

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROBLEMA

O exercício físico favorece a diversas adaptações fisiológicas, sendo necessários ajustes cardiovasculares e respiratórios para compensar e manter o esforço realizado (KOURY; DONANGELO, 2003). O exercício está associado ao aumento da formação de radicais livres, relacionado principalmente ao aumento do consumo de oxigênio pelos tecidos ativos (ZOPPI et al., 2003).

O oxigênio possui atividade fundamental no metabolismo celular aeróbio, pois esta partícula é necessária no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias das células, a fim de gerar energia. Esse metabolismo pode conduzir a formação de radicais livres, e ao estresse oxidativo, pois as espécies reativas de oxigênio semi-reduzido, superóxido e peróxido de hidrogênio são produzidas na mitocôndria durante a respiração celular (FLOYD, 1999; URSO; CLARKSON, 2003).

No exercício intenso, ocorre aumento de 10 a 20 vezes no consumo total de oxigênio do organismo e de 100 a 200 vezes na captação de oxigênio pelo tecido muscular, favorecendo a produção de radicais livres de oxigênio (RLO) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Além disso, a síntese dessas moléculas durante o exercício está associada ao aumento da liberação de catecolaminas e sua auto-oxidação, aumento do metabolismo dos prostanóides, das enzimas xantina-oxidases e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, da oxidação de bases purínicas, e ainda distúrbio da homeostase do Ca^{2+} (MASTALOUDIS et al., 2004).

Dessa forma, o maior consumo de oxigênio, assim como a ativação de vias metabólicas específicas durante ou após o exercício, resulta na formação de RLO e espécies reativas de oxigênio (ERO) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Os RLO são formados pela redução incompleta do oxigênio, gerando espécies que apresentam alta reatividade para outras biomoléculas, principalmente lipídios e proteínas das membranas celulares e, até mesmo, o DNA. O interesse acerca dos

mecanismos de geração e adaptação dos EROs ao exercício aumentou significativamente a partir da demonstração de sua relação com o consumo de oxigênio (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2007).

O estresse oxidativo tem sido associado com a diminuição da performance, fadiga, dano muscular e excesso de treinamento - overtraining. Por essa razão, alguns pesquisadores (RÁDAK et al., 1999; POWERS et al., 1999; CARMELI et al., 2000; POLIDORI et al., 2000;) sugerem que reduzir o estresse oxidativo pode melhorar a tolerância ao exercício, bem como a performance física. Os danos celulares ocasionados pelo estresse oxidativo podem ser revertidos pela ação de defesas antioxidantes (enzimáticas e não enzimáticas), restabelecendo o equilíbrio entre a produção de ER e o sistema de defesa antioxidante (SILVA, 2006).

Reidi et al (2004) comprovaram através de um estudo que a suplementação de N-acetilcisteína (NAC) inibiu a fadiga em humanos sedentários. Os autores Medved et al (2004) afirmam que esse antioxidante aumenta a quantidade de cisteína muscular e disponibilidade de Glutathiona (GSH) e atenua a fadiga durante o exercício prolongado em indivíduos treinados.

Por fim, considerando o pressuposto potencial deletério dos exercícios físicos agudos, como a prática do Voleibol, e a sua relação oxidante e inflamatória no músculo esquelético e a ação antioxidante da NAC, formulou-se a seguinte questão a ser investigada neste estudo: quais são os efeitos da suplementação do antioxidante NAC sobre marcadores plasmáticos de estresse oxidativo em jogadores de Voleibol submetidos ao treinamento?

1.2 JUSTIFICATIVA

A relação entre o estresse oxidativo e o exercício físico tem sido amplamente investigada nos últimos 30 anos (FISCHER-WELLMAN e BLOOMER, 2009). O interesse acerca dos mecanismos de geração e adaptação das ERO ao exercício aumentou significativamente a partir da demonstração de sua relação com o consumo de oxigênio (CHILDS et al., 2001) e a inflamação no tecido muscular (GLEESON et al., 1998; KAURANEN et al., 2001; MACINTYRE et al., 2000; MACINTYRE et al., 2001; KÖNIG e BERG, 2002).

O estresse oxidativo tem sido associado com a diminuição da performance, fadiga, dano muscular e excesso de treinamento (overtraining). Por essa razão, alguns pesquisadores, sugerem que reduzir o estresse oxidativo pode melhorar a tolerância ao exercício bem como a performance física (CARMELI; LAVIAM e REZNICK, 2000; POLIDORO et al., 2000)

O voleibol competitivo é considerado por muitos, um dos esportes mais explosivos e rápidos. Jogadores de voleibol de elite masculino executam 250-300 atividades de alta potência, durante uma partida de cinco 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 frequências e tipos de saltos (KRAEMER e HAKKINEN, 2001).

Cerca de 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 período 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 e 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.

Embora os benefícios do aumento no consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx) sejam bem estabelecidos, um paradoxo bioquímico é verificado. O VO_2 máx é essencial para a aptidão cardiovascular e performance, porém o aumento no consumo durante o exercício pode ser prejudicial a nível sérico e bioquímico gerando o estresse oxidativo (KONIG e BERG, 2002).

O antioxidante denominado N-acetilcisteína (NAC), um doador de tiois, que atua como precursor da cisteína intracelular aumentando a produção de glutathione (GSH), vem despertando um maior interesse em estudos contra o ataque dos radicais livres (PINHO et al., 2006). Sugere-se que o potencial efeito da NAC é diminuir os níveis de H_2O_2 pelo aumento da disponibilidade e ataque de GSH, alterando o equilíbrio da capacidade oxidante-antioxidante (MEDVED et al., 2004). Por sua vez, a GSH, em sua forma reduzida, tem um importante papel no mecanismo de defesa contra ataques de radicais livres, por diminuir o conteúdo de H_2O_2 e alterar o equilíbrio da capacidade oxidante-antioxidante pulmonar (SMITH et al., 1994; REPINE, BAST e LANKHORST, 1997; ZHANG et al., 1999).

Dessa forma, os achados desta pesquisa pretendem contribuir para o entendimento do mecanismo da ação antioxidante da Glutathione em exercícios físicos agudo, especificamente na modalidade do voleibol. Assim, espera-se que esses resultados sejam de relevância para a área de rendimento, objetivando a busca de benefícios entre a relação da suplementação e exercício físico.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Obejtivo Geral

Investigar os efeitos de uma dose aguda de NAC, como possível modulador de um amplo número de marcadores de estresse oxidativo e de dano tecidual em atletas de voleibol submetidos a uma sessão intensa de exercício físico específico da modalidade.

1.3.2 Objetivos específicos

- a) Verificar os efeitos do exercício agudo e da suplementação de NAC sobre os marcadores de dano tecidual e oxidativo em jogadores de Voleibol;
- b) Verificar se a suplementação de NAC apresenta respostas diferenciadas nos sistemas de defesa antioxidante e nos marcadores de estresse oxidativo em jogadores de Voleibol.

1.4 HIPÓTESE

A suplementação de N – acetilcisteína causará uma diminuição nos parâmetros de estresse oxidativo após o exercício agudo.

1.5 DELIMITAÇÕES DO ESTUDO

A amostra foi composta por jogadores de voleibol homens com idade entre 15 e 18 anos da CIMED. A coleta de dados foi realizada nas dependências onde os treinamentos eram realizados, no ginásio do Capoeirão, localizado em Florinópolis.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO

A definição de radical livre (RL) pode ser expressa como uma molécula altamente reativa ou um fragmento molecular que contém pelo menos um elétron ímpar em seu orbital externo. Tende a extrair elétrons de outras moléculas para alcançar um estado quimicamente mais estável (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007).

