadeia respiratória, quando o NADH está ligado à enzima desidrogenase láctica, ele pode ser oxidado pelo radical superóxido e produzir o radical NAD[•], que por sua vez pode iniciar as reações em cadeia ou reagir com o oxigênio formando NAD⁺ e superóxido. Essas reações podem reduzir o poder da desidrogenase láctica e iniciar reações danosas adicionais (JENKINS, 1988).

1.5 - SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO

As defesas antioxidantes celulares são convencionalmente divididas em dois grupos: enzimáticas e não-enzimáticas. A superóxido dismutase, a catalase e a glutaciona peroxidase catalisam a redução de um elétron de $O_2^{\cdot -}$ ou de H_2O_2 (CHANCE *et al.*, 1979). Um certo número de enzimas está envolvido no fornecimento de substrato ou na potencialização da redução das enzimas antioxidantes primárias como a glutaciona peroxidase (GPx) e a glicose-6-fosfato desidrogenase, não removendo, no entanto, as EROs diretamente.

1.5.1 - Catalase (CAT)

O peróxido de hidrogênio, uma vez formado, também pode ser removido para prevenir a geração do radical hidroxil. A principal rota envolve a

decomposição de peróxido de hidrogênio em água pela catalase e glutathione peroxidase. A catalase é encontrada principalmente nos peroxissomas e, uma pequena quantidade, no citosol e fração microssomal das células (MARKS *et al.*, 1996).

Essa enzima também é muito importante no metabolismo do peróxido de hidrogênio. No coração ela está em menor concentração e converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A diferença entre a CAT e a GPx é que a GPx é mais efetiva em baixas concentrações de H₂O₂, por exemplo em faixas de µM, enquanto que a CAT é mais efetiva em concentrações de mM de H₂O₂ (SINGAL *et al.*, 1998; SUBUDHI *et al.*, 2001).

1.5.2 - Superóxido Dismutase (SOD)

A dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e O₂ pela SOD é freqüentemente chamada de primeira defesa contra estresse oxidativo devido ao superóxido ser um forte iniciador de reações em cadeias (MARKS *et al.*, 1996). As formas mais comuns da SOD são CuZnSOD, que está presente no citoplasma, e a MnSOD encontrada na mitocôndria (SINGAL *et al.*, 1990; SUBUDHI *et al.*, 2001).

1.5.3 - Outras Enzimas Com Papel Antioxidante

Em adição às enzimas antioxidantes primárias já mencionadas, as células possuem um número de sistemas enzimáticos que funcionam reduzindo a produção de EROs ou facilitando sua remoção ou de seus subprodutos. A citocromo c oxidase é uma enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial,

catalisando a transferência de elétrons pelo citocromo a_3 para o oxigênio. Chance *et al.*, (1979), enfatizaram a importância dessa enzima em prevenir a formação de $O_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 fora da cadeia respiratória, ligando-se fortemente a esses radicais. Yu *et al.*, (1994) expandiu a concepção de defesas antioxidantes por meio das enzimas participantes na degradação, na remoção e na reparação de células com algum prejuízo. A degradação de proteínas oxidadas é outra função importante exercida por determinadas proteases (OLIVER *et al.*, 1987).

1.6 - SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO-ENZIMÁTICO

Este sistema inclui compostos de baixo peso molecular sintetizados pelo organismo humano como bilirrubina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, etc, ou ingeridos através da dieta como ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E (alfa-tocoferol), carotenóides (vitamina A) e grupos fenóis de plantas (flavonóides). As vitaminas antioxidantes possuem a propriedade de remover $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} e também o O_2 *singlet* (YU *et al.*, 1994). A glutatona (GSH) e outras moléculas antioxidantes exercem um importante papel na manutenção dos níveis de substrato por meio da GPx, além de contribuir para o estado reduzido das vitaminas E e C (MEISTER *et al.*, 1983). Do ponto de vista nutricional, os antioxidantes podem ser divididos em duas categorias. A primeira refere-se aos antioxidantes sintetizados pelo próprio organismo, sendo estimulados nas situações de estresse oxidativo, incluindo muitas enzimas antioxidantes, além da GSH. A segunda categoria refere-se aos não-sintetizados pelo organismo, sendo

adquiridos por meio da dieta. Podemos incluir nessa categoria as vitaminas E e C e β -caroteno. Entretanto, até os antioxidantes sintetizados pelo organismo estão sob a influência nutricional e, portanto, das características dos macros e dos micro-nutrientes ingeridos (HARRIS *et al.*, 1992). Dessa forma a alimentação tem um papel significativo no sistema antioxidante.

Ames *et al.*(1981), propõem o papel protetor do urato no sangue. Os humanos contêm cerca de 750g de hemoglobina e aproximadamente 3% destes (22g) sofre auto-oxidação, produzindo diariamente metahemoglobina e radical superóxido. O superóxido é dismutado pela SOD em H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 , ou possivelmente os hidroperóxidos lipídicos, podem ser importantes iniciadores da LPO nas membranas dos eritrócitos. Os autores então, pressupõem que um dos papéis do urato é ajudar a suprimir a LPO nos eritrócitos.

1.6.1 - Ácido Úrico (AU)

O exercício utiliza grandes quantidades de ATP na contração muscular produzindo os nucleotídeos de purinas ADP e IMP, que são normalmente regenerados a ATP através da fosforilação oxidativa. O efeito combinado da utilização de altas taxas de ATP e a diminuição do oxigênio para regeneração do ATP durante o exercício leva ao acúmulo de hipoxantina e xantina (JACKSON, 1994; HELLSTEN, 1994). A xantina é convertida a ácido úrico pela xantina oxidase.

O ácido úrico serve como um seqüestrador de radicais livres *in vivo* (HELLSTEN, 1997; CHEVION *et al.*, 2000). O ácido úrico plasmático pode estabilizar os radicais peroxil na fase aquosa e contribuir para a defesa antioxidante do plasma (WAYNER *et al.*, 1987). Durante o exercício, purinas ricas em fosfatos são utilizados e catabolizados, resultando no acúmulo de hipoxantina, xantina e ácido úrico nos tecidos. A conversão de hipoxantina em ácido úrico é associada à formação do radical superóxido (SJÖDIN *et al.*, 1990).

1.6.2 - Compostos Fenólicos

A presença dos compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada por apresentarem atividades farmacológicas e antinutricional e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (NAGEM *et al.*, 1992; FERNANDEZ *et al.*, 1998).



Os flavonóides são os mais abundantes compostos fenólicos que fazem parte dos alimentos, que compreende isoflavonas na soja, flavanóis catequinas e epicatequinas na uva, no chá e cacau, quercetina em cebolas e maçãs, naringinas em frutas cítricas e outros. O papel dos flavonóides como prováveis mediadores dos benefícios da saúde pela ingestão de frutas e vegetais e o potencial na promoção da saúde como nutrientes individuais tem estimulado pesquisas substanciais bem como especulações. Associações epidemiológicas e pesquisas preliminares têm levado a excedentes extrapolações simplistas, por exemplo, o paradoxo japonês é baseado na soja e no chá verde, o paradoxo francês é

baseado no vinho tinto e os benefícios da dieta do Mediterrâneo é baseado no azeite de oliva. Polifenóis isolados como a genisteína, epicatequina ou resveratrol tem sido reivindicado por apresentar uma potente atividade antioxidante (NESTEL, 2001).

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois além de englobarem uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas) eles são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e suscetíveis à ação de enzimas (KING & YOUNG, 1999).

Os antioxidantes são agentes que trabalham tipicamente para impedir, ou diminuir, o desencadeamento das reações oxidativas. Os mais importantes metabólitos fenólicos são os ácidos fenólicos, os polifenóis e os flavonóides. As flavonas, flavononas, flavonóis, catequinas e antocianinas formam o grupo dos flavonóides, estes compostos protegem contra a oxidação do LDL-colesterol através da redução dos radicais livres, como quelantes de íons metálicos e regeneração de alfa-tocoferol. Atuam também contra radicais livres, alergias, inflamações, úlceras, viroses, tumores e hepatotoxinas. Na inibição da agregação plaquetária reduzindo as cardiopatias e trombooses e a síntese de estrógeno (ANJO, 2004).

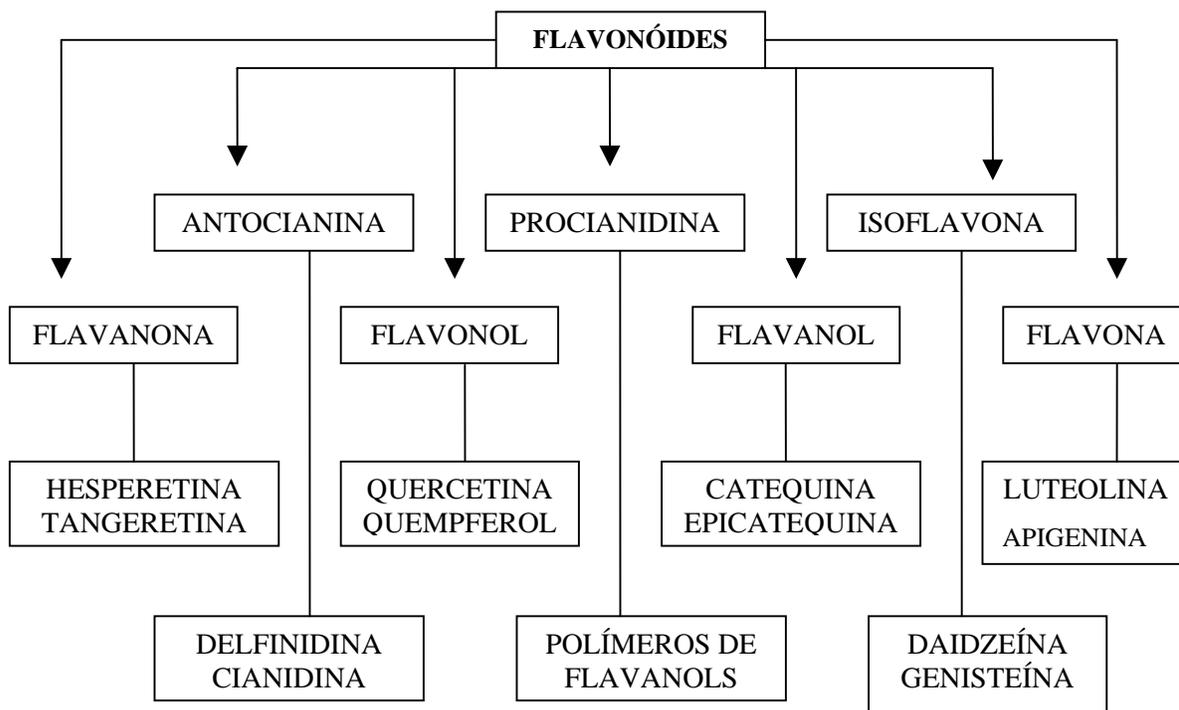


Figura 1- Fenólicos, a maior classe de antioxidantes da dieta e parte do amplo grupo de polifenóis encontrados nas plantas.

1.7 - LIPOPEROXIDAÇÃO E EXERCÍCIO

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia que ocorre na membrana celular e pode ser dividida nas três etapas que seguem:

(a) Iniciação: o radical hidroxil reage abstraindo um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) da cadeia lateral de um AGPI (reação 6), deixando um radical centrado no carbono. Os hidrogênios ligados aos carbonos metilenos são univalentes e, portanto, mais reativos (EGE, 1984).



no qual L corresponde à continuação da cadeia do ácido graxo.

(b) Propagação: esse radical centrado no carbono (L-C^\bullet) por sua vez, reage com o oxigênio produzindo radicais peroxil (reação 7), os quais propagam a reação.



Na ausência de oxigênio, os radicais centrados no carbono podem reagir entre si formando pontes cruzadas (reação 8).

(c) Terminação: ocorre quando dois radicais reagem entre si, formando moléculas estáveis (por exemplo, a reação 8).



Os produtos finais da LPO são o malondialdeído (MDA), hidrocarbonetos voláteis (como os gases etano e pentano), aldeídos saturados e insaturados, cetonas e outros produtos que podem ser detectados experimentalmente (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).



Agudamente o exercício acarreta um aumento nos níveis de MDA no fígado, e cronicamente induz a um decréscimo do conteúdo de MDA no cérebro, um aumento significativo no coração e músculos rápidos e lentos de ratos treinados (LIU *et al*, 2000). O MDA é o produto da degradação de lipoperóxidos de

ácidos graxos que contém três ou mais ligações duplas e é mais comumente mensurado pelo TBARS (PRYOR *et al.*, 1976). Quando um radical superóxido reage com um ácido graxo insaturado, um novo radical é formado. Na presença do oxigênio inicia-se uma reação em cadeia que é a lipoperoxidação, que diminui a fluidez da membrana, incapacidade de manutenção dos gradientes iônicos, inchaço celular e inflamação tecidual. A via da lipoperoxidação é a mesma no repouso quanto no exercício. Entretanto, a taxa em que as reações ocorrem é aceita ser maior durante o exercício. Se o exercício aumenta a taxa de lipoperoxidação, então o exercício pode ser implicado em algumas instâncias de dano celular. Entretanto, o efeito do exercício na integridade celular é incerto, pois não se sabe se a lipoperoxidação é a causa ou a consequência para o dano tecidual. O TBARS tem sido utilizado para mensurar a LPO nas membranas celulares e ácidos graxos. A técnica do TBARS tem mostrado ser sensível ao MDA e um bom índice geral de estresse oxidativo nos sistemas biológicos. O problema com o uso do TBARS para indicar o MDA é que este pode ser provido de outras vias além da LPO e mostra uma resposta positiva com a oxidação de outros produtos (ALESSIO, 2000; CHILD *et al.*, 1999).

Nos eritrócitos e em outras células a primeira via antioxidante preventiva para a remoção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é a glutathione e glutathione peroxidase dependente de selênio (VIGUE *et al.*, 1993). O exercício particularmente o exaustivo máximo e exercício em indivíduos não treinados produzem uma quantidade grande de radicais livres, induzindo a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados nos fosfolípidos de membrana e polimerização de

proteínas de membranas tais como as espectrinas. As mudanças nas membranas das células sanguíneas vermelhas aumentam a permeabilidade, rigidez da membrana e diminuem a deformabilidade celular, que pode resultar num aumento na hemólise da célula vermelha (JENKINS, 1988).

1.8 – DANO OXIDATIVO A PROTEÍNAS

A produção de EROs acredita-se ser mecanismos intrínsecos de uma série de mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o exercício e são indicativos de estresse oxidativo (JENKIS, 1988). Modificações oxidativas de resíduos de aminoácidos incluindo derivação de resíduos de aminoácidos como prolina, arginina e lisina para derivados reativos carbonil, e tem sido estabelecido o grau de acúmulo de carbonilação e uma variedade de condições fisiopatológicas (STADMAN, 1992; RADÁK & GOTO, 1998). O conteúdo de carbonilação de proteínas pode ser determinado usando o reagente 2,4 dinitrofenil hidrazina (DNPH). Os efeitos citotóxicos das EROs pode também ter como alvos as bases do DNA e provocar mutações que podem levar a mudanças no genótipo do DNA (KUCHINO *et al.*, 1987).

1.9 - MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE DURANTE EXERCÍCIO AGUDO

As enzimas antioxidantes são capazes de aumentar suas atividades em resposta aos aumentos nos níveis dos substratos (CHANCE *et al.*, 1979). Dentro do padrão fisiológico, isso provavelmente é acompanhado pela ativação de moléculas enzimáticas existentes, via modificação covalente e/ou alostérica de maneira mais expressiva do que sintetizando novas proteínas enzimáticas (JI, 1995). Pelo fato de as sessões intensas de exercício físico incrementarem a produção de radicais livres em certos tecidos, como o hepático, o muscular cardíaco e o esquelético (DAVIES *et al.*, 1982; KUMAR *et al.*, 1992), é esperado um aumento em certas atividades enzimáticas em resposta à atividade física. Em função da grande variedade de atividades enzimáticas endógenas, bem como os níveis de produção de EROs nos diversos tipos teciduais, as enzimas antioxidantes têm demonstrado diferentes respostas ao exercício físico.

A atividade da enzima SOD aparece aumentada após uma sessão de exercício intenso, no fígado (JI *et al.*, 1988; MARIN *et al.*, 1993), no músculo esquelético (MARIN *et al.*, 1993; QUINTANILHA *et al.*, 1982), no músculo cardíaco (JI *et al.*, 1994; QUINTANILHA *et al.*, 1983) e no sangue (QUINTANILHA *et al.*, 1983). Porém, Radák e colaboradores (1995) observaram que a atividade CuZnSOD e MnSOD, bem como os conteúdos enzimáticos imunorreativos nos músculos sóleo e tibial de ratos, estiveram significativamente aumentados após uma única sessão de caminhada levando à exaustão. A atividade de CuZnSOD voltou aos mesmos níveis daqueles encontrados no repouso após um a três dias,

enquanto que a atividade da MnSOD e os conteúdos protéicos continuaram a aumentar após o exercício. Essas respostas sugerem que os efeitos da estimulação do exercício na síntese e na ativação de CuZnSOD e MnSOD podem ser diferentes em termos de limitação e do tempo de indução.

De maneira similar a SOD, a GPx possui respostas variáveis, em uma sessão de exercício físico agudo, nas diferentes fibras musculares esqueléticas. Alguns estudos indicam que certos efeitos da atividade muscular, sob a GPx, são nulos (MARIN *et al.*, 1993; BRADY *et al.*, 1979; LEEUWENBURGH *et al.*, 1995 e VIHKO *et al.*, 1978), enquanto que em outros há significativa elevação (KANTER *et al.*, 1993; RADÁK *et al.*, 1995; JI *et al.*, 1992 e QUINTANILHA, 1984). A GPx hepática parece ser inalterada em todos os estudos relatados (JI, 1995). Poucos estudos detectaram aumento na atividade de GPx no coração (QUINTANILHA, 1984) bem como nas plaquetas (BUCZYNSKI *et al.*, 1991).

Diversos estudos anteriores não revelaram qualquer alteração significativa na atividade da enzima CAT com o exercício agudo (MEYDANI *et al.*, 1993 e JI, 1995). Entretanto, uma exceção se fez na detecção de um aumento na atividade de a enzima CAT após a exaustão na porção mais profunda do músculo vastolateral de ratos (JI *et al.*, 1992 e JI & FU, 1992). Embora a CAT seja encontrada primariamente nos peroxissomos, as mitocôndrias dos miócitos têm demonstrado uma fração significativa de atividade da enzima (LUHTALA *et al.*, 1994). Assim é possível que o aumento observado no tecido muscular reflita uma ativação mitocondrial da CAT devido a um aumento na produção de H₂O₂.

As enzimas antioxidantes podem ser distintamente ativadas durante uma sessão de exercício árduo. Essa ativação pode depender do estresse oxidativo imposto em um determinado tecido bem como da propriedade enzimática intrínseca. O músculo esquelético é classificado como sendo mais afetado no estresse oxidativo que o fígado e coração, em função, é claro, do consumo de oxigênio envolvido durante a atividade física; sendo assim, o músculo esquelético necessita de uma maior proteção junto ao potencial agressor oxidativo (SEN, 2001; JENKIS, 2000).

1.10 ADAPTAÇÕES AO EXERCÍCIO

1.10.1 No exercício agudo

Uma série aguda de exercício máximo não tem efeito na atividade da maioria das enzimas antioxidantes no coração do rato, exceto sobre a SOD, que mostrou um significativo aumento após o exercício, e por 30 minutos após o exercício. Muitas enzimas antioxidantes hepáticas não são afetadas por uma série de exercício exaustivo, mas a atividade da CuZnSOD foi significativamente maior na exaustão que no repouso. No músculo esquelético, a atividade de todas as enzimas antioxidantes mensuradas (SOD, GPx, e CAT) foram significativamente aumentadas após uma série de exercício exaustivo (JI, 1992, LEAF *et al.*, 1999).