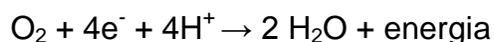
Os RLO são produzidos naturalmente no organismo durante a respiração e pelos processos metabólicos oxidativos para produção de energia (THOMAS, 2000). Quando se encontram em baixa a moderada concentração, eles exercem efeitos benéficos na defesa contra agentes infecciosos, em sistemas celulares de sinalização e na função mitogênica (VALKO et al., 2007). No entanto, um aumento desequilibrado na produção dessas moléculas pode lesionar componentes celulares indispensáveis para a vida da célula, tais como DNA, lipídios, proteínas e carboidratos (KÖNIG e BERG, 2002). Durante o exercício físico, a produção elevada dos RLO pode promover disfunção contrátil do músculo esquelético, resultando em fadiga muscular (POWERS e JACKSON, 2008).

2.2 PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As espécies reativas (ER) são definidas como moléculas orgânicas altamente reativas e instáveis, podendo ter ou não um elétron desemparelhado na última camada de sua estrutura (HALLIWEL, 1994). O termo ERO não engloba somente as espécies reativas derivadas do oxigênio, mas também as RLO (POWERS e JACKSON, 2008). Apesar de existirem ER derivadas de outras moléculas orgânicas como as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) e Espécies Reativas de Enxofre (ERX), as ERO estão em maior quantidade no organismo (FINAUD et al., 2006).

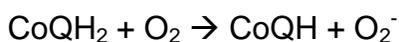
A maioria das ERO são produzidas na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial durante a respiração sob condições fisiológicas normais. De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), o oxigênio respirado é metabolizado sendo que aproximadamente 90 a 95% são utilizados pela mitocôndria, por meio da cadeia de transporte de elétrons e reduzidos a água durante a produção de energia. Na parte terminal da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidase remove um elétron (e-) de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo C, oxidando-as e adiciona os quatro elétrons ao oxigênio para formar água - Reação 1 (MATSUO e KANEKO, 2000).

Reação 1:



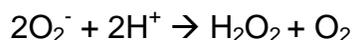
De 2 a 5% do oxigênio respirado são reduzidos univalentemente em ERO (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007). Durante o processo de formação de trifosfato de adenosina (ATP), o elétron da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e da flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH) são doados (via complexo I e II) para ubiquinona (CoQ) (complexo III) é reduzida formando a semiquinona (CoQH) que em contato com o oxigênio forma o superóxido (O₂⁻) – Conjunto de Reações 2 (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007; NELSON e COX, 2007).

Reações 2:



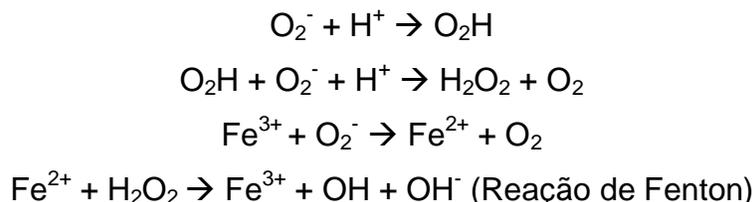
O superóxido recebe mais um elétron e dois íons hidrogênio e é rapidamente reduzido pela superóxido dismutase mitocondrial (SOD-mt) a peróxido de hidrogênio (H₂O₂) – Reação 3 (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007). Quando formado, assim como o ânion superóxido, se não for eliminado ou convertido em outro radical menos potente pode causar estragos a sistemas biológicos. No entanto, baixas quantidades desses ERO são necessárias para alguns processos fisiológicos. Na inflamação, os leucócitos produzem mieloperoxidase que utiliza o (H₂O₂) para produzir ácido hipocloroso (HClO) e ajudar no combate de antígenos invasores das células (THOMAS, 2000). Nos neutrófilos, a produção de oxigênio-catalizada pela NADPH oxigenase gera o *burst* respiratório necessário para para a destruição de bactérias (VALKO et al., 2006).

Reação 3:



Ao receber mais um elétron ou um íon de hidrogênio forma então o radical hidroxil (OH), que é a ERO mais reativa dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próximo a ele, influenciando enzimas, lipídeos da membrana ou ácidos nucleicos (BIESALSKI, 2000; VANCINI et al., 2005). O radical hidroxil pode ser formado por mais duas reações conhecidas como reação de Fenton (FENTON, 1894) e Haber- Weiss (HABER e WEISS, 1934). Primeiro, o OH é formado quando o H₂O₂ reage com íons de ferro (Fe³⁺ e Fe²⁺) ou cobre (Cu³⁺ e Cu²⁺). Segundo, quando os íons de ferro e cobre catalisam a reação entre o oxigênio e o H₂O₂ (Reação 4). Como características comuns, estas espécies apresentam grandes reatividades e possuem uma meia vida muito curta, o radical hidroxila, por exemplo, tem nove a dez segundos de vida, já o ânion superóxido decai a peróxido de hidrogênio em 4,5 x 10⁵ milissegundos (SIES e CADENAS, 1989).

Reações 4:



2.3 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que reduz, previne ou atrasa os danos ocasionados pela ação dos ER (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007). Estas moléculas trabalham num complexo processo bioquímico e agem com o objetivo de prevenir a produção demasiada de radicais livres e reduzir um possível efeito deletério (BIESALSKI, 2000). Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (BARREIROS e DAVID, 2006).

Especificamente, os antioxidantes podem atuar na prevenção da propagação de RL, na hidrólise enzimática de ligações estéricas para remoção de ácidos graxos peroxidados, no sequestro de íons metálicos e na redução catalítica-enzimática dos peróxidos (THOMAS, 2000). O processo de neutralização dos ER por antioxidantes pode acontecer em três condições. A primeira previne a formação das substâncias agressoras. A segunda é a varredura, em que o antioxidante intercepta diretamente a ação da ER, neutralizando-o. A última condição é o reparo que ocorre quando as duas condições anteriores não foram bem sucedidas, e a ação do ER acaba desenvolvendo dano à estrutura celular. O antioxidante nesta condição tem a função de ajudar na recuperação da estrutura danificada (KONG e LILLEHEI, 1998).

Segundo Pinho (2005), as defesas antioxidantes podem atuar de forma associada ou independente por duas vias: enzimáticas; sistema composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPX) as quais são ativadas normalmente durante o metabolismo celular, porém suas atividades podem aumentar em função da presença de ER; e não enzimáticas, incluem as vitaminas E, C e betacaroteno, glutathiona (GSH), taurina entre outros. Grande parte dos antioxidantes não enzimáticos é encontrada na alimentação e eles podem ser suplementados por uma dieta alimentar.

2.3.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

A ação catalítica das enzimas antioxidantes é a primeira ação de defesa contra as ER e desempenham um papel único na preservação da homeostase. Em geral, o organismo tem reservas suficientes para antioxidantes lidar com a produção de ERO em condições fisiológicas e sob exercício físico leve (BANERJEE et al., 2003). As principais enzimas antioxidantes estão apresentadas na tabela 1 abaixo.

Tabela 1 – Principais antioxidantes enzimáticos

Antioxidantes enzimáticos	Localização	Função
Superóxido	Matriz mitocondrial, citosol e meio extracelular	Scavenger de O ₂ ⁻
Dismutase (SOD) Catalase (CAT)	Citosol, principalmente dos peroxissomos	Scavenger de H ₂ O ₂
Glutathiona Peroxidase (GPX)	Citosol, membrana extracelular, mitocôndria e meio	Scavenger de H ₂ O ₂

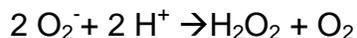
Adaptado de: POWERS e JACKSON, 2008)

2.3.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres, catalisando a dismutação do oxigênio- (HOLLANDER et al., 2000; MOOREN e VÖLKER, 2004). O oxigênio é um precursor do OH e pode extrair elétrons de alguns componentes celulares, causando reações em cadeia de radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDE, 2007).

O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o H₂O₂ (Reação 5) que deve ser retirado do meio o mais rápido possível. É estimado que mais de 80% de oxigênio formado na mitocôndria seja reduzido pela SOD (MOOREN e VÖLKER, 2004).

Reação 5:



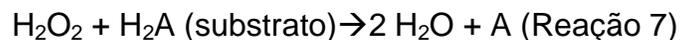
2.3.1.2 Catalase

A enzima CAT catalisa a degradação do H₂O₂, é uma hemeproteína (PRYOR e GODBER, 1991) e está localizada principalmente no peroxissoma celular (FINAUD et al., 2006). Também está presente em outras organelas como as mitocôndrias e retículo endoplasmático (MOOREN e VÖLKER, 2004). Na reação, uma das moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida à água – Reação 6 (CHANGE et al., 1979).

Reação 6:



A CAT pode também usar o H_2O_2 para reagir com alguma substância tóxica, via reação catalisada pela peroxidase (Reação 7). Esta reação necessita de um substrato como fenol, álcool (A) ou ácido fórmico para reagir com H_2O_2 (FINAUD et al., 2006).



A catálise do H_2O_2 é muito importante, pois na presença de Fe^{2+} ou Cu^{2+} leva à formação de radical hidroxil (OH) (reação de Fenton- Conjunto de reações 4) (CHANGE et al., 1979).

2.3.1.3 Glutationa Peroxidase (GPX)

A GPX é uma enzima selênio-dependente presente no citosol celular e na mitocôndria que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para água e álcool, usando a GSH como doador de elétrons – Reação 8 (FLOHÉ e GUNZLER, 1984; FINAUD et al., 2006). GPX e CAT têm ações parecidas, mediante ao ataque a H_2O_2 . A GPX é mais eficiente em uma alta concentração e a CAT em baixa concentração de ERO (FINAUD et al., 2006).

Reação 8:



2.3.2 Antioxidantes não enzimáticos

Incluem as substâncias encontradas nos alimentos como as vitaminas (C e E), minerais (zinco, selênio), provitaminas (alguns carotenóides), aminoácidos (taurina), flavonóides e polifenóis conforme mostra a tabela 2. Substâncias orgânicas como proteínas com grupo tiol (Glutathione - GSH), e várias outras substâncias de baixo peso molecular orgânicas como a ubiquinona e o ácido úrico também têm ação antioxidante e consideradas defesas exógenas (KÖNIG e BERG, 2002; BIESEK et al., 2005).

Tabela 2 – Principais antioxidantes não-enzimáticos

Antioxidantes não-enzimáticos	Localização	Função
Vitamina C	Ambiente aquoso da célula	Scavenger de RL Recicla Vit. E
Vitamina E	Membranas celulares	Impede a lipoperoxidação Reduz vários ERO para a forma menos reativa
Carotenóides	Membranas celulares	Scavenger de RL Protege da liperoxidação
Glutathiona	Em todo o ambiente celular	Scavenger de RL Remove H ⁺ e peróxidos orgânicos na reação catalizada por GPX Recicla Vit. C e E.
Flavonóides/ Polifenóis	Membranas celulares	Scavenger de RL Quelador de metais
Ubiquinonas	Membranas celulares	Scavenger de radicais de O ₂ e O ₂ singlet Recicla Vit. E

(Fonte: KÖNIG e BERG, 2002).

2. 3 EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO

Os efeitos benéficos da atividade física já são bem conhecidos. Em indivíduos saudáveis a prática regular de exercício promove um aumento na aptidão física e previne várias doenças como cardiopatias, obesidade e diabetes. O aumento do VO_2 max em atletas pode melhorar a resistência à insulina em pacientes diabéticos e a diminuição da morbidade ocasionada pelo infarto agudo do miocárdio são alguns efeitos favoráveis do treinamento físico verificado em alguns estudos (FAISAL et al., 2009; PRAET et al., 2007; RISTOW et al., 2009).

Alguns estudos mostram que a suplementação de alguns antioxidantes não-enzimáticos diminuiu o dano oxidativo em diferentes tecidos e doenças. Pinho et al. (2005) observou que a administração de NAC reduziu a resposta inflamatória e os parâmetros de estresse oxidativo pulmonar em ratos expostos à poeira de carvão. No estudo de Jain et al. (2009), os autores suplementaram vitamina C e E em coelhos diabéticos e verificaram uma diminuição no dano do DNA plasmático. Ramirez-Tortosa et al. (2008) comprovaram que a suplementação de coenzima Q 10 reduziu o estresse oxidativo em mitocôndrias do fígado de coelhos com aterosclerose.

No exercício físico, várias pesquisas demonstram os efeitos positivos de alguns antioxidantes. Silva et al. (2008) demonstraram que o tratamento com NAC pode ter alguns efeitos anti-inflamatórios e age sobre a regulação de citocinas pró-inflamatórias após o exercício excêntrico. Araújo (2008) suplementou licopeno aos pacientes com Doença Arterial Coronariana e confirmou que a diminuição do dano oxidativo ocorreu naqueles pacientes que estavam submetidos a um treinamento de exercício físico intenso e controlado.

No estudo em que Sureda et al. (2008) suplementaram vitamina C e E em corredores amadores e a suplementação com níveis moderados desses antioxidantes reduziu o dano oxidativo, sem bloquear a adaptação celular ao exercício. Já Zoppi et al. (2006) verificaram que a suplementação dessas duas vitaminas em jogadores profissionais de futebol pode reduzir a peroxidação

lipídica e o dano muscular durante o período de treinamento mas não tem nenhum efeito sobre a performance.

O estresse oxidativo tem sido associado à diminuição da performance, fadiga, dano muscular e *overtraining* (CARMELI et al., 2000). Por essa razão, alguns pesquisadores sugerem que reduzir o estresse oxidativo pode melhorar a tolerância ao exercício físico bem como a performance (ALESSIO et al., 1999).

Embora os benefícios do aumento no VO_2 máx sejam bem estabelecidos, um paradoxo bioquímico é verificado. O aumento no consumo de O_2 é essencial para aptidão cardiovascular e performance, porém o aumento no consumo durante ou após o exercício pode ser prejudicial, quando é excedida a capacidade normal do indivíduo (PINHO, 2005).

A geração de ERO durante o exercício depende do tipo (aeróbia ou anaeróbia), intensidade, duração, exigência de energia, os níveis de consumo de oxigênio e tensões mecânicas impostas sobre os tecidos (FISCHER-WELLMAN, 2009). Entretanto, estudos têm demonstrado que o treinamento de endurance aumenta as defesas antioxidantes, assim como a capacidade oxidativa do músculo (PINHO et al., 2006; RÁDAK et al., 1999; TERBLANCHE, 2000).

A formação de ERO durante o exercício físico decorre de diversos processos fisiológicos como a metabolização do oxigênio celular, isquemia-reperfusão, inflamação do tecido muscular e oxidação de catecolaminas (JI e LEICHTWEIS, 1997; KÖNIG e BERG, 2002). Esses processos geram um acúmulo de ERO em algumas situações que podem ocasionar prejuízos relevantes na performance.