1.10.2 No exercício crônico/treinamento

O treinamento induz as enzimas antioxidantes musculares, entre elas a MnSOD e GPx mitocondrial mostram importante indução em resposta ao treinamento (JI, 1992). Os efeitos do treinamento na CAT e CuZnSOD são menos ressaltadas e existem dados conflitantes. Em geral, o treinamento não influencia o sistema enzimático no coração ou fígado como no músculo esquelético, mas o treinamento vigoroso tem mostrado um acréscimo na SOD no tecido ventricular esquerdo, e o tamanho da indução é dependente da intensidade do treinamento (POWERS *et al.*, 1993; LEAF *et al.*, 1999; JENKIS, 1992)

Os organismos são capazes de induzir as enzimas antioxidantes sobre um estresse oxidativo. Os efeitos do exercício crônico nas enzimas antioxidantes foram primeiro investigados em estudos transversos, comparando animais selvagens com espécies domésticas, e atletas com sedentários (JENKIS, 1988). Jenkis e colaboradores (1984) foram os primeiros a reportarem que a atividade da CAT e da SOD estão correlacionadas positivamente com o consumo de oxigênio e também com o percentual de fibras do tipo I em músculo esquelético humano. Entretanto, estudos com treinamento de animais ou humanos não tem sido capazes de demonstrar consistentemente que enzimas antioxidantes podem ser induzidas pelo exercício crônico. Alguns pesquisadores têm demonstrado o aumento nas atividades da CAT e da SOD com o treinamento, entre eles Higuchi *et al.*, (1985) e Quintanilha, (1984). No entanto este tema é controverso visto que Alessio *et al.* (1988), Ji *et al.*, (1988) e Laughlin *et al.*, (1990) não observaram o mesmo efeito. Em geral, existe uma atividade suficiente da SOD na maioria dos tecidos para reduzir O_2^{\bullet} em H_2O_2 , aumentando esta atividade em situações de estresse oxidativo. Isso pode ser demonstrado por uma atividade relativamente consistente da SOD em todos os grandes tecidos do corpo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985). Portanto, a remoção de H_2O_2 e outros peróxidos é provavelmente um fator determinante na extensão do dano oxidativo. A indução da GPx pelo treinamento, pode representar a adaptação mais importante do músculo esquelético para enfrentar o estresse oxidativo causado pelo exercício (JI, 1992).

O aumento na demanda de energia, acompanhado pelo aumento na taxa metabólica oxidativa, significa um grande fluxo de oxigênio pelas mitocôndrias, promovendo uma alta exposição tecidual as EROs. Se a intensidade do exercício for suficiente para causar um déficit de adenina e/ou uma lesão tecidual muscular, as vias da xantina oxidase (XO) e dos neutrófilos poderão ser estimuladas a produzir um EROs adicional no tecido. Além disso, o treinamento pode depletar os estoques de antioxidantes não-enzimáticos, tais como vitamina E, glutathione, caso a ingestão não esteja em equilíbrio com a demanda. Assim, como uma estratégia a longo prazo, as células podem ativar a síntese das enzimas antioxidantes para compensar o intenso estresse oxidativo (PRYOR *et al.*, 1976; LEAF, *et al.*, 1987; SEN, 2001).

Além disso, um estudo realizado por Tiidus e colaboradores (1996) demonstrou efeitos do treinamento na atividade da enzima SOD nas fibras musculares dos membros inferiores, em humanos, após oito semanas de treinamento em bicicleta. Higushi e colaboradores (1985), demonstraram que a enzima SOD Mn é a responsável primária pelo aumento na atividade da SOD.

Existem relatos mais consistentes em relação à adaptação da GPx ao treinamento, com a maior parte dos estudos demonstrando um aumento na atividade (JI *et al.*, 1988; OH-ISHI *et al.*, 1997; LEEUWENBURGH *et al.*, 1994; JENKIS, *et al.*, 2000 e LAUGHLIN *et al.*, 1990). A adaptação em relação a GPx demonstra um padrão específico de fibra muscular, em que a fibra do tipo II a é a mais adaptativa ao treinamento.

A atividade da enzima SOD parece ser suficientemente alta e relativamente uniforme para todos os tecidos e entre os vários tipos de fibras musculares, sugerindo que a remoção da superóxido pode não ser o fator limitante para a alta atividade. Para efeito de comparação, a enzima GPx degrada os produtos finais das EROS, sendo essa atividade relativamente baixa. Isso pode vir a explicar o motivo de a GPx mostrar, normalmente, uma grande adaptação ao treinamento quando comparada as enzimas SOD e CAT. Após a investigação *in vitro*, Remacle e colaboradores (1992) propuseram que a GPx é a mais importante enzima antioxidante para a integridade celular por sua alta sensibilidade aos níveis intracelulares de EROs e por sua grande adaptação ao estresse oxidativo.

1.11- VOLEIBOL

O voleibol competitivo é considerado por muitos, um dos esportes mais explosivos e rápidos de hoje em dia. Desde a sua iniciação, tem envolvido atividades de muita força, potência, agilidade e velocidade. O voleibol é um esporte muito rápido e de alta potência. Jogadores de voleibol de elite masculino executam 250-300 atividades de alta potência, durante uma partida de 5 sets. Dessas atividades, 50% são saltos de vários tipos, 30% são *sprints* curtos e 12-16% são mergulhos para pegar bolas. Os saltos constituem a maioria das atividades de potência. Jogadores de diferentes posições naturalmente exigem diferentes freqüências e tipos de saltos (KRAEMER & HAKKINEN, 2001).

Tem sido estimado que 90% da energia requerida para um jogador de voleibol bem sucedido é proveniente de fontes energéticas anaeróbias, com somente 10% advinda de fontes aeróbias. Um rápido exame de um típico jogo claramente ilustra que o voleibol é um esporte do tipo “explosão”. As ações ocorrem em curtas atividades de alta potência e velocidade. Embora possua intervalos de recuperação entre os pontos, que são muito curtos (12-14 segundos), a duração da atividade é igualmente menor. A capacidade aeróbia é mais importante nos períodos de recuperação entre os *rallies*, mas não é a fonte energética predominante durante a disputa pelos pontos. Em apoio a essas características metabólicas, os jogadores de voleibol não desenvolvem tipicamente grandes níveis de acúmulo de lactato (KRAEMER & HAKKINEN, 2001).

Em um estudo de Zoppi *et al*, (1998), comparando atletas juvenis de voleibol e futebol, em três fases de treinamento físico (preparatória, específica e competitiva), mostraram que os marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e dano muscular não são drasticamente diferenciados, e que as diferenças encontradas poderiam ser atribuídas às especificidades da reatividade orgânica individual ao treinamento físico.

O vôlei de praia, por ser um esporte relativamente novo, ainda não apresenta trabalhos científicos publicados, e como vindo crescendo muito a sua prática, entendemos ser muito importante, termos informações sobre este novo esporte olímpico.

De acordo com as justificativas acima citadas este trabalho será desenvolvido na área de Fisiologia e Bioquímica do Exercício.



2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO GERAL

A relevância principal deste estudo se deve a escassez de pesquisas envolvendo o voleibol, que é um esporte acíclico e com metabolismo misto, onde a energia provém principalmente do metabolismo anaeróbio e com contribuição do metabolismo aeróbio. Já que a maior parte da literatura existente relacionando, estresse oxidativo e exercício, utiliza-se de esportes cíclicos e de metabolismo aeróbio.

Este estudo pode ser de grande utilidade para treinadores de equipes que participam em competições de médio e alto nível, onde poderão ser utilizados marcadores bioquímicos e fisiológicos para periodização de treinamento, assim como para verificar adaptações do treinamento ao longo de uma temporada, pela análise de algumas enzimas e substâncias envolvidas em condições de estresse oxidativo, e pela quantificação do consumo de oxigênio ($VO_{2máx.}$).

O estudo tem como objetivo descrever e comparar parâmetros oxidativos após o exercício aeróbio e anaeróbio em atletas de voleibol de quadra, jogadores de vôlei de praia e indivíduos não treinados.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar entre os grupos, a atividade da enzima catalase,
- Comparar intra e inter-grupos, assim como entre os exercícios, os danos oxidativos aos lipídeos e as proteínas,
- Comparar a concentração de ácido úrico intra e inter-grupos, assim como entre os exercícios,
- Comparar os níveis de compostos fenólicos plasmáticos, intra e inter-grupos, e a sua resposta a diferentes exercícios.

3-PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1- DELINEAMENTO DA PESQUISA

Modelo de investigação de laboratório, com caráter quantitativo, o procedimento de investigação caracteriza-se como sendo do tipo *ex-post-facto* com abordagem comparativa.

3.1.1 - População e Amostra

A amostra foi composta por 11 indivíduos não treinados, 11 atletas profissionais de voleibol de quadra e 6 jogadores de vôlei de praia, do sexo masculino, com idade entre 20 e 35 anos, saudáveis, não fumantes, voluntários.

Indivíduos não treinados: indivíduos saudáveis, sem uma prática de exercício (treinamento) sistemática, com um volume de atividade física menor que os grupos de atletas.

Estudantes dos cursos de graduação e pós-graduação da Escola de Educação Física e Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Jogadores de vôlei de praia: indivíduos saudáveis, com grande volume de treinamento, periodicidade de treino de no mínimo 3 vezes por semana e pelo

menos um turno por dia, e consumo máximo de oxigênio maior que os indivíduos levemente ativos.

Jogadores independentes, da cidade de Porto Alegre e arredores.

Atletas profissionais de voleibol de quadra: indivíduos saudáveis, com volume de treinamento maior que os atletas de vôlei de praia, periodicidade de 5 dias por semana e dois turnos por dia, e que tenha uma capacidade aeróbia maior que os outros grupos.

Atletas de voleibol de quadra, do Sport Clube ULBRA, de Canoas.

3.2- SEQÜÊNCIA EXPERIMENTAL

3.9- GRUPO EXPERIMENTAL

Os voluntários foram informados do objetivo do estudo, dos riscos e eventuais desconfortos. Leram e assinaram o termo de consentimento informado (Anexo 1). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo 2).

Na entrevista inicial, aplicamos o PAR-Q QUESTIONÁRIO SOBRE PRONTIDÃO PARA ATIVIDADE FÍSICA (Anexo 3), com o objetivo de excluir indivíduos que tivessem condição imprópria de participar de atividades físicas. Num segundo momento através de uma anamnese, buscamos identificar eventuais condições que pudessem interferir nos resultados do estudo, como por

exemplo, indivíduos fumantes, e/ou que estivessem em tratamento medicamentoso, ou usando suplementos vitamínico-minerálicos que interferisse nos resultados.

Neste dia foi entregue aos indivíduos um recordatório alimentar de três dias (Anexo 4), e também um recordatório de atividades físicas (Anexo 5) que foi preenchido e devolvido a nutricionista para que pudesse ser calculada a dieta individualizada para cada indivíduo antes do teste máximo. Os sujeitos receberam uma dieta padrão, que foi utilizada nos períodos de teste.

Os indivíduos foram orientados a não consumir café ou bebidas alcoólicas nas 24 horas que antecedem o teste, e que se apresentem trajando roupas e calçados adequados.

Os sujeitos foram orientados a não realizar exercícios físicos 24 h antes dos testes.

A realização dos testes foi de acordo com as possibilidades de horário dos participantes.

O nível de condicionamento físico foi avaliado através da potência aeróbia máxima, que conforme McDougall *et al.* (1991), corresponde a quantidade máxima de oxigênio que um organismo pode ser estimulado a extrair da atmosfera e então transportar e utilizar nos tecidos, e equivale à máxima quantidade de oxigênio que

pode ser consumido por unidade de tempo por um indivíduo durante atividade que envolva grandes grupos musculares, de intensidade com aumento progressivo, que é continuada até a exaustão. Quando expressa em termos de oxigênio, é normalmente escrita como o máximo (máx) volume por minuto (V) de oxigênio (O_2) e é abreviada como $VO_{2máx}$.

De acordo com Wilmore e Costill (2001) e pelas diretrizes do Colégio Americano de Medicina Esportiva (ACSM) de 2001, o $VO_{2máx}$ é considerada a melhor medida isolada da resistência cardiorrespiratória e do condicionamento aeróbio, e está relacionado à capacidade funcional do coração.

É importante salientar que o $VO_{2máx}$ pode ser modificado pelo treinamento, porém, em indivíduos saudáveis, mais de 90% da variabilidade do $VO_{2máx}$ é determinada geneticamente (KLISSOURAS, 1971). Além disso, a capacidade para o trabalho prolongado também depende da habilidade de tolerar intensidades submáximas de exercício a um percentual elevado do $VO_{2máx}$, independente de seu valor absoluto (RIBEIRO, 1995).

As diretrizes do ACSM fornecem uma tabela com valores normativos expressos em percentil para o $VO_{2máx}$ em mililitros por quilograma de peso por minuto ($mL.Kg^{-1}.min^{-1}$) com referências específicas à idade e sexo (Anexo 5). O ranking pode ser interpretado da seguinte maneira:

percentil 90: bem acima da média

percentil 70: acima da média

percentil 50: média

percentil 30: abaixo da média

percentil 10: bem abaixo da média

Segundo o ACSM um $VO_{2máx.}$ abaixo do percentil 20 para o sexo e a idade está associado com um risco aumentado de morte por todas as causas.

Também é dito que altos níveis de condicionamento cardiorrespiratório estão associados com altos níveis de atividade física habitual, que estão por sua vez, associados com muitos benefícios à saúde. Sendo assim, optar-se-á por computar o volume de treino semanal dos indivíduos para juntamente com os valores de percentil de $VO_{2máx.}$ categorizá-los em atletas e indivíduos levemente ativos.

Cabe salientar que o $VO_{2máx.}$ avaliado no cicloergômetro geralmente é 8 a 11% menor do que o valor obtido na esteira, em função dos valores de VO_2 aumentarem de acordo com a massa muscular envolvida no teste. (McARDLE e MAGEL, 1970).

3.2.1- Percentual de gordura (% G)

O percentual de gordura foi avaliado através da técnica de dobras cutâneas e utilizado para caracterizar os grupos.

Para o grupo de atletas o percentual de gordura foi calculado através da fórmula de sete dobras cutâneas de Jackson & Pollock (1978). Como referência, atletas de voleibol de quadra de nível nacional da Austrália têm 9,8% de gordura corporal (WITHERS *et al.*, 1987).

Para o grupo de indivíduos não treinados o percentual de gordura foi calculado através da fórmula de três dobras cutâneas Jackson & Pollock (1978). Como referência, indivíduos não treinados do sexo masculino têm tipicamente 15% de gordura corporal (ACSM's Guidelines, 2001).

3.2.2-Inquérito alimentar

O registro alimentar de três dias foi calculado por nutricionista, a fim de identificar se os padrões alimentares (ingesta calórica e distribuição de macronutrientes) estavam de acordo com a RDA (recomendação diária de alimentos) e com suas necessidades individuais.

Para todos os testes, os indivíduos foram instruídos a ingerir o café da manhã prescrito na dieta, no mínimo duas horas antes de cada teste, tentando evitar qualquer desconforto ou mal estar durante os testes.

3.2.3-Alimentação pré-exercício

Sabe-se que ocorre uma depleção significativa nas reservas corporais de carboidratos após um período de 8 a 12 horas de jejum. O exercício pela manhã, após uma noite em jejum, requer uma alimentação prévia, mesmo que o indivíduo tenha hábitos regulares e saudáveis em sua alimentação. Fazer jejum antes de um exercício não tem sentido fisiológico, pois tal situação depleta rapidamente o glicogênio muscular e hepático, e prejudica o rendimento do exercício. Consumir carboidratos de alto índice glicêmico, rapidamente absorvidos, dentro de uma hora antes do exercício acelera a depleção de glicogênio e afeta o desempenho negativamente por contribuir com uma depleção do glicogênio e fadiga prematura.

A refeição pré-exercício proporciona ao atleta energia adequada proveniente de carboidratos e assegura uma ótima hidratação. Em geral, três horas são suficientes para digerir e absorver uma refeição rica em carboidratos antes do exercício. As refeições líquidas são uma opção, pois podem ser mais rapidamente absorvidas, mesmo com altos índices glicêmicos, ingeridas dentro de uma hora antes do exercício e obter os mesmos efeitos. Uma bebida que contenha polímeros de glicose, como a maltodextrina, ao invés de açúcares simples, minimiza os efeitos negativos da concentração de moléculas de açúcar no esvaziamento gástrico e mantém o volume plasmático, pois facilita o movimento de água do estômago para o intestino delgado para absorção (McARDLE *et al.*, 1996; KIRWAN *et al.*, 1998 e SPARKS *et al.*, 1998).

3.3 - TESTE NO CICLOERGÔMETRO

3.3.2 – Familiarização

Os indivíduos que nunca se submeteram à teste ergoespirométrico em cicloergômetro passaram por um teste de familiarização aos equipamentos antes de iniciar o estudo.

3.3.3 - Teste máximo

Os indivíduos foram instruídos a fazer um breve alongamento antes do teste, e após a colocação dos aparatos de frequência cardíaca e máscara de coleta de gases.

No primeiro dia do experimento foi realizado um teste de cargas progressivas, em cicloergômetro, segundo protocolo em escada. O incremento de carga foi igual para todos os grupos. A carga inicial foi de 50 watts, e sofreram incrementos de 25 watts a cada minuto, para determinação do consumo máximo de oxigênio e dos limiares ventilatórios. Os incrementos de carga foram suficientes para que o teste dure de 8 a 14 minutos.

Os critérios utilizados para alcançar o $VO_{2máx}$ foram:

Através da solicitação voluntária do sujeito;

Platô na curva de consumo de oxigênio;

RER maior que 1,15.

3.3.4 - Determinação dos limiares ventilatórios

Esta técnica de estimativa foi escolhida em função de (a) não ser invasiva; (b) evitar a necessidade de presença dos indivíduos mais de uma vez no laboratório para realizar outro protocolo máximo incluindo a medida de lactato sanguíneo.

O primeiro limiar ventilatório ou limiar aeróbio (LA), foi determinado através da análise computadorizada da equação de regressão entre VO_2 e VCO_2 , conhecido como método de inclinação V (*V-slope*), conforme trabalho de Beaver *et al.* (1986). Quando o programa não for capaz de detectar o LA, este foi determinado pelos observadores, seguindo a mesma metodologia.

O segundo limiar ventilatório ou limiar anaeróbio (LAn), foi determinado usando o critério de aumento no equivalente ventilatório do oxigênio e do gás carbônico ($VE.VO_2^{-1}$ e $VE.VCO_2^{-1}$). Como exemplificado nas figuras 4 e 5.

Tanto o LA (quando necessário) e o LAn foram determinados por dois observadores independentes por inspeção visual nos gráficos impressos conforme as figuras 4 e 5, os quais serão plotados em intervalos de 5 segundos em função do VO_2 . Quando a escolha do limiar diferir por mais de 15 segundos entre os investigadores, um terceiro investigador independente foi consultado.

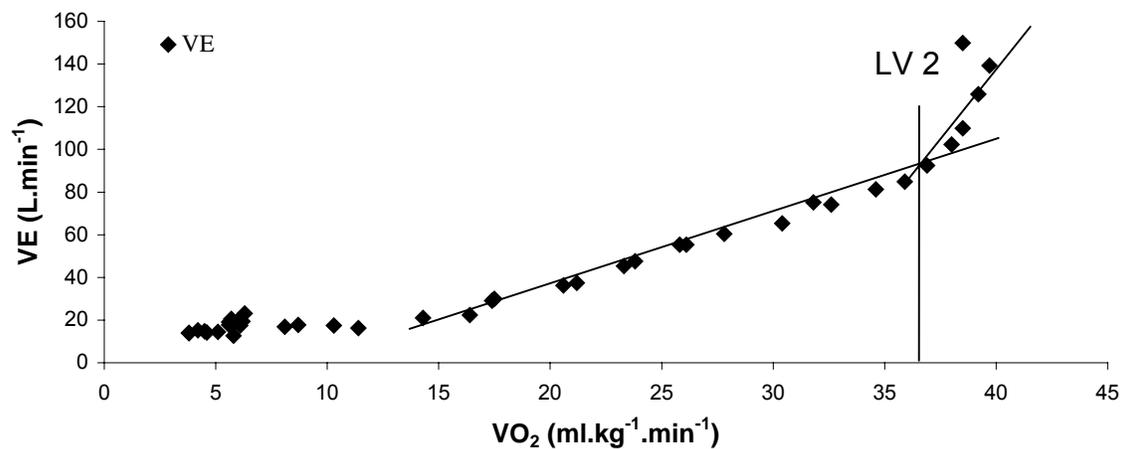


Figura 2 – Ventilação em relação ao consumo de oxigênio.

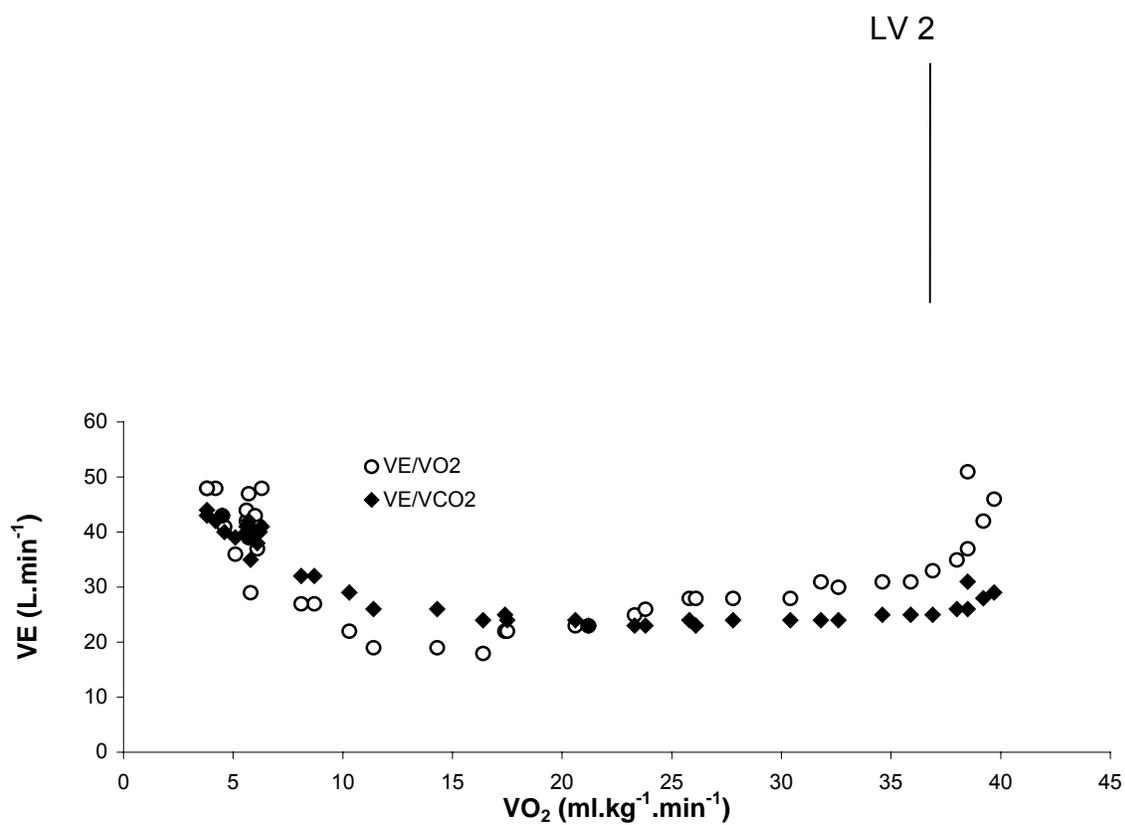


Figura 3 – Equivalentes ventilatórios do oxigênio e do dióxido de carbono em relação ao consumo de oxigênio.

3.4 - TESTE MÁXIMO PROGRESSIVO

No primeiro dia do experimento o voluntário realizou um teste de cargas progressivas, em cicloergômetro, segundo protocolo em escada.

O protocolo do teste máximo foi construído da seguinte forma: carga inicial foi igual para os dois grupos, assim como os incrementos. A intensidade inicial foi de 50 watts, e sofreram incrementos de 25 watts a cada minuto, até alcançarem a exaustão, foram determinados os valores de consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) e limiares ventilatórios através da ergoespirometria de circuito aberto (VIGUIE *et al.*, 1993). Os incrementos de carga foram suficientes para que o teste dure de 8 a 14 minutos (THODEN, 1991).

Durante o teste foram registrados os seguintes parâmetros: consumo de oxigênio por minuto (VO_2), eliminação de gás carbônico por minuto (VCO_2), ventilação por minuto (VE), razão de troca respiratória (RER), tempo e carga.

O critério utilizado para encerrar o teste foi à incapacidade do sujeito de continuar pedalando numa frequência de 60 rpm ou por solicitação voluntária.

3.5- DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DO EXERCÍCIO

Para prescrição da intensidade do exercício, diversos estudos têm mostrado que a utilização de limiares é mais adequada que o consumo máximo de oxigênio (SIMON *et al.*, 1986; SCHNEIDER *et al.*, 1990; LUCÍA *et al.*, 2000), embora exista ainda muita polêmica sobre aspectos fisiológicos, metodologias e terminologias empregadas para identificar os limiares ventilatórios e metabólicos durante o exercício progressivo e sua aplicação na avaliação da capacidade para o trabalho prolongado de indivíduos saudáveis (DENADAI, 1995; RIBEIRO, 1995).

Para determinar a intensidade do exercício foram calculados os METs referentes ao consumo de oxigênio do segundo limiar ventilatório. A partir desse valor e do peso corporal individual foi determinada a carga do teste (em watts) submáximo aeróbio de acordo com tabela do ACSM (2001) (Anexo 7).

3.6-TESTE AERÓBIO SUBMÁXIMO

O teste submáximo foi executado depois de realizado o teste máximo, onde cada sujeito começou a pedalar numa carga referente a 33% do consumo de oxigênio alvo por 3 minutos, aumentando logo em seguida para 66% desse consumo por mais 3 minutos, e então chegando ao consumo de oxigênio alvo onde continuou pedalando até completar o período de 1 hora, numa intensidade

relativa a 10% abaixo do segundo limiar ventilatório, que foi determinado por dois fisiologistas do exercício com vasta experiência.

Foram feitas punções venosas antes, logo em seguida ao término do teste, 20 minutos, 24, e 48 h após o teste.

3.7 - TESTE ANAERÓBIO

O teste anaeróbio de Wingate foi desenvolvido durante a década de 1970, no Instituto Wingate, em Israel (McARDLE, 1996). Desde sua criação, o teste anaeróbio de Wingate tem sido utilizado em diversos trabalhos com os mais diferentes tipos de sujeitos. A elaboração desse teste surgiu da necessidade de se obter mais informações sobre o desempenho anaeróbio, uma vez que em algumas atividades diárias e, principalmente, nas modalidades esportivas há a necessidade da realização de movimentos com grande potência, instantaneamente ou em poucos segundos (BAR-OR, 1987; SANTOS & SANTOS, 2002).

Para determinação de potência anaeróbia máxima, foi utilizado o teste de Wingate. O protocolo de exercício consistia de 30s de aquecimento sem carga e, durante o teste de Wingate (30s) os sujeitos eram incentivados verbalmente a pedalar o mais rápido possível contra uma carga constante previamente determinada, de 75 g.kg^{-1} de peso.

3.8- COLETA DA AMOSTRA SANGÜÍNEA

Nos dias do teste de carga fixa aeróbia e no teste anaeróbio, os indivíduos foram orientados a chegar ao laboratório 15 minutos antes do teste, ficando em repouso até o início do teste.

A amostra sangüínea correspondeu ao volume de 10 mL e foi obtida através de punção com seringa descartável e esterilizada em veia periférica no membro superior. Como anti-séptico será utilizado álcool a 92,6%. Os 10 mL necessários foram coletados e armazenados em frascos de plástico de 14 mL contendo 500 μ L da solução anticoagulante heparina.

As coletas sangüíneas foram realizadas da seguinte maneira: antes do teste, logo em seguida ao término do teste, 20 minutos, 24 h e 48 h após o teste. Todos os sujeitos absteram-se de treinamento e exercícios físicos por 24 h antes e até 48 h após o teste.

4-RESULTADOS:

4.1-Artigo I

Submetido a: Canadian journal Applied Physiology

COMPARISON OF OXIDATIVE PARAMETERS BETWEEN PROFESSIONALS INDOOR VOLLEYBALL PLAYERS AND UNTRAINED SUBJECTS AFTER WINGATE TEST

SILVEIRA MM^{1,2}, RUDNICKI M¹, PEREIRA TV¹, OLIVEIRA MR¹, FAYH APT², DAL-PIZZOL F⁴,
RODRIGUES CA³, FAGUNDES AO³, BEHR GA¹, OLIVEIRA AR², MOREIRA JCF¹

1- Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

2- Grupo de Estudos em Fisiologia do Exercício, LAPEX - Laboratório de Pesquisa do Exercício, Escola de Educação Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

3- CENESP - Centro de Excelência do Esporte - LAPEX - Laboratório de Pesquisa do Exercício, Escola de Educação Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

4- Departamento de Medicina, UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brazil.

Address correspondence to: Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, Departamento de Bioquímica,

ICBS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600 - anexo. Porto

Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-003. Tel: 55 51 316 55 49; FAX: 55 51 316 5535; e-mail:

mmsesef@walla.com / jcfm@vortex.ufrgs.br

ABSTRACT

We tested 11 professionals indoor volleyball players, and 11 untrained subjects in Wingate test. Catalase activity was assess as antioxidant enzymatic status; levels uric acid, total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), and phenolics compounds plasma as non-enzymatic index. Lipid peroxidation, through thiobarbituric acid reactivities species (TBARS) technique that measure plasma

malondealdehyde and 2,4 dinitrophenylhydrazine technique as protein oxidative damage. We found a significant increase in untrained subjects and volleyball professionals indoor athletes in uric acid levels 20 min after the test, higher phenolic compounds concentrations in untrained subjects, but none difference found in TRAP in both groups. However, athletes showed TBARS decreased immediately and 20 min after Wingate test, when compared with untrained subjects, as well as a increase significant in protein damage 20 min after test in untrained subjects. And athletes group demonstrated higher catalase activity than untrained subjects immediately after 30 s test. In conclusion this study, demonstrated that 30 s sprint anaerobic exercise is associated with acute changes in antioxidant status, as well as in oxidative stress parameters.

INTRODUCTION

The generation of free radicals and reactive oxygen species (ROS) may play important role in the initiation and promotion of degenerative conditions (Del Maestro *et al.*, 1980; Dillard *et al.*, 1978). During exercise free radical production increases and this overproduction may damage cells and tissues if it is not tightly controlled (Freeman *et al.*, 1982).

On the other hand, evidence suggest that exhaustive aerobic exercise also may lead to an increase in antioxidant defenses, resulting in enhanced protection against ROS, a decrease in accumulation of oxidative damage (Ashton *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 1982) and an alteration in blood antioxidant status (Clarkson, 1995). Nonetheless, little information about the effects of the anaerobic training on antioxidant defenses is available.

Currently, volleyball, a predominantly anaerobic sport (Kraemer & Hakkinen, 2001), has become one of the world's most popular sport and it is the second most important sport in Brazil. Athletes of Brazilian male Super League compete at a very high level and have a long competition season, which normally consists of two training sessions a day and one to two competition a week.

Thus, the present study was undertaken to determine whether Brazilian professional indoor volleyball players have a better ability to withstand oxidative stress due to anaerobic training-induced higher antioxidant defenses. Therefore, the aim of the present study was to compare the effects of a short-term supramaximal anaerobic exercise (30-s Wingate test) on various blood oxidative stress markers and antioxidant defenses between Brazilian professional indoor volleyball players and untrained subjects.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Eleven male professional athletes of indoor volleyball of Sport Club ULBRA, Brazil, winners of Brazilian Super League 2001/2002, aged 21-30 years, participated in this study. These athletes were compared with eleven untrained subjects, all healthy male volunteers, graduate and pos-graduate students from Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil aged 21-33 years. Untrained subjects were physically active but not involved in regular athletic training. Exclusionary criteria included smoking and chronic illnesses. No subject reported antioxidant compounds intake, including vitamins and/or medications. All refrained

from ethanol-containing beverages, strenuous physical exercise and caffeine for at least 24 hours before exercise testing day.

The Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brazil, RS) approved the protocol (n 2003225) and all subjects gave written informed consent.

Experimental procedure

The untrained subjects and athletes visited the laboratory on one day. Anthropometric data were collected by standard methods. The caloric intake was calculated through of 3 days dietary record using the software Nutri (UNIFEST, version 2.5, Brazil). A standardized questionnaire concerning week physical activities was applied for all subjects in order to estimate energy exchange.

Maximal power was performed on electromagnetic cycle ergometer (Cybex Cardiovascular System, The Bike, USA) for a period of 30 s (Wingate test), and the load was calculated for 75 g.kg^{-1} body weight. The exercise protocol consisted of 30 s of the warm-up without load and, during the Wingate test, subjects were asked to cycle for 30 s as fast as possible against the constant previously determined load. The power was measured each 5 seconds (Bar-Or, 1987).

Blood samples

Blood samples were obtained from antecubital region vein, at rest, immediately after the Wingate Test and 20 min after the test. The blood samples (10 ml) were transferred to a sodium-heparinized tube. Plasma and erythrocytes were separated immediately and kept at -75°C until analysis.

Analysis of malondialdehyde (MDA)

As an index of lipid peroxidation we used the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), as described by Drapper *et al.*, (1990). Briefly, 100 μ l plasma sample were mixed with 300 μ l trichloroacetic acid 10% and were centrifuged at 10000 x g for 10 min at 4°C. 400 μ l supernatant was mixed with 400 μ l 0.67% thiobarbituric acid and heated in boiling water bath for 30 min. TBARS were determined by absorbance at 532 nm and expressed as malondialdehyde equivalents (Equivalents MDA/mg protein).

Analysis of protein carbonyls

Protein carbonyls were assayed as described by Levine *et al.*, (1990). Briefly, 100 μ l plasma was mixed with 100 μ l of 10 mM 2,4 - dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 HCl. The mixture was incubated at room temperature for 1 h, followed by addition of 100 μ l 20% trichloroacetic acid and centrifuged at 15000 x g for 3 min. the protein pellets were washed three times with 500 μ l ethanol: ethyl acetate (1:1, v/v) and dissolved in 1 ml 6 M guanidine (pH 2.3). The peak absorbance at 370nm was measured to quantify protein carbonyls. The data are expressed as nmol of carbonyls/mg protein.

Analysis of catalase (CAT) activity

To determine CAT activity (E.C. 1.11.1.6), erythrocytes were sonicated in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and the resulting suspension was centrifuged at 3000 \times g for 10 min. The supernatant was used for enzyme assay. CAT activity was assayed by measuring the rate of decrease in H₂O₂ absorbance at 240 nm (Aebi, 1984).

Analysis of uric acid (UA) concentration

Uric acid was measured by spectrophotometry using a commercial kit (Wiener Lab., Uricostat enzimatico AA, Rosario, Argentina).

Analysis of plasma polyphenols

Total polyphenols in plasma were measured using the Folin-Ciocalteu-method modified (Singleton *et al.*, 1999). Plasma samples were directly assayed with tannic acid serving as standard. Results are expressed as total polyphenol (Equivalent tannic acid/mL plasma).

Analysis of plasma total reactive antioxidant potential (TRAP)

Plasma TRAP assay was measured as described by Lissi *et al.*, (1995). For TRAP determinations, the reaction medium consisted of glycine buffer (pH 8.6), 10 mM ABAP (Aldrich, USA), 10 μ M luminol (Sigma, USA) and different volumes of diluted plasma (1:1000) pondered by 100 μ g protein. Chemiluminescence was measured in out-of-coincidence mode of a liquid scintillation counter (Wallac 1409, Beckman, Palo Alto, CA, USA).

Experiments normalised by protein concentration, using the Lowry (1951) for TBARS and CAT activity, and Bradford's (1976) methods for protein carbonyl, using BSA as standard.

Statistical Analyses

All data are expressed as means \pm SEM. To test for differences between baseline values and post-training values the Wilcoxon test for paired data was used. Differences between groups were tested by the Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA-test followed by Dunn's procedure for multigroup analysis..

Page's test for ordered alternatives was used to test the significance of any trends observed according to the time. Data analyses were performed using the SPSS 8.0 software package (SPSS Inc, Chicago, IL) and MODSTAT statistical software (Bellingham, WA). Statistical significance was set at 0.05 level (two-tailed).

RESULTS

The physiological characteristics of all subjects are presented in table 1.

No significant differences were observed regarding age, percentage body fat, and fat mass between professional indoor volleyball players and untrained subjects. However, body mass, height, and lean mass were statistically higher in the athletes.

Absolute peak power was higher in the athletes group compared with untrained subjects (1002.36 ± 79.17 vs 756.09 ± 131.62 W, $p < 0.001$, respectively), nonetheless, relative peak power was similar in both groups (11.12 ± 0.79 vs 10.45 ± 1.33 W/Kg body mass, for athletes and untrained subjects, respectively).

Plasma levels of lipid peroxidation (Figure 1), was statistically higher in untrained subjects after and 20 min after exercise when compared athletes group ($p < 0.05$).

The levels of protein carbonyl content in plasma (Figure 2) was significantly increased at 20 min after Wingate test, when untrained subjects were compared to indoor volleyball players. However before and right after Wingate test no statistically differences were found.

Catalase activity (Figure 3) was statistically decreased immediately after exercise ($p=0.039$) in untrained subjects compared to professional indoor volleyball.

Uric acid levels in plasma were higher at 20 min after Wingate test in both groups ($p=0.001$, and $p=0.003$, professional indoor volleyball players and untrained subjects, respectively). But no significant differences between groups were observed (Figure 4).

Phenolic compounds levels in plasma were (Figure 5) significantly higher in untrained subjects when compared to volleyball athletes ($p<0.01$) in the three moments observed.

Trap in plasma was not statistically different (Table 2).

DISCUSSION

Our results provide evidences that anaerobic training induces adaptive responses in antioxidant systems and that the combined effects of these changes result in enhanced protection against ROS and a decrease in the accumulation of oxidative damage when athletes were submitted to acute exercise.

An exercise bout such as Wingate test strongly stimulates purine catabolism, as evidenced by the large increase in plasma of both hypoxanthine (Starling *et al.* 1996) and uric acid. Thus, we assumed that the activation of xanthine oxidase might play a major role in oxidative stress induced by short-term supramaximal anaerobic exercise.

Many indicators have been used for the characterization of oxidative stress exerted on cells and tissues. Here we have used the levels of plasma UA, SOD,

TRAP, TBARS, protein carbonyl level, polyphenols concentration, and erythrocytes activity enzyme catalase.

Few studies investigated the acute or chronic effects of non-aerobic exercise on biomarkers of oxidative stress (Groussard *et al.*, 2000; Groussard *et al.*, 2003; Ortenblad *et al.*, 1997). Many factors might contribute to oxidative stress induced by such exercise. Indeed, some authors (Granier *et al.* 1995) have demonstrated that the aerobic metabolism also enters into play during such exercise. The other more important factor is proton accumulation due to lactic acidosis, which has been demonstrated *in vitro* to be a potent prooxidant factor (Siesjo *et al.* 1985). Wingate test is well known to elicit anaerobic lactic metabolism. The autooxidation of catecholamine might also contribute more to the oxidative stress induced by short-term supramaximal anaerobic exercise, since very high levels of catecholamine have been measured after such exercise (Zouhal *et al.* 1998).

It is likely that training leads to chronic oxidative stress, which simultaneously induces a significant increase in antioxidant enzyme activity. This increase in antioxidant enzyme activity in response to training or to aerobic potential (Jenkins *et al.*, 1984) is interpreted by many authors as a positive adaptation to training. It should rather be interpreted, as suggested by Balakrishnan and Anuradha (1998), as the induction of the enzyme in response to enhanced free radical production associated with an oxidative stress. In our work, the catalase was higher in professionals indoor volleyball players than in untrained subjects immediately after test. Catalase activity in response to a single bout of

exercise is variable. For instance, Rokitzki *et al.*, (1994) found no difference in erythrocyte catalase activity levels following marathon running.

Superoxide radical is produced and is connected to the conversion of hemoglobin to methemoglobin in the erythrocyte during exercise (Watanabe *et al.*, 1990). Superoxide radical is converted into H_2O_2 by SOD. The H_2O_2 formed is transformed in HO^\bullet radical by Fe^{+2} and Cu^{+2} ions (Fenton's reaction), which are transition elements (Gleeson *et al.*, 1987). These reactive oxygen species and especially HO^\bullet radical convert the polyunsaturated fatty acids into a lipid peroxidation metabolite.

In this work, the level of lipid peroxidation was smaller in professionals indoor volleyball players than in untrained subjects, after exercise and 20 min recovery. The explanation can be that trained subjects have a higher fat oxidation during physical work than sedentary subjects. Exercise training is accompanied by metabolic adaptation that occurs in skeletal muscle and adipose tissue and it facilitates a greater delivery and oxidation of fatty acids during exercise. The trained state is characterized by an increased flux of fatty acids through smaller pools of adipose tissue energy. Moreover, the high performance level associated with high training demands may lead to a lack of biochemical adaptation. Athletes showed a great performance at Wingate test. TBARS levels were lesser after exercise and at 20 min recovery. Few studies have compared basal lipid peroxidation levels between trained and sedentary subjects and it has led to conflicting results. Kretzschmar *et al.* (1991) and Robertson *et al.* (1991) observed no difference. Marzatico *et al.* (1997) described two lipid peroxidative indices (conjugated dienes and malondialdehyde) which were higher in endurance athletes

than in sedentary subjects, indicating that daily training sessions may cause basal oxidative stress. On the other hand, Niess *et al.* (1996) reported that plasma levels of malondialdehyde were lower in trained runners than in untrained subjects. Strenuous endurance training was shown to reduce indices of oxidative stress following exhausting exercise (Miyazaki *et al.*, 2001). This is an important finding since single sprint exercise bouts are crucial components of many sports (athletism, collective sports...). However, in other studies, sportsmen exhibited lower tocopherol, ascorbic acid and GSH levels and higher lipid peroxidation markers than sedentary controls (Balakrishnan and Anuradha, 1998; Schröder *et al.*, 2000).