2.3.1 FORMAÇÃO DE ERO DURANTE O METABOLISMO DO OXIGÊNIO NA CADEIA RESPIRATÓRIA

A fosforilação oxidativa resulta na produção de ATP na mitocôndria em situações normais. A oxidação do substrato ocorre no ciclo de krebs e na cadeia transportadora de elétrons com o oxigênio como receptor de elétrons. Na cadeia

respiratória, 95-99% do oxigênio consumido é reduzido em água por redução tetravalente (reação 1) catalizada pela CoQ (FINAUD et al., 2006). Entretanto, 1-5% de O₂ do fluxo da cadeia transportadora de elétrons são desviados para a formação de superóxido (FINAUD et al., 2006). No complexo I, a principal rota de fuga para o oxigênio é reagir com o ferro e o enxofre encontrados no local e no complexo III. O produto formado pelas duas reações é o superóxido, sendo que o complexo III libera-o por ambos os lados do interior da membrana mitocondrial. Não está claro se este superóxido atravessa a membrana externa mitocondrial ou é dismutado por Cu / Zn-SOD localizada na mitocôndria localizada no espaço inter-membrana. Durante o exercício, a geração de ERO que ocorre durante a atividade contrátil está diretamente relacionada com o elevado consumo de oxigênio que ocorre com o aumento da atividade mitocondrial (POWERS e JACKSON, 2007).

2.3.2 FORMAÇÃO DE ERO DURANTE ISQUEMIA-REPERFUSÃO

Interrupções temporárias das bombas de ATP dependentes de Ca²⁺ levam ao aumento das concentrações intracelulares de Ca²⁺, o que durante o exercício pode ativar a via da XO. Concentrações aumentadas de Ca²⁺ intramusculares durante períodos de exercício de alta intensidade podem ativar as proteases dependentes de Ca²⁺, as quais convertem a xantina desidrogenase (XO). A XO usa o oxigênio molecular ao invés do NADH como aceitante de elétrons e assim gera o radical superóxido (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007).

A alta concentração de Ca²⁺ em situações isquêmicas tem sido associada com outra via de produção de ERO. O acréscimo das concentrações de Ca²⁺ pode ativar a enzima fosfolipase A₂ a qual libera o ácido araquidônico a partir dos fosfolipídeos. Zuo et al. (2004) concluiu que o metabolismo do ácido araquidônico, em associação com a atividade da lipoxigenase, é a maior fonte de O₂⁻ no músculo esquelético.

Exercícios intensos podem aumentar a produção de ERO devido à hipóxia e reoxigenação temporárias que ocorrem no músculo exercitado em função de

contrações e relaxamentos estabelecidos ciclicamente. Durante a contração, a compressão vascular estabelece um quadro de isquemia, gerando uma hipóxia. Entretanto no relaxamento, acontece a reperfusão, e, conseqüentemente, a reoxigenação (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007). Sob condições aeróbias, o oxigênio suficiente assegura que o ATP seja repostado primeiramente via fosforilação oxidativa mitocondrial e que a hipoxantina/xantina sejam convertidas para ácido úrico pela xantina desidrogenase do que pela xantina oxidase. Além disso, o músculo esquelético tem baixa atividade da XO. Todavia a XO pode ser um importante caminho quando o músculo apresentar um déficit de adenina dinucleotídeo. Essa situação teoricamente pode acontecer em situação isquêmica, exercício isométrico, *sprint*, déficit de O₂, exercícios com limitação vascular de fluxo sanguíneo (BEJMA e JI, 1999, CHEVION et al., 2003).

De acordo com Chevion et al. (2003) as reações catalisadas pela XO têm sido consideradas algumas das mais importantes fontes de RL na isquemia/reperfusão do coração. Durante a isquemia o ATP é degradado em adenosina difosfato (AMP) devido à demanda de energia do miocárdio. Se o O₂ for insuficiente, o AMP é continuamente degradado para hipoxantina que pode ser convertido para xantina e ácido úrico pela XO, ligando-se a 1e⁻ da redução do O₂ e formando superóxido. A XD também pode ser convertida da forma reduzida (xantina desidrogenase) para forma oxidada por proteases intracelulares que pode ser ativada

2.4 SUPLEMENTAÇÃO E EXERCÍCIO FÍSICO

A origem do uso de suplementos ocorreu na Antiguidade e baseou-se no comportamento supersticioso dos atletas e soldados. Estes foram orientados a consumir partes específicas de animais, de forma a obter bravura, habilidade, velocidade ou força, características desses animais. Manias dietéticas são conhecidas desde 400 a.C a 500 a.C, quando atletas e guerreiros ingeriam fígado de veado e coração de leões (APPLEGATE; GRIVETTI, 1997).

Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (BARREIROS e DAVID, 2006). Especificamente, os antioxidantes podem atuar na prevenção da propagação de RL, na hidrólise enzimática de ligações estéricas para remoção de ácidos graxos peroxidados, no sequestro de íons metálicos e na redução catalítica-enzimática dos peróxidos (THOMAS, 2000).

A suplementação de vitaminas e minerais é bastante discutida na literatura, sua funcionalidade depende individualmente da necessidade de cada um. Desta forma, uma avaliação alimentar, metabólica e biológica é evidentemente necessário para prescrição de suplementos. Suplementos antioxidantes são comercializados e utilizados para neutralizar o estresse oxidativo do exercício. Se exercício extenuante, de fato aumenta as necessidades de antioxidantes suplementares na dieta, não é clara ainda na literatura (WILSON; MANSOUR; STEWART; NIMMO; SHEPHERD; RIEMERSMA, 2001; URSO e CLARKSON, 2003).

A perda da capacidade antioxidante em uma célula oxidada é devida principalmente a um decréscimo de glutathione, pois é o tiol livre intracelular mais abundante. O estresse oxidativo in vivo é traduzido como deficiência de glutathione ou de seu precursor, cisteína. O antioxidante mais eficaz que vem sendo estudado é a NAC, que é um precursor de glutathione (ZAFARULLAH; SYLVESTER e AHMAD, 2003). Quimicamente, a NAC é similar a cisteína. A presença do grupo acetil reduz a reatividade desse tiol comparado a cisteína. A NAC é menos tóxica, menos suscetível a oxidação e dimerização e é mais solúvel em água, fazendo dele uma fonte melhor de cisteína que a própria administração parenteral de cisteína (BONANOMI e GAZZANIGA, 1990).

A suplementação com α -tocoferol pode ser eficiente, para reduzir o estresse oxidativo e a quantidade de lesões às células, após o exercício exaustivo foi observado que a suplementação promoveu menor concentração sérica de CK em resposta a exercício extenuante de endurance praticado por atletas (ROKITZKI et al., 1994). Outros autores verificaram esse efeito até 24 horas após exercício de

corrida a 75% VO_2 máx em homens jovens, suplementados com 1.000UI /dia de vitamina E durante 12 semanas (SACHECK et al. , 2001).

A suplementação com vitamina C por um tempo mais prolongado pode causar benefícios em relação à dor e à lesão musculares. A partir de uma sessão de exercício não habitual, em um estudo foi avaliado o efeito de duas semanas de suplementação com vitamina C sobre a recuperação. O grupo suplementado recebeu duas doses de 200mg de vitamina C/dia e, duas semanas após o início da suplementação, os indivíduos foram submetidos a um protocolo de exercício intenso e prolongado. A concentração de CK e de mioglobina não foi alterada pela suplementação. Todavia, a suplementação atenuou o aumento da concentração de MDA e da dor muscular, beneficiando a recuperação da função do músculo. Os autores verificaram também que a concentração plasmática de IL-6 foi menor duas horas após o exercício no grupo suplementado com vitamina C em relação ao grupo placebo (THOMPSON et al., 2001).