Protein carbonyl has been often used as a bona fide indicator of oxidative stress (Chevion *et al.*, 2000), and it reflects the degree of long-term oxidative stress (Reznick *et al.*, 1994). Caution should be exercised when evaluating its meaning. The turnover time for protein carbonyls is of many hours to days, unlike thiobarbituric acid reactive substances that turn over within minutes (Augustin *et al.*, 1997). This smaller oxidation in lipids and proteins in athletes can be a consequence of an activation of mechanisms that removes the oxidatively modified proteins from circulation, or alternatively, activation of an antioxidant mechanisms that removes ROS (Chevion *et al.*, 2000). Protein carbonyls can be determined spectrophotometrically by the reaction with a classical carbonyl reagent 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Levine *et al.*, 1990).

For the non-enzymatic antioxidant system, such an adaptation appears to be compromised. As they largely contribute to resting plasma non-enzymatic antioxidant levels, antioxidant intake of these compounds is likely to play a major

role in the protection of the body against the oxidative stress induced by chronic exercise. However, antioxidant intake in sportsmen is sometimes insufficient. Indeed, Groussard *et al.*, 2000, evaluated the daily antioxidant vitamin intake in sportsmen and observed that 100% of the population did not consume the RDA for vitamin E neither 60 % for vitamin C. Only β -carotene intake was appropriate.

Uric acid may act as an antioxidant both by binding iron and copper ions and by directly scavenging reactive oxygen species (Ames *et al.*, 1981). The rise in uric acid has been observed and well documented after various forms of aerobic and anaerobic exercise, (Duthie *et al.*, 1990; Gleeson *et al.*, 1987; Hellsten-Westing *et al.*, 1989), and this rise most likely result from enhanced purine oxidation in muscle (Hellsten-Westing *et al.*, 1989). The increase in plasma uric acid and polyphenols concentrations may serve to protect the body against oxidative stress induced by short term-exercise, by scavenging primarily reactive oxygen species (hydroxyl radical, superoxide anion and singlet oxygen) or by preventing reactive oxygen species formation by binding metal ions.

It is known that some flavonoids are excellent scavenger of free radicals like the hydroxyl radical and superoxide anion radicals (Husain *et al.*, 1987). Phenols antioxidants compounds act as ROS' scavengers and sometimes as metallic chelant, playing a role in the begining and in the propagation of oxidative process. Intermediary products resulted from oxidant actions are relatively stable due to aromatic ring's ressonance showed by this substances. Phenolic compounds and some derived are, hence, efficients to prevent lipidic peroxidation (Kanter *et al.*, 1993). Nevertheless, it is worth mentioning that the Folin–Ciocalteu phenol reagent

gives only an approximate estimate of the total phenolic content of plasma samples (Halliwell *et al.*, 1992).

We did not find increase in TRAP, but several studies have used this method to detect increases in oxidative stress after exercise (Child *et al.*, 1999; Ginsburg *et al.*, 2001; Santos-Silva *et al.*, 2001). However, Alessio *et al.* (1997) found that plasma total antioxidant capacity did not increase in response to a 30 min exercise, despite an increase in MDA. Another study found low total radical antioxidant potential (TRAP) in sportsmen (Sharpe *et al.*, 1996).

In conclusion, this study demonstrates that severe and brief anaerobic exercise is associated with acute changes in plasma non-enzymatic and erythrocytes enzymatic antioxidant defenses. It further suggests that in athletes the antioxidant intake is likely to play an important role both in maintaining the plasma antioxidant concentrations within the normal range and in protecting them against oxidative stress induced by acute or chronic exercise due to an adaptative process resulted from regular training, probably due to different mechanisms or different activities of specific and repair systems.

This study was supported by a grant from CNPq, FAPERGS and PROPESQ/UFRGS (2004).

REFERENCES

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. **Meth. Enzymol.** 105: 121-126.
- Alessio, H.M., Goldfarb, A.H., Cao, G. (1997). Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. **Int. J. Sport Nutr.** 7 (1), 1-9.
- Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E., and Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 78: 6858-6862.
- Ashton, T., Rowlands, C.C., Jones, E., Young, I.S., Jackson, S.K., Davies, B., and Peters, J. R. (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centered radicals in human serum following exhaustive exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.** 77: 498- 502.
- Augustin, W., Wiswedel, I., Noack, H., Reinheckel, T., and Reichelt, O. (1997). Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria. **Mol. Cell. Biochem.** 174:199-205.
- Balakrishnan, S.D., and Anuradha, C.V. (1998). Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. **Cell Biochem. Funct.** 16: 269-275.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 2: 248.
- Clarkson, P.M. (1995). Micronutrients and exercise: Anti-oxidants and minerals. **J. Sports Sci.** 13: S11-S24.

Bar-Or, O. (1987). The Wingate anaerobic test: an update on methodology, reliability and validity. **Sports Medicine**. 4: 381-394.

Chevion, S., Moran, D.S., Heled, Y., Shani, Y., Regev, G., Abbou, B., Berenshtein, E., Stadtman, E.R., Epstein, Y. (2003). Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. **PNAS**, 100 (9): 5119-5123.

Child, R., Brown, S., Day, S., Donnelly, H., Roper, H., Saxton, J. (1999). Changes in indices of antioxidant status, lipid peroxidation and inflammation in human skeletal muscle after eccentric muscle actions. **Clin. Sci**. 96, 105-115.

Davies, K.J.A., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A., and Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage by exercise. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 107: 1198-1205.

Del Maestro, R.F. (1980). An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta Physiol Scand**. 492:153-68.

Dillard, C. J., Litov, R. E., Savin, W. M., Dumclin, E. E., Tapple, A. L. (1978) Effect of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. **J. Appl. Physiol**. 45:927- 932.

Drapper, H.H., and Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzym.**, 186: 421-431.

Duthie, G.G., Robertson, J.D., Maughan, R.J., and Morrice, P.C. (1990). Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. **Arch. Biochem. Biophys**. 282: 78-83.

Freeman, B. A., and Crapo, D. (1982). Biology of disease: free radical and tissue injury. **Lab. Invest**. 47: 412-416.

Ginsburg, G.S., O'Toole, M., Rimm, E., Douglas, P.S., Rifai, N. (2001). Gender differences in exercise-induced changes in sex hormone levels and lipid peroxidation in athletes participating in the Hawaii Ironman triathlon. **Clin. Chim. Acta.** 305: 131-139.

Gleeson, M., Robertson, J.D., and Maughan, R.J. (1987). Influence of exercise on ascorbic acid status in man. **Clin. Sci.** 73: 501-505.

Granier, P., Mercier, B., Mercier, J., Anselme, F., Préfaut, C. (1995). Aerobic and anaerobic contribution to Wingate test performance in sprint and middle-distance runners. **Eur. J. Appl. Physiol.** 70:58-65.

Groussard, C., Machefer, G., Rannou, F., Faure, H., Zouhal, H., Sergent, O., Chevanne, M., Cillard, J., and Gratas-Delamarche, A. (2003). Physical fitness and plasma non-enzymatic antioxidant status at rest and after a Wingate test. **Can. J. Appl. Physiol.** 28(1): 79-92.

Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Monnier, M., Vincent, S., Sergent, O., Cillard, J., and Gratas-Delamarche, A. (2000). Short term maximal exercise increases free radical production. **The Physiologist.** 43: 369.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? **J. Lab. Clin. Med.** 119:598–620.

Hellsten-Westing, Y., Ekblom, B., and Sjödín, B. (1989). The metabolic relation between hypoxanthine and uric acid in man following maximal short-distance running. **Acta. Physiol. Scand.** 137: 341-345.

Husain, S.R., Cillard, J., and Cillard, P. (1987), **Phytochemistry**, 26: 2489-2491

Jenkins, R.R., Friendland, R., and Howald, H. (1984). The relationship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle. **Int. J. Sports Med.** 5: 11-14.

Kanter, M.M., Nolte, L.A., and Holloszy, J.O. (1993). Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. **J. Appl. Physiol.** 74: 965-969.

Kraemer, W.J., Hakkinen, K. (2001). Strength training for sport, Blackwell Science, 108-115.

Kretzschmar, M., Müller, D., Hübscher, J., Marin, E., and Klinger, W. (1991). Influence of aging, training and acute physical exercise on plasma glutathione and lipid peroxides in man. **Int. J. Sports Med.** 12: 218-222.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Meth. Enzymol.** 186, 464–478.

Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., Castillo, M.D. (1995). Evaluation of total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radicals Biol. Med.** 18:153-158.

Lowry, O.H., Rosebough, N.J., Farr, A.L., Randal, L.R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275.

Marzatico, F., Pansarasa, O., Bertorelli, L., Somenzini, L., Della Valle, G. (1997). Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. **J. Sports Med. Phys. Fitness** 37, 235-239.

Miyazaki, H., Oh-ishi, S., Ookawara, T., Kizaki, T. Toshinai, K., Ha, S., Haga, L. L., and Ohno, H. (2001). Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhaustive exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.** 84: 1-6.

Niess, A.M., Hartmann, A., Fuchs-Grunert, M., Poch, B., Speit, G. (1996). DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. **Int. J. Sports Med.** 17: 397-403.

Ortenblad, N.S., Madsen, K., Djurhuus, M.S. (1997). Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. **Am. J. Physiol.** 272 (41), R1258-R1263.

Reznick, A.Z., and Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol.** 233: 357-363.

Robertson, J.D., Maughan, R.J., Duthie, G.G., and Morrice, P.C. (1991). Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. **Clin. Sci.** 80: 611-618.

Rokitzki, L., Logemann, E., Sagredos, A. N., Murphy, M., Wetzel-Roth, W., and Keul, J. (1994). Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress. **Acta. Physiol. Scand.** 151: 149-158.

Santos-Silva, A., Rebelo, M.I., Castro, E.M., Belo, L., Guerra, A., Rego, C., Quintanilha, A. (2001). Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents.

Schröder, H., Navarro, E., Tramullas, A., Mora, J., and Galiano D. (2000). Nutrition antioxidant status and oxidative stress in professional basketball players:

Effects of a three compound antioxidative supplement. **Int. J. Sports Med.** 21: 146-150.

Sharpe, P.C., Duly, E.B., Mac A.D., McCrum, E.E., Mulholland, C., Stott, G., Boreham, C.A.G., Kennedy, G., Evans, A.E., Trinick, T.R. (1996). Total radical trapping antioxidant potential (TRAP) and exercise. **Q. J. Med.** 89:223-228.

Siesjo, B.K., Bendek, G., Koide, T., Westerberg, E., Wieloch, T. (1985). Influence of acidose on lipid peroxidation in brain tissues in vitro. **J. Cereb Blood Flow Metab.** 5:253-258.

Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Meth Enzymol.** 152-178.

Starling, R.D., Trappe, T.A., Short, K.R., Sheffield-Moore, M., Jozsi, A.C., Fink, W.J., Costill, D.L. (1996). Effect of inosine supplementation on aerobic and anaerobic cycling performance. **Med. Sci. Sports Exerc.** 28: 1193-1198.

Watanabe, H., Kobayashi, A., Yamamoto, T., Suzuki, S., Hayashi, H., Yamazaki, N. (1990). Alteration of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium. **Free Rad Biol Med.** 9:507-14.

Zouhal, H., Rannou, F., Gratas-Delamarche, A., Monnier, M., Bentue-Ferrer, D., Delamarche, P. (1998). Adrenal medulla responsiveness to the sympathetic nervous activity in sprinters and untrained subjects during a supramaximal exercise. **Int. J. Sport Med.** 19:172-176.

Table 1-Body composition

	Indoor Volleyball Players	Untrained Subjects
Body mass (kg)	90.37 ± 6.30	73.2 ± 9.05 *
Height (cm)	195.83 ± 6.42	177.8 ± 7.4 *
Age (years)	24.09 ± 2.88	25.8 ± 4.7
% BF (%)	10.00 ± 3.00	14.17 ± 4.62
Fat mass (kg)	9.41 ± 2.46	10.6 ± 4.22
Lean mass (kg)	80.96 ± 5.90	62.80 ± 6.81 *

Means ± SEM, * difference between groups, p<0,05.

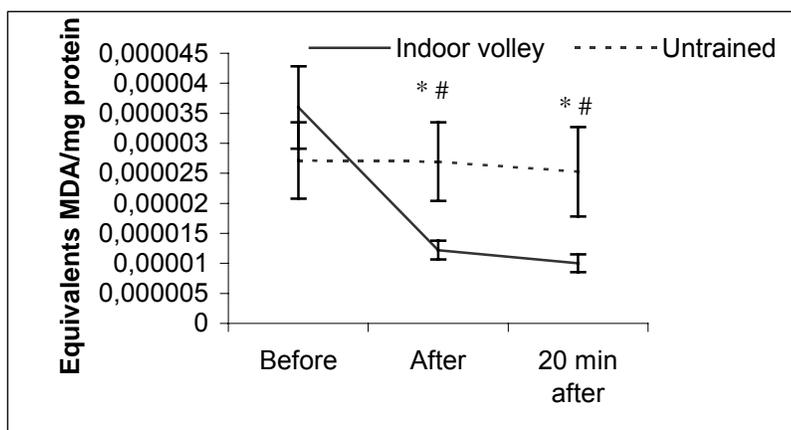


Figure 1 - Time course of plasma malondialdehyde concentration (MDA) detected by thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) method, before, immediately after the Wingate test and 20 min of recovery. Results are expressed as means ± SEM. * difference between groups, p<0.05 after and 20 recovery respectively, # difference in volleyball players between before and after, and before and 20 min recovery.

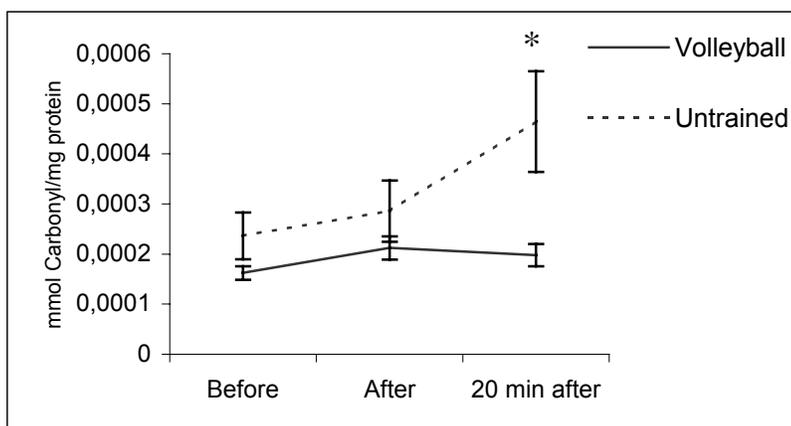


Figure 2 - Time course of plasma levels of protein carbonyl content, detected by dinitrophenylhydrazine (DNPH) method; before, immediately after the Wingate test and 20 min of recovery. Results are expressed as means ± SEM. * difference between groups, p= 0.05, between groups.

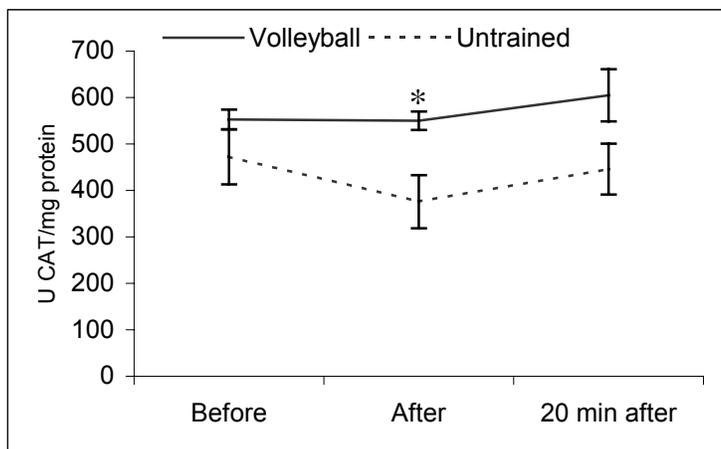


Figure 3 - Time course of erythrocytes catalase activity (CAT) detected by decay of hydrogen peroxide method, before, immediately after the Wingate test and 20 min of recovery. Results are expressed as means \pm SEM. * difference between groups, $p=0.039$.

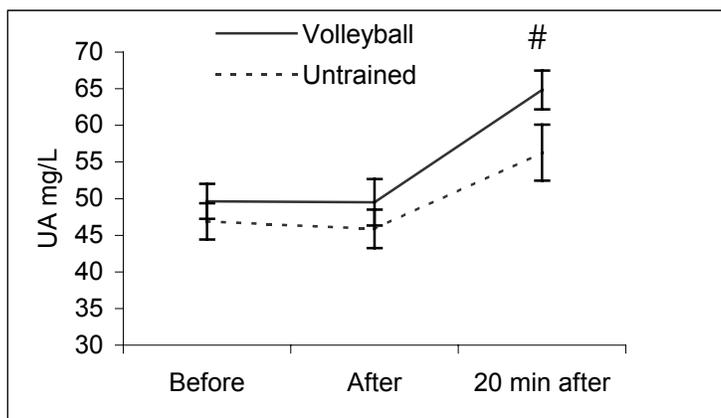


Figure 4 - Time course of uric acid (UA), before, immediately after and 20 min of recovery of the Wingate test. Results expressed as means \pm SEM. # difference between before and 20 min after, $p=0.001$ and 0.003 indoor volleyball players and untrained subjects, respectively.

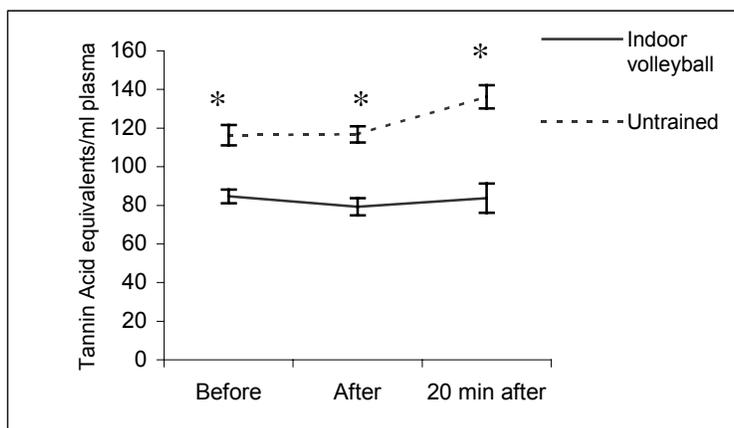


Figure 6 - Time course of plasma polyphenols compounds; before, immediately after and 20 min of recovery of the Wingate test. Results expressed as means \pm SEM. * difference between groups, $p < 0.001$.

Table 2 - TRAP in plasma. None difference found.

Volleyball							
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	
System	100	100	100	100	100	100	
Before	77.13	94.81	93.40	84.25	91.66	89.17	
After	85.28	98.31	98.05	88.79	93.14	92.93	
20 min after	70.27	97.40	97.94	120.55	96.96	96.09	
Untrained							
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	
System	100	100	100	100	100	100	
Before	59.16	99.89	98.32	96.58	90.85	89.45	
After	60.68	103.19	102.90	97.24	94.44	96.25	
20 min after	46.46	104.25	141.21	97.41	94.52	93.46	

4.2-Artigo II

Submetido a: European Journal Applied Physiology

THE EFFECT OF ACUTE ANAEROBIC AND AEROBIC EXERCISES ON OXIDATIVE DAMAGE AND PROTECTION SYSTEMS IN BEACH VOLLEY PLAYERS AND UNTRAINED SUBJECTS

SILVEIRA MM^{1, 2}, RUDNICKI M¹, PEREIRA TV¹, OLIVEIRA MR¹, FAYH APT², DAL-PIZZOL F⁴,
RODRIGUES CA³, FAGUNDES AO³, BEHR GA¹, OLIVEIRA AR², MOREIRA JCF¹

1- Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

2- Grupo de Estudos em Fisiologia do Exercício, LAPEX - Laboratório de Pesquisa do Exercício, Escola de Educação Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

3- CENESP - Centro de Excelência do Esporte - LAPEX - Laboratório de Pesquisa do Exercício, Escola de Educação Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

4- Departamento de Medicina, UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brazil.