A NAC é um tiol, um agente mucolítico e precursor de Lcisteína e glutathiona reduzida. NAC é uma fonte de grupos sulfidril nas células e combate os radicais livres através de sua interação com radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (ARUOMA et al., 1989). As propriedades farmacológicas antioxidantes da NAC são a restauração dos estoques reduzidos de glutathiona, a vasodilatação pela reposição de óxido nítrico através do aumento de sulfidrilas e a redução da produção de citocinas proinflamatórias como interleucina 8 e fator de necrose tumoral (PATERSON; GALLEY e WEBSTER, 2003).

3 MÉTODOS

3.1 Caracterização da pesquisa

Esta pesquisa caracteriza-se por ser do tipo experimental com delineamento pré-experimental (THOMAS e NELSON, 2002). Trata-se de um estudo de intervenção que será realizado com a ingestão de suplementação de NAC.

3.2 Sujeitos do estudo

Para a realização do estudo foram recrutados 23 atletas do time profissional de Voleibol - CIMED, não fumantes, que não faziam uso de suplementação de antioxidantes, restrição ou outro tipo de controle alimentar, que não apresentaram nenhum histórico recente de lesão muscular ou ósteo-articular ou que estivessem em regime de treinamento superior a três meses. Inicialmente os atletas foram submetidos a um protocolo progressivo em esteira (protocolo de Rampa*) com medição direta do consumo de oxigênio (VO_2 máx) determinado em ambiente controlado com temperatura entre 21°C e 22°C. Adicionalmente, foram ainda avaliados massa corporal, estatura e composição corporal (percentual de gordura e massa magra). Após a seleção, todos preencheram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Atletas que apresentam algum desconforto gastrointestinal pelo uso da NAC, ou aqueles que não conseguiram realizar todo protocolo de treinamento.

* Protocolo de rampa: após um período de coleta das variáveis no repouso e na carga zero (2-3 minutos cada), a velocidade foi incrementada de acordo com o grau de aptidão estimada do indivíduo – de tal forma que o tempo total de incrementação varie entre 8 e 12 minutos (RADÁK et al., 1994).

3.2.1 Critérios de inclusão e exclusão

Inclusão: Atletas do time juvenil de Voleibol - CIMED, não-fumantes, que não faziam suplementação de antioxidantes, restrição ou outro tipo de controle alimentar.

Exclusão: Histórico recente de lesão muscular ou ósteo-articular e atletas que apresentassem algum tipo de alergia a N-acetilcisteína ou a Maltodextrina.

3.3 INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS

3.3.1 Teste Ergoespirométrico

Inicialmente os atletas foram submetidos a um protocolo progressivo em esteira (protocolo de Rampa) com medição direta do consumo de oxigênio, através de espirometria de circuito aberto, avaliados os parâmetros cardiovasculares: frequência cardíaca (bpm), pressão arterial (mmHg), registro eletromiográfico e parâmetros ventilatórios, em um Ergopneumotest, marca Erich-Jaeger, ventilação pulmonar (V_E - BTPS l/min), consumo de oxigênio (VO_2 ml/kg/min), produção de dióxido de carbono (V_{CO_2} l/min); razão de trocas gasosas (QR), equivalentes ventilatórios para o oxigênio ($V_{E_{O_2}}$ l/min) e dióxido de carbono ($V_{E_{CO_2}}$ l/min), pulso de oxigênio (Pulso de O_2), relação espaço morto ventilatórios, – volume corrente, reserva ventilatória e relação consumo de oxigênio–carga de trabalho. O teste foi interrompido quando o sujeito atingiu a exaustão voluntária com incapacidade de manter o ritmo de corrida ou quando atingir conjuntamente as seguintes alterações: concentração de lactato maior que 8 milimoles.l⁻¹ durante o último estágio, quociente respiratório (QR) maior que 1,15, frequência cardíaca no último estágio maior 10 bpm da FC máxima prevista, platô de VO_2 com aumento da taxa de trabalho.

Para a caracterização dos atletas foram avaliados também:

Massa corporal

A avaliação do peso corporal foi realizada com uma balança da marca Filizola com precisão de 0,1 kg.

Estatura

A estatura foi realizada com um estadiômetro com precisão do instrumento de 0,1 cm., constituído de uma parte fixa a parede e outra parte na plataforma do aparelho, onde se desliza um cursor no qual se mede a estatura do indivíduo na posição em pé.

Densidade corporal

A densidade corporal foi determinada pela técnica de pinçamento de pregas de pele e gordura subcutânea, afastada do tecido muscular subjacente. Será feita com um Compasso da marca HARPENDEN, que registra em milímetros a espessura dessa dupla camada. Os valores obtidos serão lançados na seguinte equação de Petroski (1995)²¹ para obter a densidade corporal:

$$D = 1,10726863 - 0,00081201 \times (\sum 4DC) + 0,00000212 \times (\sum 4DC)^2 - 0,00041761 \times (\text{idade}).$$
 Sendo que: S4DC = tríceps + subescapular + supra íliaca + coxa.

Percentual de gordura

A partir da densidade pode-se estimar a quantidade relativa de gordura corporal através da equação de SIRI (1961);

$$\% \text{ de gordura} = (4,95/D) - 4,5 \times 100.$$

Massa magra

A massa corporal magra é composta pelos músculos, ossos, e órgãos vitais e será determinada pelo método de composição corporal onde:

Massa Magra (MM) = Massa corporal – Massa gorda.

Escala de borg

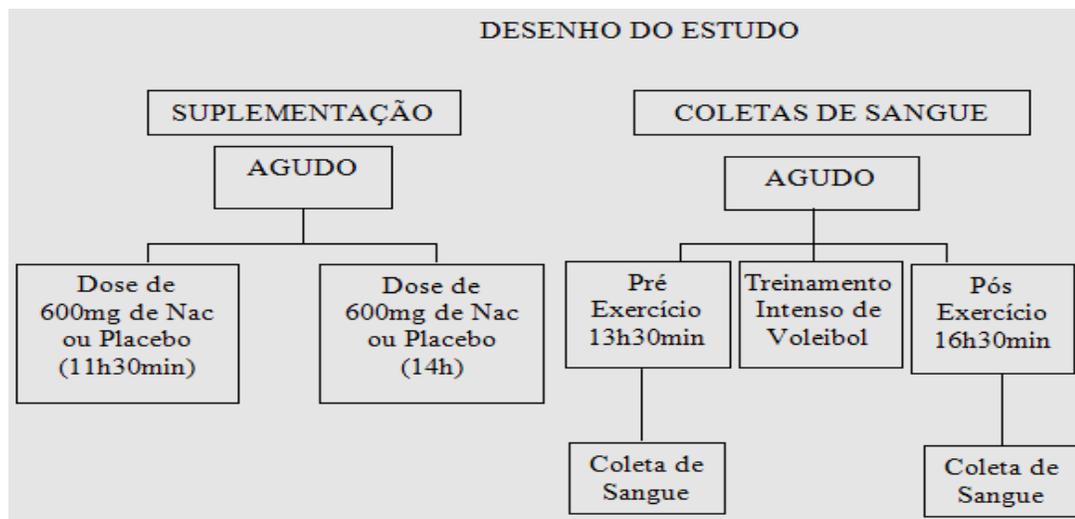
Foi utilizada para avaliar a classificação da percepção subjetiva do esforço.

0	Nenhuma
0,5	Muito, muito leve
1	Muito leve
2	Leve
3	Moderada
4	Pouco intensa
5	Intensa
6	
7	Muito intensa
8	
9	Muito, muito intensa
10	Máxima

3.3.2 Tratamento experimental

Após a seleção e avaliação dos parâmetros de aptidão física e composição corporal os atletas serão divididos randomicamente em 2 grupos: placebo e suplementado com NAC.