Address correspondence to: Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, Departamento de Bioquímica,

ICBS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600 - anexo. Porto

Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-003. Tel: 55 51 316 55 49; FAX: 55 51 316 5535; e-mail:

mmsefef@walla.com / jcfm@vortex.ufrgs.br

ABSTRACT

Aerobic and anaerobic exercise may increase free radical production. On the other hand, previous studies report that aerobic physical fitness may modulate non-enzymatic plasma antioxidant defense. In addition, there's no studies showing if anaerobic exercise also own this ability. Therefore, we hypothesis that volleyball, a predominantly anaerobic exercise, modulate non-enzymatic plasma antioxidant defenses. Six beach volley players and 11 untrained subjects performed Wingate and aerobic 1 hour tests. Blood was collected before, after, 20 min, 24 h after the tests. Catalase activity was assessing as antioxidant enzymatic status; levels uric acid and phenolics compounds plasma as non-enzymatic index. Lipid peroxidation, through thiobarbituric acid reactives species (TBARS) technique that measure

plasma malondealdehyde and 2,4 dinitrophenylhydrazine technique as protein oxidative damage. We found a significant decrease in untrained subjects uric acid levels immediately after aerobic test, and increased in both groups uric acid 20 min after anaerobic test. Catalase activity none changes between groups, as well as between exercises. However, just untrained subjects showed TBARS increase immediately after aerobic test. The protein oxidative damage was increased in untrained subjects immediately after aerobic test and also in 20 min recovery in anaerobic test. Phenols compounds concentrations were higher in beach volley players than untrained subjects during anaerobic exercise, but just in 20 min recovery in aerobic exercise. These findings demonstrated that beach volley players are better protected than untrained subjects when submitted in aerobic and anaerobic exercises.

Key words: Volleyball players, Beach volley, untrained subjects, exercise, oxidative stress, antioxidants, catalase enzyme, uric acid.

INTRODUCTION

Cells continuously produce free radicals and reactive oxygen species (ROS) as part of metabolic processes. Exercise may produce an imbalance between ROS production and antioxidants. Approximately 5% of total oxygen present in the mitochondria forms free radicals. As oxidative phosphorylation increases in response to exercise, there will be a concomitant increase in free radicals. Another free radicals sources are activated by exercise including prostanoid metabolism, xanthine oxidase, NAD(P)H oxidase, and several secondary sources, such as the release of radicals by macrophages recruited to repair tissue damaged (Jackson *et al.*, 2000).

Oxygen utilization may increase 10-15 folds during exercise endurance in association with an increase superoxide and hydrogen peroxid overproduction

(Boveris *et al.*, 1972, Sjödín *et al.*, 1990). Thus, acute and prolonged physical exercise may result in an oxidative stress (Sjödín *et al.*, 1990), which could lead to physiological damage induced by free-radical-mediated lipid peroxidation (Davies *et al.*, 1982, Dillard *et al.*, 1978).

Data concerning sprint anaerobic exercise and oxidative stress remain very scarce. Some factors that could lead to oxidative stress resulted from short-term supramaximal anaerobic exercise-induced by protons release due to acidosis, catecholamine autoxidation, ischemia-reperfusion syndrome (Hellsten-Westling *et al.*, 1989). The dismutation of $O_2^{\bullet -}$ generates H_2O_2 , a specie generated by several oxidase enzymes *in vivo*, including xantine oxidase, urate oxidase and D-amino acid oxidase. The hydrogen peroxide is usually removed by two type of enzymes. Catalase directly decomposes of H_2O_2 to ground-state O_2 , and glutathione peroxidase (Hellsten-Westling *et al.*, 1989).

To prevent exercise-induced oxidative stress, the organism should be well equipped with antioxidant defense system including enzymes such as catalase (CAT), and non-enzymes substances such as uric acid (Davies *et al.*, 1982), and polyphenols compounds plasma (Halliwell & Gutteridge, 1999).

The oxidative damage can be stimulated by lipid peroxidation (LPO), wich is the attack of ROS in lipids. It can be estimated by assessment of the main product, which is malondialdeyde (Hellsten-Westling *et al.*, 1989). In addition to lipid peroxidation, ROS are known to cause oxidative modifications of proteins (including enzymes) and nucleic acids (Stadman, 1990)

The beach volley is a recent olympic sport. Because the Brazilian couple is the olympic champion, beach volley practice is increasing in Brazil. However there aren't studies in the literature so we believe this is the first work to evaluate the stress oxidative in beach volley players.

The aim of this study was to compare the effect of anaerobic and aerobic exercise on oxidative parameters in beach volley players and in untrained subjects. Blood samples were collected to determine catalase (CAT) activity, thiobarbituric acid reactives species (TBARS), uric acid (UA), damage protein oxidative, polyphenols compounds levels.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Eleven untrained subjects and six regional level beach volley athletes volunteered in this study. They were nonsmoking and did not show any chronic disease. The physical and physiological characteristics are shown in table 1. All subjects were requested to refrain from exhaust training/physical activity for 24 h before the test. Both groups received a standard diet (100% RDA). Subjects were informed about possible risks and discomforts associated with the experiments before giving their written consent to participate. The Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul approved the protocol (n 2003225).

Experimental procedure

Body composition was performed through the Jackson & Pollock protocol (1978). The caloric expenditure was calculated using the software Nutri, UNIFESP (version 2.5).

Exercise protocolo

Experimental procedures were done in three different occasions separated by at least one week.

In the first day maximal power was performed on electromagnetic frengage cycle ergometer Cybex Cardiovascular System (The Bike, EUA), during a period of 30 s (Wingate test). The load was calculated for 75 g.kg^{-1} body weight. Exercise protocol consisted in 30 s of warm-up without load and maximal cycling for 30 s. The power was measured each 5 seconds. Subjects were verbally encouraged to give maximal effort during the test (Bar-Or, 1987)

In the second situation maximal oxygen uptake test consisted of a progressive test in cycle ergometer (Cybex, The Bike, USA). Initial load was 50W and increased 25W every minute, until exhaustion. Subject was accopedled with a ergoespirometer (MGC CPX/D Med Graphics Corporation, USA) according Lucía (2000) protocol. To determinate the load of aerobic test we used ventilatory thresholds. Oxygen consumption was transformed in METs and according to body mass, the workload was assessed through the table in American College of Sports Medicine Guidelines, 2000. The target load for aerobic test was 10% below the second ventilatory threshold.

In the third occasion subjects performed the aerobic test wich consisted in exercising 3 min at 33% of the target load, 3 min at 66% of the target load followed by exercising in the target load until complete 1 hour of exercise.

Blood samples

Blood samples were obtained from antecubital region vein at rest, immediately after and 20 min after both anaerobic and aerobic tests. Blood

samples (10 ml) were transferred to a sodium-heparinized tube. Plasma and erythrocytes were separated immediately and kept at -75°C until analysis.

Analysis of malondialdehyde (MDA)

As an index of lipid peroxidation we used the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), as described by Drapper *et al.*, (1990). Briefly, 100 µl plasma sample were mixed with 300 µl trichloroacetic acid 10% and were centrifuged at 10000 x g for 10 min at 4°C. 400 µl supernatant was mixed with 400 µl 0.67% thiobarbituric acid and heated in boiling water bath for 30 min. TBARS were determined by absorbance at 532 nm and expressed as malondialdehyde equivalents (Equivalents MDA/mg protein).

Analysis of protein carbonyls

Protein carbonyls were assayed as described by Levine *et al.*, (1990). Briefly, 100 µl plasma was mixed with 100 µl of 10 mM 2,4 - dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 HCl. The mixture was incubated at room temperature for 1 h, followed by addition of 100 µl 20% trichloroacetic acid and centrifuged at 15000 x g for 3 min. the protein pellets were washed three times with 500 µl ethanol: ethyl acetate (1:1, v/v) and dissolved in 1 ml 6 M guanidine (pH 2.3). The peak absorbance at 370nm was measured to quantify protein carbonyls. The data are expressed as nmol of carbonyls/mg protein.

Analysis of catalase (CAT) activity

To determine CAT activity (E.C. 1.11.1.6), erythrocytes were sonicated in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and the resulting suspension was centrifuged at 3000 × g for 10 min. The supernatant was used for enzyme assay. CAT activity

was assayed by measuring the rate of decrease in H₂O₂ absorbance at 240 nm (Aebi, 1984).

Analysis of uric acid (UA) concentration

Uric acid was measured by spectrophotometry using a commercial kit (Wiener Lab., Uricostat enzimatico AA, Rosario, Argentina).

Analysis of plasma polyphenols

Total polyphenols in plasma were measured using the Folin-Ciocalteu-method modified (Singleton *et al.*, 1999). Plasma samples were directly assayed with tannic acid serving as standard. Results are expressed as total polyphenol (Equivalents tannic acid/mL plasma).

Experiments normalised by protein concentration, using the Lowry (1951) for TBARS and CAT activity, and Bradford's (1976) methods for protein carbonyl, using BSA as standart.

Statistics analysis

All data are expressed as means \pm SEM. To test for differences between baseline values and post-training values the Wilcoxon test for paired data was used. Mann-Whitney test was used to detect differences between the two groups. To test the significance of any trends observed according to the time the Page's test for ordered alternatives was used. Data analyses were performed using the SPSS 8.0 software package (SPSS Inc, Chicago, IL) and MODSTAT statistical software (Bellingham, WA). Statistical significance was set at 0.05 level (two-tailed).

RESULTS

Body composition, diet uptake and anaerobic and maximal testes performance are shown in table 1.

As shown in Figure 1, catalase activity did not change during the course time of the exercise between both exercises and groups.

It has been demonstrated in several works that ROS are involved in the lipid peroxidation. In our study we observed that LPO increased (Figure 2) immediately after aerobic exercise in untrained group ($p < 0.05$). There were no differences regarding anaerobic exercise.

Oxidative modifications of amino acid residues include derivatization to reactive carbonyl derivatives and links have been established between degrees of reactive carbonyl accumulation. The oxidative protein damage (Figure 3) had a similar response to LPO, increasing immediately after aerobic exercise ($p < 0.05$).

Uric acid levels (Figure 4) showed significant increase 20 min after anaerobic exercise in both groups ($p < 0.05$). After aerobic exercise this levels decreased in untrained subjects ($p < 0.05$). No differences were found when anaerobic was compared to aerobic exercise in both groups.

The polyphenols compounds in plasma (Figure 5) was higher in beach volley players than in untrained subjects in all periods ($p < 0.05$) in anaerobic exercise. In aerobic exercise, polyphenols compounds plasma was higher after 20 min recovery in beach players than in untrained subjects ($p < 0.05$).

DISCUSSION

In the present study CAT activity did not change, even when we compared aerobic and anaerobic exercises. However, Inal *et al.*, 2001, observed that CAT activity was increased compared to preexercise values. Robertson *et al.*, 1991, have reported an increase in CAT activity after 1 week of exercise. Most studies have revealed no significant alteration in CAT activity with acute exercise (Meydani & Evans, 1993, Ji, 1995). CAT activity has been shown to increase after training in skeletal muscle by some authors (Quintanilha, 1984, Oh-Ishi *et al.*, 1997, Jenkis, 1983, Hollander *et al.*, 1999). Nevertheless, most studies have reported no change in muscle CAT with training (Meydani & Evans, 1993, Jenkis, 1988, Ji, 1995), and few studies even reported a decrease (Leeuwenburgh *et al.*, 1994, Laughlin *et al.*, 1990).

When polyunsaturated fatty acids on biomembranes are attacked by free radicals in the presence of molecular oxygen, a chain of peroxidative reactions occurs, eventually leading to the formation of hydrocarbon gases (e.g. methane, ethane and pentane) and aldehydes (e.g. malonaldehyde, MDA) (Davies *et al.*, 1982, Kumar *et al.*, 1992). Byproducts of lipid peroxidation are the most frequently studies markers of oxidative tissue damage during exercise. Lipid peroxidation causes an increase in the structure and viscosity of the membrane bilayer, changes the thermotropic phase behaviour, decreases the electrical resistance and facilitates phospholipid exchange between the two monolayers. Upon lipid peroxidation, membrane proteins are cross-linked and their mobility decreases (Leeuwenburgh *et al.*, 1994). MDA content was found to be increased during

exercise in a variety of tissues, and the extent of lipid peroxidation also appears to depend on exercise intensity (Reid *et al.*, 1994).

Studies reporting increases in malondialdehyde (MDA) in response to exercise are controversial (Viinikka *et al.*, 1984). In our work, we found significant increase in MDA content (Figure 2), only in untrained subjects immediately after aerobic exercise ($p < 0.05$). Niess *et al.*, 1996, measured plasma levels of MDA in trained and untrained individuals at rest, before and after an exhaustive round of exercises (Nies *et al.*, 1996). They found no significant increases in MDA in either group following a treadmill test to exhaustion, either at 15 min post-exercise or 24 h post-exercise. Moderately trained subjects who ran for 2.5 h on a treadmill showed no change in plasma MDA (Duthie *et al.*, 1990, Denbarch *et al.*, 1993). Similarly, there were no documented changes at rest, before or after 4 weeks of high intensity rowing training in plasma MDA levels (Denbarch *et al.*, 1993) in athletes.

In this study the protein damage changed significantly in untrained subjects 20 min after anaerobic exercise and immediately after aerobic exercise ($p < 0.05$). A difference between groups immediately after aerobic exercise was found ($p < 0.05$). It has been reported that exercise increases the rate of both protein synthesis and degradation (Radák & Goto, 1998). The increase in some proteasome complex activity with maintained level of oxidatively modified protein concentration suggests that ROS formation was balanced by antioxidant and repair systems. It has been shown that oxidative modifications of proteins induce protein degradation (Davies, 1993, Grune *et al.*, 1997). The proteasome complex could be induced by some other factors, such as cell division, antigen processing and NF- κ B (Grune *et al.*,

1997). Interestingly, the NF- κ B activity can be induced by exercise (Sen *et al.*, 1997).

Aerobic exercise is accompanied by an increase in the generation of ROS in the skeletal muscle which can result in tissue damage (Davies *et al.*, 1982). However, it is likely that adaptive response such as upregulation of antioxidant enzyme activities and other protective mechanisms can be induced by regular and moderate exercise, and in this way general protective activity is acquired to cope with stronger stress which might be encountered later (Booth *et al.*, 1998). Under anaerobic conditions due to exhaustive exercise a large amount of ADP would be formed upon ATP depletion in the skeletal muscle. ATP would then be regenerated at the expense of two molecules of ADP by the catalytic action of adenylate kinase, AMP being formed as a by-product which is metabolized to adenosine and then to hypoxanthine by adenosine deaminase. Hypoxanthine would diffuse out from the muscle into the circulating blood and thus be provided as a substrate for xanthine oxidase located on the surface of endothelial cells of the lung or in circulation, generating active oxygen species during the enzyme reaction.

Uric acid increased during anaerobic exercise trial in both groups ($p < 0.05$). As seen in Fig. 4, anaerobic exercise induced an increase in uric acid plasma concentration from 46.89 ± 2.48 and 43.93 ± 3.44 mg.L^{-1} pre-race to 56.28 ± 3.64 and 58.41 ± 4.72 mg.L^{-1} by pos-race, in untrained subjects and beach volley players, respectively. Likely due to increased ATP catabolism resulted from exhaustive exercise (Halliwell & Guteridge, 1999). Uric acid is the antioxidant compound that protects against certain free radicals (i.e. hydroxyl). The increase in

plasma uric acid levels after intense exercise is a result of accelerated purine metabolism in muscle by xanthine oxidase activation (Hellsten-Westling *et al.*, 1989, Groussard *et al.*, 2000). In our study after aerobic exercise uric acid plasma concentration decreased from 48.78 ± 2.45 pre-race to 44.89 ± 2.13 by pos-race, in untrained subjects ($p < 0.05$). Exercise may require an increase in the activity of adenylate cyclase (Sjodin *et al.*, 1990, Liu *et al.*, 1999) (or myokinase in muscle (Brooks *et al.*, 2000) acting as an additional source of energy by producing 1 ATP and 1 AMP from 2 ADP (Brooks *et al.*, 2000). While the ATP is used for energy, the AMP is degraded to IMP (Hellsten, 2000). IMP is catabolized to hypoxanthine, to xanthine, and finally to uric acid. During intensive exercise, there is increase likelihood that the enzyme responsible for the conversion of xanthine to uric acid will be xanthine oxidase rather than xanthine dehydrogenase. While xanthine dehydrogenase uses NADH as the electron acceptor, xanthine oxidase uses molecular oxygen, generating the superoxide radical as a by-product (Hellsten, 2000), likely contributing to oxidative stress during exercise.

An other non-enzymatic antioxidant is the polyphenol, which is a group of polyphenolic substances ubiquitous found in vegetables (Graham, 1992). Among the principal properties that may account for the potential health benefits of flavonoids is their antioxidant activity (Rice-Evans *et al.*, 1996). Several *in vitro* studies have demonstrated that flavonoids can scavenge superoxide (Afanas'ev *et al.*, 1989), hydroxyl (Husain *et al.*, 1987), peroxy radicals (Lotito & Fraga, 1998, Serafini *et al.*, 1996), and inhibit lipid peroxidation in different systems (Terao *et al.*, 1994, Zhang *et al.*, 1997). *In vitro* studies have consistently demonstrated that flavonoids have significant antioxidant activity due to their ability to scavenge ROS and chelate

metal ions (Renaud & Guenguen, 1998, De Lorgeril *et al.*, 1999, Sesso *et al.*, 1999). Therefore, the consumption of beverages, as well as other flavonoids-containing foods (Sesso *et al.*, 1999), has been proposed as a useful practice to limit oxidative damage in the body. However, studies with supplementation of these compounds have produced conflicting results (Serafini *et al.*, 1996, Maxwell & Thorpe, 1996, Da Silva *et al.*, 1998), suggesting that the evidence for antioxidant activity of flavonoids *in vitro* cannot be extrapolated to the *in vivo* situation, as the bioavailability of these compounds may be limited. In our study, the higher concentration of polyphenols presented in beach volley players might protect against lipid peroxidations and protein damage. Nevertheless, it is worth mentioning that the Folin–Ciocalteu phenol reagent gives only an approximate estimate of the total phenolic content of plasma samples (Halliwell *et al.*, 1992).

In conclusion, our results show that beach volley players present predominantly anaerobic training. They also show greater non-enzymatic plasma defense compared to untrained subjects, suggesting that regular training-induced beneficial effects on health are partly due to an adaptative process that involves reduced accumulation of protein damage, no change in lipid peroxidation, higher uric acid and high plasma polyphenols levels, probably related to a healthier diet. It can be explained possibly due to different mechanisms or different activities of specific antioxidant and repair systems.

This study was supported by a grant from CNPq, FAPERGS and PROPESQ/UFRGS (2003).

REFERENCES

ACMS's Guidelines for exercise testing and Prescription. 6 ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 2000.

Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. **Meth. Enzymol.** 105: 121-126.

Afanas'ev, I.B., Dorozhoko, A.I., Brodskii, A.V., kostyuk, V.A., Potapovitch, A.I. (1989). Chelanting and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin on lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.** 38: 1763-1769.

Alessio, H.M., Hagerman, A.E., Fulkerson, B.K., Ambrose, J., Rice, R.E., Wiley, R.L. (2000). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 32, 1576- 1581.

Bar-Or, O. (1987). The Wingate anaerobic test: an update on methodology, reliability and validity. **Sports Medicine.** 4: 381-394.

Booth, F.W., Tseng, B.S., Fluck, M., Carson, J.A. (1998). Molecular and cellular adaptation of muscle in response to physical training. **Acta Physiol. Scand.** 162, 343–350.

Boveris, A.N., Oskina, N., and Chance, B. (1972). Cellular production of hydrogen peroxide.. **Biochem. J.**, 128: 617-630.

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 2: 248.

Brooks, G., Fahey, T., White, T., Baldwin, K. *Exercise physiology human bioenergetics and its applications*. Mountain View, CA: Mayfield Publishing Company; 2000.

Da Silva, E.L., Piskula, M., Terão, J. (1998). Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. **Free Radic. Biol. Med.** 24: 1209-1216.

Davies, K.J.A., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A., and Parker, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Arch. Biochem. Biophys.**, 209: 539-554.

De Lorgenil, M., Salen, P., Martin, J-L., Moniaud, I., Delaye, J., Marmelle, N. (1999). Mediterranean diet, traditional risks factors and the rate of cardiovascular complications after myocardium infarction: final report of the Lyon Diet Heart study. **Circulation.** 99:779-785.

Dernbach, A.R., Sherman, W.M., Simonsen, J.C., Flowers, K.M., Lamb, D.R. (1993). No evidence of oxidative stress during high intensity rowing training.. **J. Appl. Physiol.** 74: (5), 2140- 2145.

Dillard, C.J., Litov, R.E., Sawin, W.M., Dumelin, E.E. and Tappel, A.L. (1978). Effect of exercise, vitamin E and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. **J. Appl. Physiol.**, 45: 927-932.

Drapper, H.H., and Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzym.**, 186: 421-431.