Os atletas realizaram a mesma sessão de treinamento determinado pela Comissão Técnica do time durante um dia no final da temporada de 2011. No dia do treinamento os atletas serão suplementados com NAC ou placebo (maltodextrina pura, sem sabor e da mesma coloração de NAC) (1200mg).



Todos os voluntários foram separados aleatoriamente para grupo controle e experimental de maneira duplo-cega. O grupo experimental tomará 600 mg de suplemento oral de NAC (Drozelev S/A, Brasil), uma 30 minutos antes do almoço (12h) e outra no início do treinamento de voleibol (14h). Ao longo do treino, os pesquisadores solicitará aos voluntários se eles terão experimentado efeitos colaterais da suplementação com NAC, como dores de cabeça ou dor abdominal. Foi realizada somente uma única seção de treinamento com duração de 120 minutos, dividida em treinamento em quadra (90 minutos) e em academia de musculação (30 minutos) com de treinamento resistido com aparelhos e pesos livres, sendo monitorado pela escala de Borg.

Estrutura de Treino

A estrutura do treinamento obedecia a uma ordem conforme o modelo a seguir:

- 1) Flexibilidade: Alongamentos Estático e Passivo
- 2) Técnico: a) Saque;
b) Recepção;
c) Ataque
- 3) Coordenação com brincadeiras com pequenos jogos
- 4) Resistência Aeróbia: Contínuo Limiar - 30 minutos
- 5) Resistência de força para membros superiores e inferiores.

Os exercícios realizados após o treinamento foram os exercícios multiarticulares como leg press de 45°, agachamento, supino reto, puxador frente, e exercícios uniarticulares como extensão e flexão de joelhos, flexão e extensão de cotovelo com halteres e flexão plantar, todos eles foram realizados o Teste de 1 repetição máxima (RM). O treinamento de força era realizado com 5 séries de 20 repetições com 60% de 1RM para membros superiores e 6 séries de 20 repetições com 65% de 1RM para os membros inferiores. Esse treinamento tinha como objetivo na modalidade voleibol oferecer estímulos de resistência de força máxima, para melhora da impulsão no salto vertical, na realização de fundamentos como bloqueio, saque, bem como em deslocamentos curtos (VIEIRA et al., 2008).

3.3.3 Suplementação

A suplementação de NAC foi realizada através do consumo de cápsulas com o produto sintético.

3.3.4 Controle do Estudo

Os atletas foram orientados para não se exercitarem além do previsto no protocolo de treinamento e não fazerem consumo de álcool, bebidas energéticas ou qualquer tipo de suplementos ou complementos alimentares durante dois dias antes do experimento inclusive no dia do mesmo.

Os atletas foram orientados a efetuar um recordatório alimentar de três dias (ANEXO A), com a finalidade de analisar a possível relação entre a ingestão alimentar e as variações bioquímicas.

3.3.5 Coleta de Sangue

As amostras de sangue foram coletadas 30 minutos antes do início do período de exercício físico e imediatamente após o exercício, por um técnico laboratorial habilitado. A veia antecubital mediana foi puncionada, sendo coletados 13 ml, pela inserção de uma agulha hipodérmica (25 x 7 mm) e o sangue foi coletado usando-se sistema a vácuo (Vacuntainer®) em um tubo contendo heparina sódica e em um tubo sem anticoagulante ou aditivos. O plasma e o soro foram obtidos imediatamente através de centrifugação do sangue (1000 x g, 15 min, 4 °C) e congelados a – 80 °C para a realização posterior das análises.

3.3.6 Ensaio Bioquímicos

Os ensaios bioquímicos foram realizados no Laboratório de Lipídeos, Aterosclerose e Estresse Oxidativo da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis/SC.

O sangue foi utilizado para análise sérica de:

ESTRESSE OXIDATIVO

- ✓ Glutationa Peroxidase (GPx);
- ✓ Superóxido Dismutase (SOD);
- ✓ Catalase (CAT);
- ✓ Glutationa Total;
- ✓ Glutationa Reduzida (GSH);
- ✓ Capacidade Antioxidante (FRAP);
- ✓ Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- ✓ Peróxidos lipídicos (LOOH);
- ✓ Proteína Carbonilada e marcadores bioquímicos e de lesão tecidual.

DANO TECIDUAL

- ✓ Alanina aminotransferase (TGO);
- ✓ Aspartato Amino Transferase (TGP);
- ✓ Fosfatase Alcalina;
- ✓ Lactato Desidrogenase (LDH);
- ✓ Creatina Quinase (CK);
- ✓ Ácido Úrico;
- ✓ Creatinina; Uréia.

Capacidade Antioxidante Total do Plasma: A capacidade antioxidante do plasma dos indivíduos foi determinada através do potencial antioxidante redutor férrico (“ferric reducing antioxidant potential”; FRAP). Neste ensaio, os antioxidantes presentes no plasma são avaliados como redutores do Fe⁺³ a Fe⁺², o qual é quelado pela 2,4,6-Tri(2-Piridil)-s-Triazina (TPTZ; Fluka – Milwaukee, EUA) para formar o complexo Fe⁺²-TPTZ com absorção máxima em 593 nm (BENZIE & STRAIN, 1996). Trinta microlitros de plasma foram misturados com 1 mL de reagente contendo FeCl₃ 1,7 mM e TPTZ 0,8 mM preparado em acetato de sódio 300 mM, pH 3,6. As amostras foram incubadas por 15 min a 37° C e a absorbância em no máximo 593 medida em espectrofotômetro UV-Visível (Spectrum 2000, EUA). Os resultados foram calculados utilizando-se uma curva padrão preparada com diferentes concentrações de Trolox (Sigma, St. Louis-EUA), um análogo hidrossolúvel da vitamina E, e foram expressos como equivalentes Trolox.

Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS): A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada através da detecção dos derivados dos produtos de oxidação, substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, destacando-se o malondialdeído (MDA), conforme procedimento descrito previamente por Esterbauer e Chelseman (1990). Alíquotas de 250 µL das amostras de soro deveram ser misturadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético 30 % contendo HCl 0,5 N e com 50 µl de BHT 10 mM. O ácido tiobarbitúrico a 0,73 % foi adicionado e a mistura e foi incubada a 100°C, por 15 min. Após resfriamento em água com gelo, foram adicionados 2,0 ml de n-butanol e os tubos foram agitados (vortex) por 30 s e centrifugados a 1000 x g por 15 min. As absorbâncias do sobrenadante deveram ser determinadas em no máximo 532 nm (espectrofotômetro Spectrum SP-2000, EUA). Como padrão foi usado o 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Aldrich, Steinheim-Alemanha), recentemente preparado.

Peróxidos Lipídicos (FOX): Os peróxidos lipídicos presentes no plasma foram quantificados pelo método da oxidação do ferro com alaranjado de xilenol (FOX),

conforme descrito por Jiang et al. (1991). O princípio do método baseia-se na rápida oxidação do Fe⁺² a Fe⁺³ em meio ácido, mediada pelos peróxidos lipídicos. O Fe⁺³ na presença de alaranjado de xilenol forma um complexo (Fe⁺³-alaranjado de xilenol) que pode ser quantificado espectrofotometricamente em 560 nm. O reagente de trabalho FOX (1,9 mL), contendo H₂SO₄ 250 mM, BHT 880 mg/L, alaranjado de xilenol 76 mg/L e sulfato de ferro e amônio 98 mg/l em metanol, foi adicionado a alíquotas das amostras de plasma. Em seguida, a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 30 min. Após esse período de tempo, os tubos foram centrifugados (1000 x g, 5 min) e as absorbâncias deveram estar em 560 nm. Para a quantificação dos peróxidos lipídicos foi utilizado a uma curva-padrão de peróxido de hidrogênio.