Dufaux, B., Heine, O., Kothe, A., Prinz, U., Rost, R. (1997). Blood glutathione status following distance running. **Inter. J. Sports Med.** 18, 89-93.

Duthie, G.G., Robertson, J.D., Maughan, R.J., Morrice, P.C. (1990). Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. **Arch. Biochem. Biophys.** 282 (1), 78-83.

Graham, H.N. (1992). Green tea composition, consumption and polyphenols chemistry. **Prev. Med.** 21: 334-350.

Groussard, C., Rannou-Beckono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Vincent, S., Sergent, O., Cillard, J., Gratas-Delamarche, A. (2003). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidant after a single sprint anaerobic exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.** 89: 14-20.

Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Monnier, M., Vincent, S., Sergent, O., Cillard, J., and Gratas-Delamarche, A. (2000). Short term maximal exercise increases free radical production. **The Physiologist.** 43: 369.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? **J. Lab. Clin. Med.** 119:598–620.

Hellsten, Y. The role of xanthine oxidase in exercise. In: Sen, C.; Packer, L.; Hanninen, O., eds. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. Amsterdam: Elsevier; 2000:153–176.

Hellsten, Y., Tullson, P., Richter, E., Bangsbo, J. (1997). Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise. **Free Radic. Biol. Med.** 22:169–174.

Hellsten-Westing, Y., Ekblom, B., Sjödin, B. (1989). The metabolic relation between hypoxa, thine and uric acid in man following maximal short distance running. **Acta Physiol Scand.** 137:341–345.

Husain, S.R., Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**. 26: 2489-2491.

Inal, M., Akyüz, F., Turgut, A., and Getsfrid, M. (2001). Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. **Med. Sci. Sports Exerc.** 33 (4), 564- 567.

Jackson, A.S., Pollock, M.L. (1978) Generalized equations for predicting body density of men. **Brit. J. Nutr.** 40: 497- 504.

Jackson, M.J. In: Hanninen O, Packer L, Sen CK. (eds), Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise (2000). Elsevier, Amstredam, 57-68.

Jenkis, R.R. Free radicals chemistry relationship to exercise. (1988). **Sports Med.** 5: 156-170.

Ji, L.L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. (1993). **Med. Sci. Sports Exerc.** 25: 225- 231.

Kostka, J., Blazicek, P., Marko, M., Grna, J.D., Kvetnansky, R., Vidas, M. (2000). Insulin, catecholamines, glucose and antioxidant enzymes in oxidative damage during different loads in helthly humans. **Physiol. Res.** 49, S95- S100.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Meth. Enzymol.** 186, 464–478.

Liu, M., Bergholm, R., Makimmattila, S., Lahdenpera, S., Valkonen, M., Hilden, H., Yki-Jarvinen, H., Taskinen, M. (1999). A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. **Am. J. Physiol.** 273: E1083–E1091.

Lotito, S.B., Fraga, C.G. (1998). (+)-Catechin prevents human plasma oxidatio. **Free Radic. Biol. Med.** 24: 435-441.

Lowry, O.H., Rosebough, N.J., Farr, A.L., Randal, L.R.J. 91951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275.

Lucía, A., Hoyos, J., Pérez, M., Chicharro, J.L. (2000). Heart rate and performance parameters in elite cyclists: a longitudinal study. **Med. Sci. Sports Exerc.** 32 (10): 1777-1782.

Marzatico, F., Pansarasa, O., Bertorelli, L., Somenzini, L., Della Valle, G. (1997). Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. **J. Sports Med. Phys. Fitness**, 37, 235- 239.

Maxwell, S., Thorpe, G. (1996). Tea flavonoids have little short term impact on serum antioxidant activity. **BMJ.** 313: 229.

Niess, A.M., Hartmann, A., Fuchs-Grunert, M., Poch, B., Speit, G. (1996). DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. **Inter. J. Sports Med.** 17, 397- 403.

Packer, L. (1986). Mitochondria, oxygen radicals and animal exercise. **Proc Inte. Symp. Membr. Muscle**, 135-147.

Renaud, S., Guenguen, R. (1998). The French paradox and wine drinking. Novartis Foundation Symp. 216: 208-217.

Rice-Evans, C.C., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavooids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.** 20: 933-956.

Robertson JD, Maughan RJ, Duthie GG, and Morrice PC. (1991). Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. **Clin. Sci.** 80, 611-618.

Rokitski, L., Logemann, E., Sagredos, A., Murphy, M., Wetzel-Roth, W., Keul, J. (1994). Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress. **Acta Physiol. Scand.** 151:149– 158.

Serafini, M., Ghiselli, A., Ferro-Luzzi, A. (1996). *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. **Eur. J. Clin. Nutr.** 50:28-32.

Sesso, H.D., Gaziano, J.M., Burig, J.E., Hennekens, C.H. (1999). Coffee and tea intake and the risks of myocardium infarction. **Am. J. Epidemiol.** 149: 162-167.

Sjodin, B., Westing, Y.H., and Apple, F.S. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Med.** 10: 236-254.

Stadman, E. R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of protein: Biochemical mechanism and biological consequences. **Free Radic. Biol. Med.** 9:315-326.

Terao, J., Piskula, M., Yao, Q. (1994). Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. **Arch. Biochem. Biophys.** 308: 278-284.

Viinikka, L., Vouri, J., Ylikorkada, O. (1984). Lipid peroxides, prostacyclin, and thromboxane A₂ in runners during acute exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 16: (3), 275-277.

Zhang, A., Zhu Q.Y., Luk, Y.S., Ho, K.Y., Fung, K.P., Chen Z.Y. (1997). Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sci.** 61: 383-394.

Table 1-Body composition

	Beach Volley	Untrained Subjects
Body mass (kg)	78 ± 1.63	73.2 ± 0.82
Height (cm)	182.83 ± 1.08	177.8 ± 0.67
Age (years)	26 ± 0.47	25.8 ± 0.43
% BF (%)	8.48 ± 0.67	14.17 ± 0.42
Fat mass (kg)	6.64 ± 0.65	10.6 ± 0.38
Lean mass (kg)	68.81 ± 1.16	62.80 ± 0.62
VET (kcal)	3145.45 ± 73	2248.52 ± 44.83
% Carbohydrate	59 ± 1.06	52.23 ± 0.58
% Protein	18.1 ± 0.68	18.2 ± 0.15
%Lipid	23.40 ± 0.65	26.25 ± 0.58
VO ₂ max. (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	38.35 ± 1.15	36.53 ± 0.44
Power peak (Watts)	850.17 ± 19.97	756.09 ± 11.96

VET is Value Energetics Total, Means ± SEM.

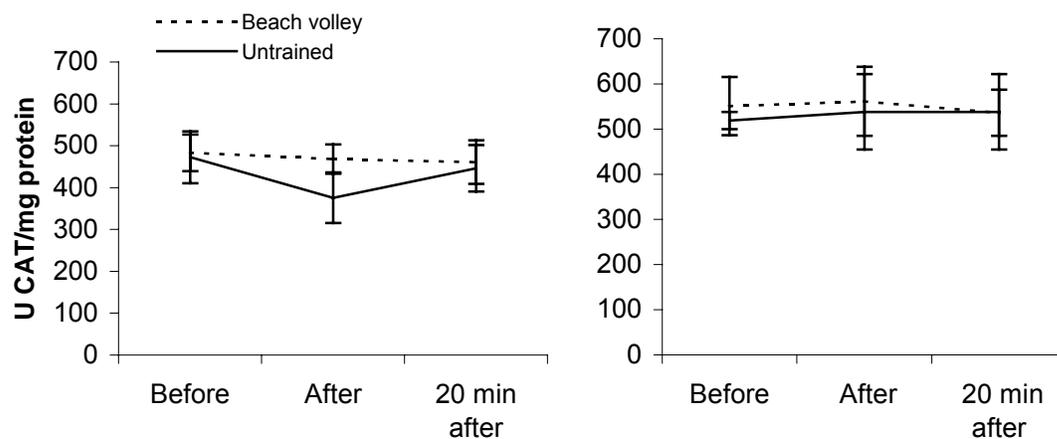
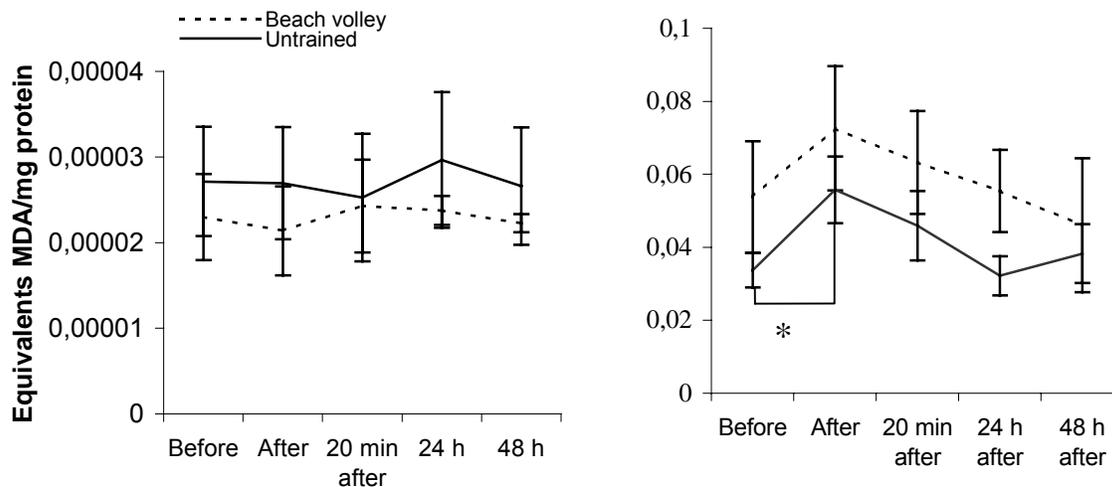
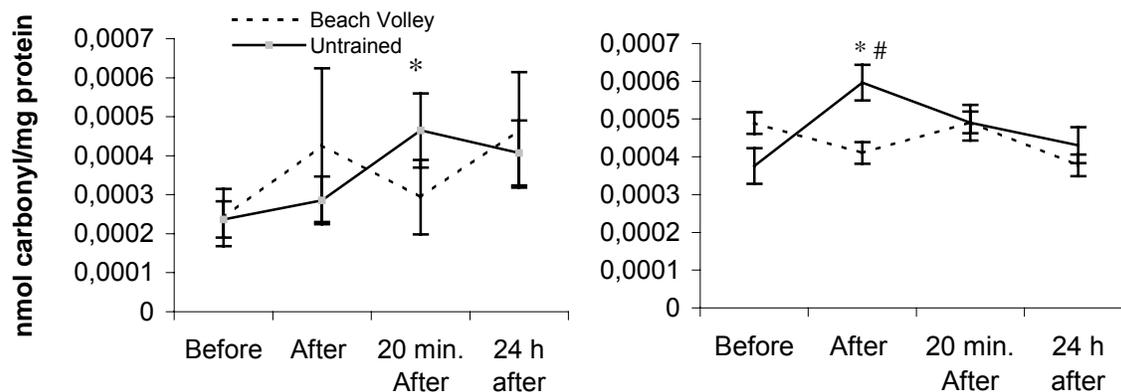
**A****B**

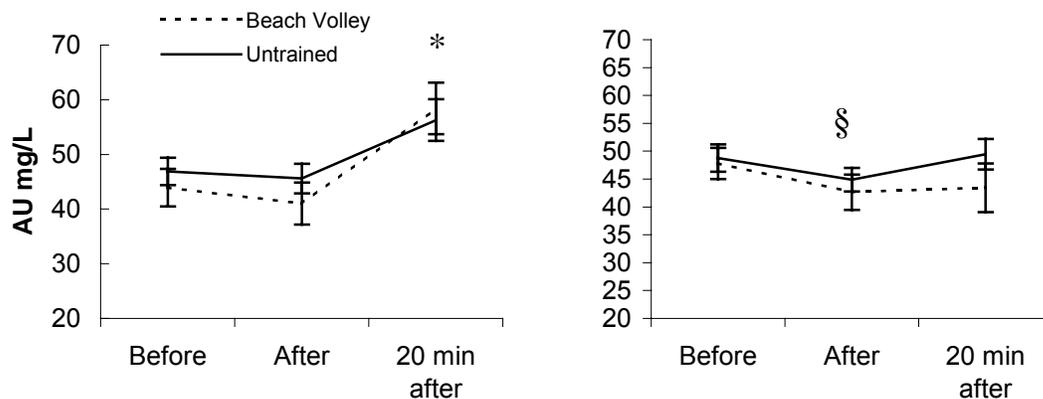
Figure 1- Time course of erythrocytes catalase activity (CAT) detected by decay of hydrogen peroxide method. A anaerobic and B aerobic exercise. Results are expressed as means ± SEM.



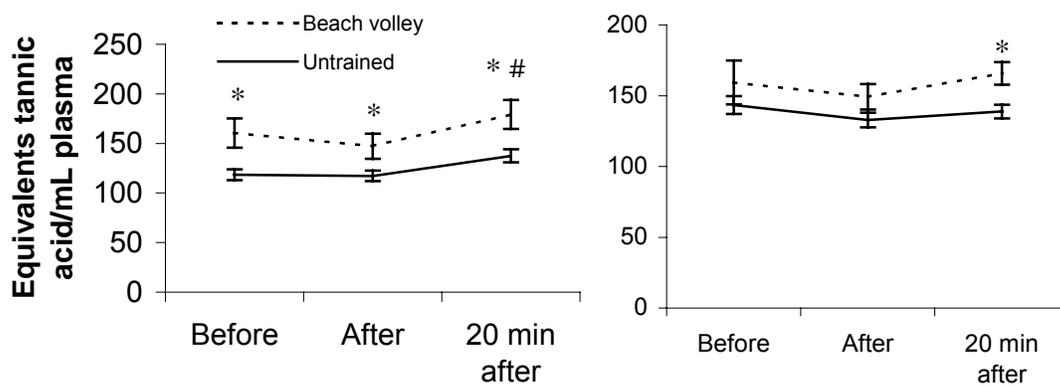
A **B**
Figure 2- Time course of plasma malondialdehyde concentration (MDA) detected by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method. A anaerobic and B aerobic exercise. * Change TBARS levels before when compared with immediately after exercise aerobic, differences in untrained group ($p < 0.05$). Results are expressed as means \pm SEM.



A **B**
Figure 3 - Time course of, detected by dinitrophenylhydrazine (DNPH) method. A anaerobic and B aerobic exercise. * Change protein carbonyl content plasma levels before when compared with 20 min of recovery, in anaerobic exercise ($p < 0.05$), and before and immediately after aerobic exercise (pM^* Change TBARS levels before when compared with 20 min of recovery, in anaerobic exercise ($p < 0.05$). # difference between groups ($p < 0.05$). Results are expressed as means \pm SEM



A **B**
 Figure 4- Time course of uric acid (UA), before, immediately after and 20 min of recovery of the Wingate test, and aerobic exercise. A anaerobic and B aerobic exercise. * Changes over time were significant at $p < 0.05$ before and immediately after exercise for 20 min recovery, in both groups. § Significant decrease ($p < 0.05$) in uric acid levels, when compared before with immediately after exercise in untrained group. Results expressed as means \pm SEM.



A **B**
 Figure 5- Time course of polyphenols compounds levels, before, immediately after and 20 min of recovery of the Wingate test and aerobic exercise. A anaerobic and B aerobic exercise. * Changes over time were significant at $p < 0.05$ before and immediately after exercise for 20 min recovery, between groups in anaerobic exercise, and 20 min after recovery aerobic exercise. # Significant increase ($p < 0.05$) in polyphenols compounds levels in untrained subjects 20 min after Wingate test. Results expressed as means \pm SEM.

5-DISCUSSÃO

Durante o exercício muscular, a produção de energia depende do metabolismo anaeróbio e aeróbio. Margaria *et al.*, (1964), sugerem que o metabolismo anaeróbio láctico contribui para a produção de energia após 20 segundos de exercício. Mercier *et al.*, (1991), mostraram que a concentração de lactato venosa aumenta, significativamente, após 6 segundos de exercício intenso, contribuindo significativamente para a produção de energia durante exercício intenso e de curta duração.

Balson *et al.*, (1992), hipotetizaram que o metabolismo anaeróbio láctico deve contribuir para a produção de energia desde os primeiros segundos de exercício. Isso é suportado pelo fato de a glicólise e a glicogenólise serem imediatamente ativados por Ca^{+2} , que é liberado pela contração muscular (CHASIOTIS *et al.*, 1982).

O teste de Wingate foi escolhido por estimular fortemente os sistemas ATP-CP e ser também glicolítico (SMITH & HILL, 1991), e com isso ativando o catabolismo das purinas (STARLING *et al.*, 1996) além da produção de ácido láctico (GRANIER *et al.*, 1995). O teste de Wingate é bem conhecido por ativar o metabolismo glicolítico láctico, e por isso produzir um aumento no acúmulo de prótons provenientes da situação de acidose láctica que tem mostrado, *in vitro*, ser um potente fator prooxidante (SIESJO *et al.*, 1985). Assim como a autooxidação

de catecolaminas pode contribuir também para elevar o estresse oxidativo induzido pelo exercício anaeróbio supra máximo de curta duração, uma vez que níveis muito altos têm sido mensurados após o exercício (ZOUHAL *et al.*, 1998).

O teste de Wingate estimula fortemente o catabolismo das purinas, como evidenciado por um grande aumento na hipoxantina e do ácido úrico plasmático (STARLING *et al.*, 1996). Alguns trabalhos assumem que a ativação do sistema xantina oxidase pode ter um papel importante, senão o mais importante, no estresse oxidativo induzido pelo exercício anaeróbio supra máximo de curta duração (GROUSSARD, 2003).

Em um estudo, *in vitro*, utilizando concentrações de lactato (0, 1, 10, 15, 30 e 60 mM) comumente encontradas no sangue, no músculo em repouso ou ativo, mostrou que o íon lactato atua como um bom antioxidante e esse efeito seria dependente da concentração. Esses dados são importantes para podermos entender o efeito do lactato na produção de radicais livres gerados durante o exercício, devido à concentração de lactato aumentar com a intensidade do exercício (GROUSSARD *et al.*, 2000). A concentração de lactato pode passar de 1 para 10 mM num exercício de consumo máximo de oxigênio e de 15 mM, possivelmente 30 mM durante o exercício supra máximo (OSNE & HERMANSEN, 1972). As concentrações de 30 a 60 mM podem ser encontradas no músculo ativo após um exercício muito intenso e rápido (JACOBS *et al.*, 1983 e SAHLIN & REN, 1989).

Em nosso estudo, os atletas profissionais de voleibol de quadra apresentam um decréscimo significativo nos índices de LPO imediatamente após e aos 20 min de recuperação ($p < 0,05$, Figura 1, artigo 1), que é um resultado diferente do estudo realizado por Groussard *et al.*, (2003), que realizaram o teste de Wingate em 7 estudantes de Educação Física e encontraram diferenças significativas nos valores de lipoperoxidação, mensurados através da técnica de TBARS, após 20 minutos de recuperação. Nos grupos de atletas de voleibol de quadra e jogadores de vôlei de praia, não observamos diferenças significativas entre os tempos estudados nem comparados aos outros grupos.

O malondialdeído plasmático de repouso foi maior em atletas treinados em velocidade que em maratonistas, e ambos foram maiores quando comparados com um grupo de sujeitos controles (MARZATICO *et al.*, 1997). Santos-Silva *et al.*, (2001) também encontraram os níveis de MDA de repouso maiores em nadadores adolescentes treinados comparados com um grupo de sujeitos controles. Em oposição, Niess *et al.*, (1996), encontraram MDA maior no plasma de sujeitos não treinados comparados com atletas, e Miyazaki *et al.*, (2001) não observou mudanças no MDA em eritrócitos após 12 semanas de treinamento.

Vários estudos mostram que séries únicas de exercício aumentam os níveis de MDA sanguíneos (DAVIES *et al.*, 1982; HARTMANN *et al.*, 1995; KOSKA *et al.*, 2000).

Mas nem todos estudos demonstram aumento no MDA em resposta ao exercício (VIINIKKA *et al.*, 1984). Sujeitos moderadamente treinados que correram por 2,5 horas numa esteira rolante não alteraram os níveis de MDA plasmáticos (DUFAUX *et al.*, 1997; DUTHIE *et al.*, 1990). Similarmente, não foram documentadas mudanças no repouso, antes ou após 4 semanas de treinamento de alta intensidade em remadores nos níveis de MDA (DERNBACH *et al.*, 1993). Isso pode ser explicado pelo motivo dos trabalhos quantificarem o MDA em diferentes tecidos (sangue total, eritrócitos, glóbulos brancos, plasma), o que resulta em resultados muito contraditórios. No exercício aeróbio, não houve diferenças significativas entre o grupo de indivíduos não treinados e jogadores de vôlei de praia (Figura 2, artigo 2), porém acreditamos que se o tamanho da amostra fosse maior, encontraríamos essa diferença. Atletas apresentam menores níveis de tocoferol, ácido ascórbico e GSH e maiores marcadores de lipoperoxidação que controles sedentários (BALAKRISHNAN & ANURADHA, 1998, SHRÖDER *et al.*, 2000).