Proteínas Oxidadas (Carboniladas): O conteúdo de proteínas modificadas oxidativamente (carboniladas) foi determinado, espectrofotometricamente, pela formação de derivados proteínas-hidrazonas, usando a 2,4-dinitrofenilhidrazina, conforme protocolo padrão descrito por Levine et al (1990). Alíquotas de 100 µL de plasma foram misturadas a 600 µL de DNPH 10 mM e 600 µL de ácido clorídrico (HCL) 0,2 N em tubos tipo Eppendorf. Os tubos, inicialmente, foram agitados em vortex e, em seguida, mantidos em temperatura ambiente no escuro por 60 min. Durante este período, os tubos foram, novamente, agitados em vortex a cada 10 min. Após, 600 µL de TCA 20% foram adicionados aos tubos, agitados em vortex e novamente mantidos em temperatura ambiente no escuro por 10 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 11000 x g por 5 min a 4^o C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (“pellet”) será lavado três vezes com 800 µL de etanol-acetato de etila (1:1). Entre cada lavada, os tubos foram incubados por 10 min à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugados a 15000 x g por 5 min a 4 °C. Após a última centrifugação, foram adicionados 900 µL de guanidina 6,0 M, preparada em KH₂PO₄ 20 mM, ao “pellet” e incubado em banho-maria a 37°C, por 60 min, sob agitação contínua. Depois deste período de incubação, os tubos serão centrifugados a 15000 x g por 10 min a 4 °C e a absorbância deveram

estar em 360 nm para zerar o espectrofotômetro. Os brancos foram preparados, substituindo-se a DNPH por ácido clorídrico (HCl) 2 M.

Para a determinação da quantidade de proteínas totais, a mistura do tubo branco da reação (100 μ L) foi diluída em 900 μ L de solução de guanidina 6,0 M (1:9 g/v) e, então, a absorbância sera lida em 280 nm. A concentração de proteínas totais (mg/L) foi calculada, utilizando-se a albumina bovina como padrão. A concentração de proteínas carboniladas foi determinada, utilizando o coeficiente de extinção molar de 22 mM, sendo expressa em nanomol (nmol) por miligrama de proteína.

Glutationa Reduzida (GSH): Para avaliar a concentração de tióis de baixo peso molecular nos eritrócitos, como a glutathione reduzida (GSH), foi empregado o método de Beutler et al. (1963). Inicialmente, uma alíquota de sangue total heparinizado foi hemolizada com água gelada e as proteínas serão precipitadas pela adição de ácido tricloroacético 30%. Alíquotas de 0,1 mL do hemolizado serão misturadas com 0,2 mL de ácido 2,3-ditionitrobenzóico 2,5 mM (DTNB; Aldrich, Steinheim - Alemanha) em tubos contendo 1,9 mL de tampão Tris-HCL pH 8,0. Após cerca de 3 min, a absorbância do ânion tiolato (TNB) de cor amarela foi medida em até 412 nm. Como padrão foi utilizado a GSH (Sigma, St. Louis-EUA).

Ácido Úrico: A concentração de ácido úrico no soro dos indivíduos foi determinada através do método de Trinder baseado no sistema oxidase/peroxidase, utilizando-se o conjunto de reagentes Labtest[®] (Lagoa Santa-MG), de acordo com as instruções do fabricante. Nesse método, o ácido úrico presente na amostra de soro é oxidado a alantoína e peróxido de hidrogênio, através da ação catalítica da enzima uricase. O peróxido de hidrogênio é utilizado numa segunda reação oxidativa de acoplamento com a 4-aminoantipirina e o ácido di-hidroxi-benzeno-sulfônico, catalisada pela enzima peroxidase, para a produção do cromógeno antipirilquinoneímina, a qual possui absorbância máxima em 510 nm. A intensidade de absorbância do produto colorido é diretamente

proporcional à concentração de ácido úrico na amostra. Para o cálculo da concentração, foi utilizado um padrão de ácido úrico.

Creatina Quinase (CK): A atividade da enzima indicadora de lesão tecidual creatina quinase (CK) foi quantificada no soro dos indivíduos utilizando-se o sistema de reação Labtest[®] (Lagoa Santa-MG), através de método cinético, conforme as instruções do fabricante. A CK catalisa a reação reversível de fosforilação da creatina usando ATP como doador de fosfato. O princípio do método baseia-se na medida dos produtos finais, creatina e ATP, formados na reação catalisada pela CK entre a creatina-fosfato e o ADP. O ATP produzido na primeira reação é, então, empregado em um ensaio enzimático acoplado de glicose utilizando-se as enzimas glicose hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase. A produção de NADPH na reação indicadora foi monitorada em 340 nm, a qual está relacionada à atividade da CK na amostra, sendo que a atividade da enzima foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade (ϵ) do NADPH.

Lactato Desidrogenase (LDH): A LDH catalisa a interconversão do piruvato em lactato com NADH ou NAD atuando como cofatores, respectivamente. No sistema de reação, a produção do NADH foi monitorada em 340 nm, equivalendo-se à atividade da LD da amostra. O ϵ do NADH 340 nm de $6,22 \times 10^3 \text{ L/mol} \cdot \text{min}^{-1}$ foi utilizado para o cálculo da atividade da LD.

Aspartato Amino Transferase (AST): A AST catalisa a reação de interconversão dos aminoácidos aspartato e glutamato pela transferência de um grupo amino. A determinação da atividade da AST baseia-se na formação de oxaloacetato a partir do aspartato e α -cetoglutarato. Neste procedimento, o oxaloacetato formado pela ação catalítica da AST é reduzido a malato pela enzima malato desidrogenase utilizando NADH como doador de hidrogênio. A oxidação do NADH a NAD foi monitorada em 340 nm, correspondendo à atividade da enzima AST da amostra. Para o cálculo da atividade foi utilizado o ϵ do NADH de $6,22 \times 10^3 \text{ L/mol} \cdot \text{min}^{-1}$.

Alanina Amino Transferase: A ALT catalisa especificamente a transferência do grupo amina da ácido alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A diminuição da absorvância em 340nm, conseqüente à oxidação da coenzima NADH é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra.

Glutathiona Total: Para determinar a glutathiona total foi empregado o método enzimático de Tietze (1969 e Griffith, 1980). A reação de cinética enzimática foi realizada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5, contendo DPTA, NADPH, e DTNB. Como iniciador da reação foi utilizado a glutathiona redutase (GR). A glutathiona oxidada (GSSG) foi reduzida pela GR na presença de NADPH formando a GSH, a qual reage com o composto DTNB, formando o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB-), um composto amarelo cuja absorvância pode ser medida em 412 nm. A quantidade de GSSG na amostra de eritrócitos foi calculada utilizando-se o padrão comercial de GSSG. A concentração de glutathiona total foi obtida pela somatória das concentrações de GSSG e de GSH obtida pelo mesmo princípio de reação com o DTNB, porém sem a enzima GR.

Superóxido Dismutase (SOD): A atividade da SOD foi determinada com base na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD foi determinada medindo a velocidade de formação do adenocromo, observada em 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH e adrenalina. Uma unidade de enzima (atividade) equivale à quantidade de enzima que inibe em 50% a oxidação da adrenalina por minuto e por miligrama de proteína.

Glutathiona Peroxidase (GPx): A atividade da GPx foi determinada pelo método de Wendel (1981) que utiliza o peróxido de tertbutila como substrato da reação,

ocorrendo a oxidação da GSH pela GPx gerando GSSG, que é convertida em GSH pela glutathione redutase, consumindo nessa reação uma molécula de NADPH. A cinética da reação foi acompanhada em 340 nm e para o cálculo da atividade será utilizado o coeficiente de absorvidade molar do NAPH em 340 nm, $6,22 \times 10^3 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Uma unidade de GPx equivale à quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de substrato por minuto e por litro de amostra.