Os níveis de danos oxidativos a proteínas foram significativamente maiores nos 20 min de recuperação do teste de Wingate nos indivíduos não treinados que no grupo de atletas profissionais ($p=0,05$, Figura 2, artigo 1). Enquanto no exercício aeróbio, houve um aumento significativo nos níveis de carbonilação logo após o exercício, quando comparados aos valores de repouso, assim como quando comparados aos valores dos jogadores de vôlei de praia ($p<0,05$, Figura 3 B, artigo 2). Chevion *et al.*, (2003), mostraram níveis de carbonilação maiores antes de marchas de 50 e 80 km, em militares bem treinados.

A capacidade aeróbia é associada com altos valores de espécies reativas ao ácido tiobarbiturico (TBARS), no repouso, (KOSTKA *et al.*, 1998) e com um menor potencial antioxidante total (TRAP) (SHARPE *et al.*, 1996). Entretanto alguns estudos têm demonstrado que os níveis de antioxidantes plasmáticos não enzimáticos podem estar relacionados com aptidão aeróbia, e encontraram também uma relação negativa entre consumo máximo de oxigênio e níveis de ácido úrico (ROBERTSON *et al.*, 1991). Todos esses dados divergentes podem ser explicados pelo fato do treinamento levar a um estresse oxidativo crônico, que simultaneamente, induz um significativo aumento na atividade enzimática antioxidante. Esse aumento na atividade enzimática antioxidante em resposta ao treinamento ou potencial aeróbio (JENKIS *et al.*, 1984) é interpretado por muitos autores como uma adaptação positiva ao treinamento. Para o sistema não enzimático, especialmente para as vitaminas antioxidantes, que não são sintetizadas pelo organismo, uma estratégia benéfica poderia ser um aumento nos estoques de vitaminas (MEYDANI *et al.*, 1993) se, o tempo de consumo desses antioxidantes for aumentado significativamente ao longo do tempo (KANTER *et al.*, 1993; ROKITZKI *et al.*, 1994).

Muitos estudos, conduzidos nas últimas décadas, têm concluído que o treinamento aeróbio reforça o potencial antioxidante e tem efeitos benéficos, como por exemplo, um aumento na atividade enzimática (LEEUWENBURGH *et al.*, 1994; MIYAZAKI *et al.*, 2001) e diminuição nos níveis de lipoperóxidos (ALESSIO & GOLDFARB, 1988) em um relativo curto período de treinamento (10-18 semanas). Assim como mostrado por este estudo, onde os atletas apresentaram maior

atividade da enzima catalase em relação ao grupo de indivíduos não treinados ($p=0,039$, Figura 3, artigo 1). Mas estudos têm comparado atletas de alto nível, seguidos de um programa regular de treinamento (alguns anos) com controles sedentários em atividade física aguda num curto período de tempo (algumas semanas), e os resultados parecem ser discordantes.

Rokitzki *et al.*, (1994), não encontraram diferenças significativas na atividade da enzima catalase, em eritrócitos, após uma prova de maratona. Assim como Marzatico *et al.*, (1997), estudaram 6 atletas velocistas, 6 maratonistas e 6 indivíduos saudáveis controles antes e após uma prova de meia maratona e uma sessão de treinamento de 6 X 150 m, onde não observaram mudanças na catalase após o exercício de velocidade (6 X 150 m).

Assim como os dois grupos submetidos ao exercício aeróbio. Porém quando comparamos a diferença entre os tempos nos dois tipos de exercícios, no grupo não treinados, observou-se diferença na atividade da CAT nos 20 minutos após, onde ela é significativamente maior no exercício aeróbio que no anaeróbio ($p<0,05$). Mas quando comparamos os grupos entre os exercícios não observamos diferenças significativas.

Em esquiadores que realizaram treinamento de 4 dias em terra ao nível do mar, ou 5 dias na neve entre 2200 a 2900 m de altitude, a concentração de ácido úrico foi significativamente maior na terra quando comparado com o repouso ou quando treinando na neve (SUBUDHI *et al.*, 2001). Chevion *et al.*, (2003),

estudaram 31 homens jovens e saudáveis, durante marcha de 50 e 80 km, que fazia parte de um programa de treinamento de 5 dias por semana, e observaram um aumento de 25 % durante a corrida de 50 km e de 37 % na corrida de 80 km na concentração de ácido úrico.

No estudo de Groussard *et al.*, (2003), demonstram, claramente, que o exercício de 30 segundos está associado a mudanças no sistema antioxidante não enzimático, mostrando um aumento significativo na concentração de ácido úrico após 10 minutos até os 40 minutos de recuperação.

Em nosso trabalho, quando os indivíduos executaram o teste de Wingate, observamos aumento significativo nos níveis de ácido úrico nos três grupos estudados ($p < 0,05$) quando comparamos valores antes do exercício com os valores obtidos 20 min de recuperação, mas não foram encontradas diferenças entre os três grupos (Figuras 4 e 4 A, dos artigos 1 e 2, respectivamente)

Já no exercício aeróbio, onde os sujeitos pedalarão 10% abaixo do 2º limiar ventilatório por 1 hora, no grupo de indivíduos não treinados foi observado significativo decréscimo nos níveis de ácido úrico de antes do exercício para o depois do exercício ($p < 0,05$) (Figura 4 B, artigo 2). No grupo de jogadores de vôlei de praia, não foi encontrada diferença nesse exercício.

Tem sido sugerido que atletas que realizam treinamento e competição extenuantes podem ter dificuldades para manter os níveis tissulares das

vitaminas, mesmo consumindo a recomendação diária (COLGAN, 1986). Muitos estudos em humanos têm mostrado que a suplementação com vitaminas antioxidantes têm efeito favorável na proteção do processo de lipoperoxidação (ALESSIO & GOLDFARB, 1997).

No entanto, existem trabalhos na literatura que mostram efeitos benéficos do treinamento. Margaritis *et al.* (1997), não observaram diferenças nos parametros de estresse oxidativo, após uma prova de triatlon de longa duração, assim como o estudo realizado por Subughi *et al.*, (2001), que observaram uma redução no estresse oxidativo após o treinamento de verão em esquiadores.

A concentração de compostos fenólicos no plasma foi significativamente maior nos indivíduos não treinados que nos atletas profissionais (Figura 6, artigo 1), o que sugere ser decorrente de uma nutrição desbalanceada. Porém, quando comparamos os indivíduos não treinados aos jogadores de vôlei de praia, observamos que os jogadores demonstram níveis mais altos de compostos fenólicos no exercício anaeróbio e nos 20 min de recuperação do exercício aeróbio ($p < 0,05$, Figura 5, artigo 2 A e 2 B, respectivamente). Não existe publicação com este tipo de dados, mas, contudo sugerimos estes altos valores no grupo dos jogadores e indivíduos não treinados ao fato de que suas dietas foram balanceadas, para que os mesmos obtivessem a quantidade de calorias de acordo com os gastos calóricos gastos.

6- CONCLUSÕES

Tendo como base os dados obtidos em nosso estudo podemos concluir que:

- Atletas de voleibol de quadra apresentam diferenças significativas na potência muscular, média de potência durante os 30 segundos,
- A atividade da enzima catalase foi significativamente maior nos atletas profissionais de voleibol de quadra logo após o teste de Wingate, quando comparados ao grupo de indivíduos não treinados. No exercício aeróbio não houve diferença.
- O exercício anaeróbio altera o sistema antioxidante não enzimático nos três grupos estudados, assim como o exercício aeróbio há uma diminuição significativa após o teste de 1 hora no grupo de indivíduos não treinados,
- Os atletas apresentam um decréscimo significativo na LPO imediatamente após e 20 minutos de recuperação do teste de Wingate, que é um exercício de 30 segundos de duração em máxima potência, e logo após o exercício aeróbio,
- Não houve diferença significativa no potencial antioxidante total não enzimático, avaliado pela técnica do TRAP, em nenhum dos grupos pesquisados.

Como conclusão geral, este estudo mostra que atletas profissionais, assim como jogadores de vôlei de praia, apresentam danos a lipídeos e a proteínas, menores que os indivíduos não treinados, sugerindo então que a prática regular de exercício físico induz adaptações antioxidantes.

7- PERSPECTIVAS

Como perspectivas de continuidade deste trabalho, pretendemos ainda fazer análises de:

- Determinação da atividade das enzimas superóxido desmutase e glutathione peroxidase.

Já para um próximo trabalho:

- Dosar a concentração de lactato sanguíneo antes e após os exercícios e os treinamentos aeróbio, anaeróbio e de força em humanos e nos ratos.
- Trabalhar com modelo de treinamento e suplementação de vitaminas e substâncias antioxidantes,
- Treinamento e substâncias anabolizantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACMS's Guidelines for exercise testing and Prescription. (2000). 6 ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.

ACSM's, (2001). Resource Manual for Guidelines for Exercise Testing and Prescription.

ADELMAN, R, SAUL, R.L, AMES, B.N. (1988). Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 85: 2706-2708.

ALESSIO HM, GOLDFARB AH, CAO G. (1997). Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. **Int. J. Sport Nutr.** 7 (1): 1-9.

ALESSIO HM, GOLDFARB AH. (1988).Lipid peroxidation and scavengers enzymes during exercise: adaptative responses to training. **J. Appl. Physiol.** 64: 1333-1336.

ALESSIO HM. (1993). Exercise-induced oxidative stress, **Med. Sci. in Sports and Exerc.** 25 (2): 218-224.

ALESSIO, H.M., HAGERMAN, A.E., FULKERSON, B.K., AMBROSE, J., RICE, R.E., WILEY, R.L. (2000). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 32, 1576-1581.

AMES, B.N., CATHCART, R., SCHWIERS, E., AND HOCHSTEIN, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-

caused aging and cancer: A hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 78: 6858-6862.

ANJO, DFC. (2004). Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J. Vasc Br**, 3(2):145-54.

BALAKRISNAN SD, ANURADHA CV. (1998). Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. **Cell Biochem Funct.** 16: 269-275.

BALSOM PD, SENGER JY, SJÖDIN B, EKBLÖM B. (1992). Physiological responses to maximal intensity intermittent exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.** 65: 144-149.

BAR-OR, O. (1987). The Wingate anaerobic test: an update on methodology, reliability and validity. **Sports Medicine.** 4: 381-394.

BEAVER WL; WASSERMAN K; WHIPP BJ. (1986). A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange. **J. Appl. Physiol.**, 60: 2020-2027.

BOVERIS A. (1998). Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues, **Medicina.** 58: 350-356.

BRADY, P.S., BRADY, L.J., ULLREY, D.E. (1979). Selenium, vitamin E, and the response, to swimming stress in rats. **J. Nutr.** 109: 1103-1109.

BRITES FD; EVELSON PA; CHRISTIANSEN MG; NICOL MF; BASILICO MJ; WIKINSKI RW; LLESULY SF. (1999). Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status, **Clinical Science.** 96 (4): 381-385.

CAMUS G; DEBY-DUPOINT G; DELBY C; JUCHMÈS-FERIR A; PRINCEMAIL J; LAMY M. (1993). Inflammatory response to strenuous exercise in man, **Mediat. Inflamm.** 2: 335-342.

CHANCE B; SIES H; BOVERIS A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Review**. 59: 527-605.

CHAO WH; ASKEW EW; ROBERTS DE; WOOD SM; PERKINS JB. (1999). Oxidative stress in humans during work at moderate altitude. **J. Nutritional**. 129: 2009-2012.

CHASIOTIS D, SAHLIN K, HULTMAN E. (1982). Regulation of glycogenolysis in human muscle at rest and during exercise. **J. Appl. Physiol**. 53: 708-715.

CHEVION S, MORAN DS, HELED Y, SHANI Y, REGEV G, ABBOU B, BERENSHTEIN E, STADTMAN ER, EPSTEIN Y. (2003). Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. **PNAS**. 100 (9): 5119-5123.

CHEVION, S., ROBERTS, M. A. & Chevion, M. (2000) **Free Radical Biol. Med.** 28,860–870.

CHIEN KR; ABRAMS J; SERRONI A; MARTIN JT; FARBER JL. (1978). Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. **J. Biol. Chem**. 253: 4809-4817.

CHILD RB; WILKINSON DM; FALLOWFIELD JL; DONNELLY AE. (1999). Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. **Med. Sci. Sports Exerc**. 30 (11): 1603-1607.

COLGAN M. Effects of micronutrient supplementation on athletic performance. In: Katch FI (ed). *Sport, Health, and Nutrition*, Human Kinetics, 1986: 21-50.

CORRETI MC; KORETSUNE Y; KUSUOKA H; CHAKO VP; ZWEIER JL; MARBAN E. (1991). Glycolytic inhibition and calcium overload as consequences of exogenously generated free radicals in rabbit hearts. **J. Clinical Investigation.** 88: 1014-1025.

DAVIES KJ; QUINTANILHA AT; BROOKS GA; PACKER L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Bioch. Bioph. Research Community.** 107: 1198-1205.

Del MAESTRO RF; BJORK J; ARFORS KE. (1981). Increase in micro vascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. II. Role of superoxide anion radical, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. **Microvascular Research.** 22: 255-270.

DENADAI BS. (1995). Limiar anaeróbio: considerações fisiológicas e metodológicas. **Rev. Bras. de Ativ. Fís. e Saúde.** 1 (2): 74-88.

DERNBACH AR, SHERMAN WM, SIMONSEN JC, FLOWERS KM, LAMB DR. (1993). No evidence of oxidant stress during high intensity rowing training. **J. Appl. Physiol.** 74 (5): 2140-2145.

DUFAUX B; ORDER U. (1989). Plasma elastase- α 1-antitrypsin, neopterin, tumor necrosis factor, and soluble interleukin-2 receptor after prolonged exercise. **Int. J. Sports Med** 10: 434-438.

DUTHIE GG; ROBERTSON JD; MAUGHAN RJ; MORRICE PC. (1990). Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. **Arch. Bioch. Bioph.** 282: 73-78.

EGE S. Organic chemistry, p.162, DC Heath and Co., Lexington, Mass., 1984.

FERNANDEZ, M., SAENZ, M.T., GARCIA, M.D. (1998). Antiinflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. **J. of Pharm and Pharmacol.** 50 (10): 1183-1186.

GRANIER P, MERCIER B, MERCIER J, ANSELME , PRÉFAUT C. (1995). Aerobic and anaerobic contribution to Wingate test performance in sprint and middle-distance runners. **Eur. J. Appl. Physiol.** 70: 58-65.

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

GROUSSARD C; MOREL I; CHEVANNE M; MONNIER M; CILLARD J; DELAMARCHE A. (2000). Free radicals scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an *in vitro* study. **J. Appl. Physiol.** 89: 169-175.

HALLIWELL B. (1992). Reactive Oxygen Species and Central Nervous System. **J. Neurochem.** 59 (2): 1609-1623.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3.ed., Oxford: *Oxford*, 1999.

HARRIS, E.D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. **FASEB J.** 6: 2675-2683.

HARTMANN A, NIESS AM, GRUNERT-FUCHS M, POCH B, SPEIT G. (1995). Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. **Mutat. Res.** 346 (4): 195-202.

HELLSTEN, Y. (1994). The role of xanthine oxidase in exercise. In: Sen, C.K.P.L., Hanninen, O. (Eds.), Exercise and Oxygen Toxicity. **Elsevier**, New York, pp. 211-234.

HELLSTEN, Y., TULLSON, P., RICHTER, E., BANGSBO, J. (1997). Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise. **Free Radic. Biol. Med.** 22:169–174.

HIGUCHI M; CARTIER LJ; CHEN M; HOLLOSZY JO. (1985). Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptative response to exercise. **J. Gerontology.** 40: 281-286.

HOCHSTEIN P; JAIN SK. (1981). Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. **Fed. Proc.** 40 (2): 183-188.

JACKSON AS, POLLOCK ML. (1978). Generalized equations for predicting body density of men. **Brit. J. Nutr.** 40: 497- 504.

JACKSON, M. (1994). Exercise and oxygen radical production by muscle. In: Sen, C.K., Packer, L., Hanninen, O. (Eds.), Exercise and Oxygen Toxicity. **Elsevier**, New York, pp. 49-57.

JACOBS I, TESCH PA, BAR-OR O, KARLSSON J, DOTAN R. (1983). Lactate in human skeletal muscle after 10 and 30 s supramaximal exercise. **J. Appl. Physiol.** 55: 365-367.

JANSKY L. (1961). Total cytochrome oxidase activity and relation to basal and maximal metabolism. **Nature.** 189: 921-922.

JENKINS RR. (2000). Exercise and oxidative stress methodology: a critique. **Am. J. Clin. Nutr.** 72: 670S-674S.

JENKINS RR; KRAUSE K; SCHOFIELD LS. (1992). Influence of exercise on clearance of oxidant stress products and loosely bound iron. **Med. Sci. Sports Exerc.** 25 (2): 213-217.

JENKIS RR. (1988). Free radicals chemistry: relationship to exercise. **Sports Medicine.** 5: 156-170.

JENKIS RR; FRIEDLAND R; HOWARD H. (1984). The relationship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity in human muscle. **Int. J. Sports Med.** 95: 11-14.

JI L.L, STRATMAN F.W, LARDY H.A. (1988). Antioxidant enzyme system in rat liver and skeletal muscle: influences of selenium deficiency acute exercise and chronic training. **Arch. Bioch. Bioph.** 263: 150-160.

JI L.L. (1992). Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Med. Sci. Sports Exerc.** 25 (2): 225-231.

JI L.L. (1995). Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant system. **Exerc. Sport Sci. Reviews.** 23: 135-163.

JI, L.L., FU, R.G., MITCHELL, E. (1992). Glutathione and antioxidant enzyme in skeletal muscle: Effects of fiber type and exercise intensity. **J. Appl. physiol.** 73: 1854-1859.

KANTER MM, NOLTE LA, HOLLOSZY JO. (1993). Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. **J. Appl. Physiol.** 74: 965-969.

KANTER, M.M., LESMES, G.R., KAMISKY, L.A. HAM-SAEGER, J.L., NEQUIN, N.D. (1988). serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. **Eur. J. Appl. Physiol.** 57: 60-63.

KARMAZYN M; LEUNG CKH.; DHALLA NS. (1979). Prostaglandin actions and interactions on isolated perfused rat hearts. **Can. J. Physiol. Pharm.** 57: 1275-1282.

KIRWAN JP; O'GORDMAN D; EVANS WJ. (1998). A moderate glycemic meal before endurance exercise can enhance performance. **J. Appl. Physiol.** 84 (1): 53-59.

KLISSOURAS V. (1971). Heretability of adaptative variation, **J. Appl. Physiol.** 31: 338-344.

KOSKA J, BLAZICEK P, MARKO M, GRNA JD, KVETNANSKY R, VIGAS M. (2000). Insulin, catecholamines, glucose and antioxidant enzymes in oxidative damage during different loads in health humans. **Physiol. Res.** 49: S95-S100.

KRAEMER WJ; HAKKINEN K. Strength training for sport, Blackwell Science, cap. 5, p. 108-115, 2001.

KUCHINO, Y., MORI, F., KASAI, U., INOUE, H, IWAI, S., MIURA, K., OHTSUKA, E., NISHIMURA, S. (1987). DNA Temples containing 8-hydroxy-deoxyguanosine are misread both the modified base and at adjacent residues. **Nature.** 327: 77-79.

KUMAR, C.T., REDDY, V.K., PRASAD, M., THYAGARAJU, K., REDDANA, P. (1992). Dietary supplementantation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidative stress. **Mol. Cell Biochem.** 111: 109-115.

LAUGHLIN MH; SIMPSON T; SAXTON WL; BROWN DR; SMITH JK; KORTHUS RJ. (1990). Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzyme, and exercise training. **J. Appl. Physiol.** 68: 2337-2343.

LEAF D; KLEINMEAN MT; HAMILTON M; DIETRICK RW. (1999). The exercise-induced oxidative stress paradox: the effects of physical exercise training, **American J. Med. Sci.** 317: 295-300.

LEEUWENBURGH C, FIEBIG R, CHANDWANEY R, JI LL. (1994). Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. **J. Appl. Physiol.** 267: R439-R445.

LEEUWENBURGH, C., JI, L.L. (1995). Glutathione depletion in rested and exercised mice: Biochemical consequence and adaptation. **Arch. Biochem. Biophys.** 316: 941-949.

LIU J; YEO HC; OVERIK-DOUKI E; HAGEN T; DONIGER SJ; CHU DW; BROOKS GA; AMES BN. (2000). Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **J. Appl. Physiol.** 89: 21-29.

LOVLIN R; COTTLE W; PYKE I; KAVANAH M; BELCASTRO AN. (1987). Are indices of free radicals damage related to exercise intensity? **Eur. J. Appl. Physiol.** 56: 313-316.

LUCÍA A; HOYOS J; PÉREZ M.; CHICHARRO JL. (2000). Heart rate and performance parameters in elite cyclists: a longitudinal study. **Med. Sci. Sports Exerc.** 32 (10): 1777-1782.

MARGARIA R, CERRETELLI P, MANGILE F. (1964). Balance and kinetics of anaerobic energy release during strenuous exercise in man. **J. Appl. Physiol.**, 19: 623-628.

MARGARITIS I, TESSIER F, RICHARD MJ, MARCONNET P. (1997). No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. **Int. J. Sports Med.** 18: 186-190.

MARIN, E., KRETZCHMAR, M., AROKOSKI, J., HAMMINEN, O., KLINGER, W. (1993). Enzymes of glutathione synthesis in dog skeletal muscle and their response to training. **Acta. Physiol. Scand.** 147: 369- 373.

MARKS DB; MARKS AD; SMITH CM. Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach, Lippincott Williams & Wilkins, cap. 21, p. 327-340, 1996.

MARZATICO F; PANSARASA O; BERTRELLI L; DELLA VALLE G. (1997). Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. **J. Sports Med. Phys. Fitness.** 37 (4): 235-239.

MAUGHAN RJ; DONNELLY AE; GLEESON M; WHITHING PH; WALKER KA. (1988). Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after downhill run. **Muscle and Nerve.** 12 (4): 332-336.

McARDLE WD; KATCH FI, KATCH VL. Exercise physiology: energy, nutrition, and human performance. Williams & Wilkins, USA, 4 ed, 1996.

McARDLE WD; MAGEL JR. (1970). Physical work capacity and maximal oxygen uptake in treadmill and bicycle exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 2: 118-123.

McBRIDE JM; KRAEMER WJ; TRIPLET-McBRIDE T; SEBASTIANELLI W. (1998). Effect of resistance exercise on free radical production. **Med. Sci. Sports Exerc.** 30: 67-72.

McCORD JM; FRIDOVICH I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. **J. Biol. Chemistry.** 244: 6049-6055.

McDOUGALL JD; WENGER HA; GREEN HJ. Physiological testing of the high-performance athlete, 2 ed., Human Kinetics. Champaign, Illinois, 1991, cap. 4, Testing Aerobic Power- James S Thoden, p. 108.

MEISTER, A., ANDERSON, M.E. (1983). Glutathione. **Annu. Rev. Rev. Biochem.** 52: 711- 760.

MERCIER J, MERCIER B, PRÉFAUT C. (1991). Blood lactate increase during the force-velocity exercise test. **Int. J. Sports Med.** S12: 17-20.

MEYDANI M, EVANS WJ, HANDELMAN G, BIDDLE L, FIELDING RA, MEYDANI SN, BURRILL J, FIATARONE MA, BLUMBERG JB, CANNON JG. (1993). Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. **Am. J. Physiol.** 33: R992-R998.

MIYAZAKI H, OH-ISHI S, OOKAWARA T, KIZAKI T, TOSHINAI K, HA S, HAGA LL, OHNO H. (2001). Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhaustive exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.** 84: 1-6.

NAGEN, T.J., ALBUQUERQUE, T.T.O., MIRANDA, L.C.G. (1992). Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arq. de Biol. e Tecnol.** 35 (1): 129-138.

NESTEL P.J. (2001). How good is chocolate? **Am. J. Clinical Nutr.** 563.

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

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

OSNES J., HERMANSEN L. (1972). Acid base balance after maximal exercise of short duration. **J. Appl. Physiol.** 3: 59-63.

PAL Y.B. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev.** 74:139-62.

PFEIFFER JM; ASKEW EW; ROBERTS DE; WOOD SM; BENSON JE; JOHNSON SC; FREEDMAN MS. (1999). Effect of antioxidant supplementation on urine and blood markers of oxidative stress during extended moderate-altitude training. **Wilderness Environment Medicine.** 10: 66-74.

POLIDORI MC; MECOCCI P; CHERUBINI A; SENIN U. (2000). Physical Activity and Oxidative Stress During Aging. **Int. J. Sports Medic.** 21: 154-157.

POWERS SK, CRISWELL D, LAWLER J, MARTIN D, LIEU FK, JI LL, HERB RA. (1993). Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in the ventricular myocardium. **Am. J. Physiol.** 265: H 2094- H 2098.

POWERS SK; HOWLEY ET. Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e Desempenho, Mande, São Paulo, SP, 3ª edição, página 364, 2001.

PRYOR W; STANLEY J; BLAIR E. (1976). Autoxidation of polyunsaturated fatty acids.II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. **Lipids**. 11: 370-379.

PRYOR WA. (1973). Free radicals reactions and their importance in biochemical systems. **Federation Proceedings**. 32: 1862-1869.

QUINTANILHA AT. (1984). Effects of physical exercise and/or vitamin E on tissue oxidative metabolism. **Biochemical Society Transactions**. 12: 403-404.

RADÁK, Z. GOTO, S. (1998). The effects of exercise, ageing and energy restriction on protein oxidation and DNA damage in skeletal muscle. In: reznick, A.Z., Packer, L., Sen, C.K., Holloszy, J.O., Jackson, M.J., eds. Oxidative stress in skeletal muscle. Basel: Birkhäuser, 1998:89-103.

RADÁK, Z., ASANO, K., INOUE, M., KIZAKI, T., OH-ISHI, S., SUZUKI, K., TANIGUCHI, N., OHNO, H. (1995), Superoxide dismutase derivative rduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. **J. Appl. Physiol**. 79: 129-135.

REMACLE, J., LAMBERT, D., RAES, M., PIGEOLET, E., MICHIELS, C., TOUSSAINT, O. (1992). Importance of various antioxidants enzymes for cell stability. **Biochem. J**. 286: 41-46.

RIBEIRO JP. (1995). Limiares metabólicos e ventilatórios durante exercício. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 64 (2): 171-181.

ROBERTSON JD; MAUGHAN RJ; DUTHIE GG; MORRICE PC. (1991). Increase blood antioxidant systems of runners in response to training load. **Clin. Sci**. 80: 611-618.

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

SAHLIN K, REN JM. (1989). Relationship of contraction capacity to metabolic changes during recovery from fatiguing contraction. **J. Appl. Physiol.** 67: 648-657.

SANBONGI, C., SUZUKI, N. e SAKANE, T. (1997). Polyphenols in chocolate, which have antioxidants activity, modulate immune functions in humans in vitro. **Cell. Immun.**, 177: 129-136.

SANTOS PJM; SANTOS JAR. Investigação aplicada em atletismo- Um contributo da FCDEF.UP para o desenvolvimento do meio-fundo e fundo, 2002.

SANTOS-SILVA A, REBELO MI, CASTRO EM, BELO L, GUERRA A, REGO C, QUINTANILHA A. (2001). Leukocytes activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. **Clin. Chim. Acta.** 306: 119-126.

SCHNEIDER DA; LACROIX KA; ATKINSON GR; TROPED PJ; POLLACK J. (1990). Ventilatory threshold and maximal oxygen uptake during cycling and running in triathletes. **Med. Sci. Sports Exerc.** 22 (2): 257-264.

SEN CK. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. **Med. Sci. Sports Exerc.** 33: 368-370.

SHARPE PC, DULY EB, MAC AULEY D, McCRUM EE, MULHOLLAND C, STOTT G, BOREHAM CAG, KENNEDY G, EVANS AE, TRINICK TR. (1996). Total radical trapping antioxidant potential (TRAP) and exercise. **Q. J. Med.** 89: 223-228.

SHRÖDER H; NAVARRO E; TRAMULLAS A; MORA J; GALIANO D. (2000). Nutrition antioxidant status and oxidative stress in professional basketball players: effects of a three compound antioxidative supplement. **Inter. J. Sports Med.** 21: 146-150.

SIES H. (1986). Biochemistry of oxidative stress, **Angew. Chemistry International Ed. England.** 25: 1058-1071.

SIESJO, B.K., BENDEK, G., KOIDE, T., WESTERBERG, E., WIELOCH, T. (1985). Influence of acidose on lipid peroxidation in brain tissues in vitro. **J. Cereb Blood Flow Metab.** 5:253-258.

SIMON J; YOUNG JL; BLOOD DK; SEGAL KR; CASE RB; GUTIN B. (1986). Plasma lactate and ventilatory thresholds in trained and untrained cyclists. **J. Appl. Physiol.** 60 (3): 777-781.

SINGAL PK; KHAPER N; PALACE V; KUMAR D. (1998). The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. **Cardiovascular Research.** 40: 426-432.

SJODIN B; HELLSTEN YH; APPLE F. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medic.** 10: 236-254.

SMITH JC, HILL DW. (1991). Contribution of energy systems during a Wingate power test. **Br. J. Sports Med.** 25: 196-199.

SOMANI SM; ARROYO CM. (1995). Exercise training generates ascorbate free radical in rat heart. **Indian J. Physiol. Pharmac.** 39: 323-329.

SPARKS MJ; SELIG SS; FEBRAIO MA. (1998). Pre-exercise carbohydrate ingestion: effect of the glycemic index on endurance exercise performance. **Med. Sci. Sports Exerc.** 30 (6): 844-849.

STADMAN, E. R. (1990). Metal ion-catalized oxidation of protein: Biochemical mechanism and biological consequences. **Free Radic. Biol. Med.** 9:315-326.

STARLING RD, TRAPPE TA, SHORT KR, SHEFFIELD-MOORE M, JOZSI AC, FINK WJ, COSTILL DL. (1996). Effect of inosine supplementation on aerobic and anaerobic cycling performance. **Med. Sci. Sports Exerc.** 28: 1193-1198.

SUBUDHI AW; DAVIS SL; KIPP RW; ASKEW EW. Antioxidant Status and (2001). Oxidative Stress in Elite Alpine Ski Racers. **Int. J. Sport Nutrition and Exerc. Metabolism.** 11: 32-41.

TESSARI P. (2000). Changes in protein, carbohydrates, and fat metabolism with aging: possible role of insulin. **Nutrition Reviews.** 58: 11-19.

THODEN JS. Testing aerobic power, CAP. 4, P. 131, In: Physiological testing of the high-performance athletes, 2 ed., Human Kinetics, 1991.

TIIDUS, P.M., PUSHKARENKO, J., HOUSTON, M.E. (1996). Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle. **Am. J. Physiol.** 217: R832-R836.

VIGUIE CA; BALZ F; SHIGENAGA MK; AMES BN; PACKER L; BROOKS GA. (1993). Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. **J. Appl. Physiol.** 75 (2): 566-572.

VIINIKKA L, VOURI J, YLIKORKALA O. (1984). Lipid peroxides, prostacyclin, and thromboxane A₂ in runners during acute exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 16 (3): 275-277.

VOIGT HF; de MAREES H. (1985). Zur musculären beanspruchung im volleyball, **Dtsch Z Sportmed.** 6: 163-170.

WILMORE JH; COSTILL DL. Fisiologia do esporte e do exercício, 2 ed., Manole, SP, Brasil, 2001.

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

ZOPPI CC; NETO JA; ROCHA LG; SILVA LP; MACEDO DV. Perfil do Biomarcadores de Estresse oxidativo em Atletas Juvenis das Modalidades Futebol e Voleibol, *Anais do I Congresso Latino-americano FIEP-UNIMEP*, Piracicaba, SP,1998.

ZOUHAL H, RANNOU F, DELAMARCHE A, MONNIER M, BENTUÉ-FERRER D, DELAMARCHE P. (1998). Adrenal medula responsiveness to the sympathetic nervous activity in sprinters and untrained subjects during a supramaximal exercise. **Int. J. Sports Med.** 19: 172-176.

ANEXOS

ANEXO 1 TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado a participar de um estudo que visa determinar a correlação entre estresse oxidativo, consumo de oxigênio, limiares ventilatórios, sistema antioxidante e exercícios aeróbio e anaeróbio. Sua presença será necessária durante 4 ou 5 dias no Laboratório de Pesquisa do Exercício (LAPEX) da UFRGS, onde serão realizados os testes.

Serão realizados, um teste de carga máxima aeróbia e um anaeróbio separado por duas semanas, e estes serão em cicloergômetro e, nos dias subseqüentes, a repetição de uma determinada carga desenvolvida no teste aeróbio inicial por um período de 60 minutos. Durante cada um dos testes será realizada coleta de gases em equipamento de avaliação cardiorrespiratória para determinação de consumo de oxigênio, produção de CO₂, quociente respiratório e limiares ventilatórios. Antes, e após o segundo teste aeróbio e o teste anaeróbio serão feitas coletas de sangue para análise do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante.

Você será acompanhado por uma equipe de pesquisadores experientes e sempre com a presença de um médico no laboratório, dessa forma, o risco de complicação é mínimo.

Você também não deverá ser portador de qualquer tipo de doença, nem estar fazendo uso de qualquer medicação.

A participação neste estudo é absolutamente voluntária, sem, portanto, qualquer tipo de gratificação, tendo direito apenas aos seus resultados no final do teste.

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

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

DECLARAÇÃO

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

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

E-mail: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 2002

ANEXO 2- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

**Anexo 3- PAR-Q: QUESTIONÁRIO SOBRE PRONTIDÃO PARA ATIVIDADE
FÍSICA**

PAR-Q: QUESTIONÁRIO SOBRE PRONTIDÃO PARA ATIVIDADE FÍSICA

Nome do participante: _____ Data: _____

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

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

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

SIM NÃO

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

ANEXO 4- RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 3 DIAS

RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 3 DIAS

O objetivo deste recordatório é conhecer os seus hábitos alimentares. Para que eles estejam o mais próximo possível da sua realidade, é importante que você anote TUDO o que comer e beber durante estes 3 dias. Isto quer dizer o que comeres na hora das refeições e fora delas também (as conhecidas “beliscadas”). Sempre que souber procure anotar as marcas dos fabricantes, indicar quando o alimento for *light* ou *diet*. Procure anotar com detalhes as quantidades (em medidas caseiras como colheres de sopa/chá, copo, caneca, etc.) e qualidades (se comer fruta diga qual foi: banana, maçã, etc.).

Nome:

Data de nascimento: ___ / ___ / _____. Idade: _____ Profissão:

Endereço residencial:

Cidade: _____ Telefone: _____ Celular:

E-mail:

Hábitos de vida:

1- Fuma ou já fumou? () Sim () Não. Há quanto tempo?

2- Quantas horas dorme ao dia? _____ Acorda cansado?

3- Hábito intestinal?

4- Hábito urinário?

5- Possui alguma doença crônica (diabetes, HAS) diagnosticada?

6- Histórico familiar:

7- Pratica atividade física? () Sim () Não com qual frequência?

Em que horário?

9- Já recebeu orientação sobre dieta? () Sim () Não De quem?

10- Já fez dieta “da moda”? _____ Qual (ais)?

11- Faz uso sistemático de algum medicamento?

12- Usa ou já usou suplementos alimentares? () Sim () Não Qual (ais)?

Informações adicionais:

Anamnese alimentar:

- 1- O que você acha de sua alimentação? Por quê?

- 2- Você segue algum horário para se alimentar?

- 3- Quantas refeições costuma fazer por dia?

- 4- Onde você costuma fazer suas refeições diárias?

- 5- Quem é o responsável pela aquisição dos gêneros alimentícios?

- 6- Quem é o responsável pelo preparo das refeições?

- 7- Alimentos que não gosta?

- 8- Você costuma freqüentar restaurantes? Quais?

- 8- Qual quantidade de líquidos você costuma ingerir por dia?

- 9- Quais os líquidos que você costuma beber?

Inquérito de frequência alimentar:

- 1- Como é o consumo de doces/biscoitos? () Diário () De 3-4 vezes na semana () Semanal () Eventual () Não consome. Quais os preferidos?
- 2- Como é o consumo de leite/queijo/margarina? () Diário () De 3-4 vezes na semana () Semanal () Eventual () Não consome. Qual o tipo?
- 3- Como é o consumo de peixe? () Diário () De 3-4 vezes por semana () Semanal () Eventual () Não consome. Quais os preferidos?
- 4- Como é o consumo de frutas? () Diário () De 3-4 vezes na semana () Semanal () Eventual () Não consome. Quais as preferidas?
- 5- Como é o consumo de vegetais? () Diário () 3-4 vezes na semana () Semanal () Eventual () Não consome. Quais os preferidos?
- 6- Como é o consumo de carne vermelha? () Diário () De 3-4 vezes na semana () Semanal () Eventual () Não consome. Quais as preferidas?
- 7- Como é o consumo de pizzas/hambúrgueres/pastéis? () Diários () 3-4 vezes na semana () Semanal () Eventual () Não consome. Quais os preferidos?
- 8- Como é o consumo de salsichas/salames/presuntos/patês/enlatados? () Diário () 3-4 vezes na semana () Semanal () Eventual () Não consome. Quais os preferidos?

9- Como é o consumo de alimentos e bebidas com cafeína? () Diário () 3-4 vezes na semana () Semanal () Eventual () Não consome. Quais os preferidos?

10- Como é o consumo de sal em sua casa? () Muito () Normal () não consumo

10-Você costuma ingerir bebidas alcoólicas? () Sim () Não. Com que frequência? _____Quais?

Recordatório alimentar – 3 dias:

Refeições	
Café da manhã Hora:	
Lanche Hora:	
Almoço Hora:	
Lanche Hora:	
Janta Hora:	
Ceia Hora:	
Beliscadas nos intervalos	

Informações importantes a ser colocadas no recordatório:

- Local das refeições,
- Se possível medida caseira dos alimentos: 1 copo, 1 colher (sopa, servir, chá....)...
- Horário,
- Tipo de alimentos (normal, *diet*, *light*...), leite desnatado, integral, semi-desnatado,

ANEXO 5- QUESTIONÁRIO DE ATIVIDADES FÍSICAS

ANEXO 6-VALORES PERCENTIS PARA POTÊNCIA AERÓBIA MÁXIMA

VALORES PERCENTIS PARA POTÊNCIA AERÓBIA MÁXIMA

Percentil	Idades				
	20-29	30-39	40-49	50-59	60 +
Homens					
90	51,4	50,4	48,2	41	42,5
80	48,2	46,8	44,1	38,5	38,1
70	46,8	44,6	41,8	36,7	35,3
60	44,2	42,4	39,9	35,2	33,6
50	42,5	41	38,1	35,8	31,8
40	41	38,9	36,7	33,8	30,2
30	39,5	37,4	35,1	32,3	28,7
20	37,1	35,4	33	30,2	26,5
10	34,5	32,5	30,9	28	23,1
Mulheres					
90	44,2	41	39,5	35,2	35,2
80	41	38,6	36,3	23,3	31,2
70	38,1	36,7	33,8	30,9	29,4
60	36,7	34,6	32,3	29,4	27,2
50	35,2	33,8	30,9	28,2	25,8
40	33,8	32,3	29,5	26,9	24,5
30	32,3	30,5	28,3	25,5	23,8
20	30,6	28,7	26,5	24,3	22,8
10	28,4	26,5	25,1	22,3	20,8

Dados fornecidos pelo Instituto de Pesquisa Aeróbica, Dallas, TX (1994), adaptados do ACSM's *Guidelines for Exercise Testing and Prescription*, p. 77, 6 ed., 2000. O ranking da potência aeróbica máxima ($\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) pode ser interpretado da seguinte maneira: percentil 90: bem acima da média; percentil 70: acima da média; percentil 50: média; percentil 30: abaixo da média, percentil 10: bem abaixo da média.

ANEXO 7-CONVERSÃO DE PESO EM WATTS

CONVERSÃO DE PESO EM WATTS

Dispêndio de energia aproximado em MET durante a cicloergometria para os membros inferiores

Rendimento de potência (kg.m/min e Watts)

<u>Peso corporal</u>		300	450	600	750	900	1.050	1.200 (kg.m/min)
Kg	libras	50	75	100	125	150	175	200 (Watts)
50	110	5,1	6,6	8,2	9,7	11,3	12,8	14,3
60	132	4,6	5,9	7,1	8,4	9,7	11,0	12,3
70	154	4,2	5,3	6,4	7,5	8,6	9,7	10,8
80	176	3,9	4,9	5,9	6,8	7,8	8,8	9,7
90	198	3,7	4,6	5,4	6,3	7,1	8,0	8,9
100	220	3,5	4,3	5,1	5,9	6,6	7,4	8,2