Catalase: A atividade da catalase foi determinada segundo o método de Aebi (1984) o qual se baseou no acompanhamento da decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), determinado espectrofotometricamente em 240 nm. Uma unidade de catalase (atividade) equivale à quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de substrato por minuto e por miligrama de proteína na amostra.

3.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A análise descritiva dos dados foi apresentada na forma de média e desvio padrão. Para realizar o teste de normalidade foi realizado o teste t de Student ou teste de Wilcoxon (comparação inter grupos; NAC vs. placebo). Foi realizado o Teste de análise de variância (ANOVA) two-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$). Foi utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 12.0 como pacote estatístico.

4 RESULTADOS

O estudo foi realizado com 18 atletas do voleibol, com idade entre 14 e 19 anos, do sexo masculino, com idade de $15,5 \pm 0,87$ anos randomizados em grupo suplementação (n=9) e placebo (n=9) (Tabela 1), integrantes do Grupo da CIMED, que realizavam seu treinamento regular sem o uso de suplementação com antioxidantes.

Tabela 1: Caracterização dos grupos

	Controle-Placebo	Experimental-NAC
Idade (anos)	$15,5 \pm 0,57$	$15,67 \pm 1,12$
IMC (kg/m^2)	$22,32 \pm 2,74$	$23,69 \pm 4,61$
$\text{VO}_{2\text{pico}}$ ($\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	$50,76 \pm 7,0$	$45,96 \pm 6,07$
FC do Limiar 1	$146 \pm 9,2$	$148,7 \pm 3,68$
FC do Limiar 2	$179,5 \pm 4,65$	$177,7 \pm 4,15$

Os resultados estão expressos em média \pm desvio-padrão e valores mínimos e máximos; IMC – Índice de Massa Corporal; FC – Frequência cardíaca.

Os resultados referentes ao dano tecidual e marcadores bioquímicos (Tabela 2), mostram que a suplementação com uma única dose de NAC não alterou significativamente o percentual de variação dos parâmetros bioquímicos em relação à variação observada no grupo placebo promovida pelo exercício físico.

Tabela 2. Efeito da suplementação aguda com NAC 1200mg nos marcadores de dano tecidual (Variação percentual em relação ao pré-exercício)

Parâmetros	Agudo (Variação %)	
	Placebo	NAC
ALT	21,5 ± 65,3	1,1 ± 31,6
AST	85,5 (49,1-92,3)	21,6 (18,7-73,3)
Fosfatase Alcalina	2,1 (1,7-6,9)	3,9 (2,3-5,8)
LDH	31,9 ± 6,0	24,4 ± 6,1 **
CK	36,5 (31,3-51,7)	35,1 (27,9-49,2)
Ácido Úrico	13,9 ± 7,7	4,5 ± 19,9
Creatinina	13,0 (10,2 - 33,1)	2,4 (10,3 - 4,5)
Uréia	1,6 ± 16,3	6,1 ± 21,5

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão.

Os dados referentes a enzimas antioxidantes (Tabela 3), mostram que uma suplementação de uma única dose de NAC não alterou significativamente o percentual de variação dos marcadores de estresse oxidativo (em relação à variação observada para o placebo) promovida pelo exercício físico. Com exceção de tendência ao aumento de LDH.

Tabela 3: Efeito da suplementação aguda com NAC 1200,0 mg/dia nos marcadores de estresse oxidativo de atletas. (Variação percentual em relação ao pré-exercício)

Parâmetros	Basal (Variação %)	
	NAC	Placebo
Glutationa Peroxidase	70,5 ± 0,7	70,3 ± 1,0
SOD	34,9 ± 23,4	26,7 ± 24,8
Catalase	13,0 ± 12,5	2,9 ± 30,4
Glutationa Total (nmol/mg Hb)	8,2 ± 16,7	0,12 ± 12,9
GSH (nmol/mg Hb)	7,9 (-25,4 - 4,8)	0,3 (-10,0 - 13,7)
Capacidade Antioxidante	12,5 ± 6,1	14,5 ± 14,9
TBARS	1,8 ± 0,9	5,7 ± 2,1
LOOH	10,6 (-45,4 -118,9)	57,4 (-8,6 - 216,9)
Proteína Carbonilada	28,5 ± 11,9	25,6 ± 11,9

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão ou mediana.

Em relação às tabelas pré e pós-suplementação (4 e 5), observamos que a quantidade de Vitamina C apresentou elevada, podendo ter mascarado os resultados do exercício físico e placebo. E a ingestão de alimentos onde os participantes realizaram um recordatório alimentar de três dias, na totalidade esteve dentro dos padrões recomendados.

Tabela 4: Informações Nutricionais dos Atletas-Placebo

Avaliação Nutricional		
	Valor Médio	Recomendado
Vitamina A	326, 06±189, 51	900
Vitamina E	10, 13±6, 94	15
Vitamina B12	3, 30±1, 78	2, 4
Ácido Fólico	148, 91±136, 98	400
Vitamina C	88, 25±121	75
Cobre	0, 82±0, 46	0, 89
Manganês	1, 79±1, 23	1, 6
Zinco	9, 30±4, 49	11
Ferro	12, 57±4, 45	11

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão.

Tabela 5: Informações Nutricionais dos Atletas Experimental

Avaliação Nutricional		
	Valor Médio	Recomendado
Vitamina A	466, 06±323, 42	900
Vitamina E	14, 60±4, 80	15
Vitamina B12	3, 71±2, 53	2, 4
Ácido Fólico	118,04±59, 14	400
Vitamina C	128, 48±106, 68	75
Cobre	1, 19±0, 59	0, 89
Manganês	3, 30±1, 59	1, 6
Zinco	12, 52±5, 54	11
Ferro	12, 57±4, 58	11

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão.

5 DISCUSSÃO

O exercício é promovido para melhorar a saúde geral e prevenção muitas doenças, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, e câncer (LEEUEWENBURGH e HEINECKE, 2001). No entanto, vários estudos têm mostrado que o exercício intenso pode provocar efeitos adversos associado ao estresse oxidativo, tais como vazamento de elétrons dentro da mitocôndria, auto-oxidação da catecolamina, a atividade NADPH, ou um reperfusão isquêmica (BLOOMER, 2008).

Para combater esses radicais o organismo possui sistemas de defesas antioxidantes, sendo chamado de enzimático, onde enzimas específicas atuam no combate aos radicais, ou dietéticos que são antioxidantes adquiridos na dieta, além desses, alguns hormônios também atuam na defesa anti-oxidantes (KOURY e DONANGELO, 2003).

Os efeitos do exercício sobre o metabolismo da glutamina não estão totalmente esclarecidos. Fatores como intensidade e duração do exercício, estado nutricional dos indivíduos e diferenças no tempo de coleta de sangue, forma de estocagem de amostras de plasma e as técnicas bioquímicas de medida da concentração de glutamina são responsáveis pelos dados contraditórios apresentados por diferentes autores (WALSH et al., 1998).

Além disso, a suplementação de NAC em baixas concentrações (600 mg) por dia durante 14 semanas reduziu radicais superóxido e melhorou a glutathione peroxidase em voluntários saudáveis, enquanto que uma alta dose em 1200 mg por dia reduziu significativamente a hidrogênio peróxido (H_2O_2) em pacientes com DPOC (BRIDGEMAN et al., 1994). Evidência interessante NAC mostrou que inibiu a fadiga muscular (FERREIRA e REID, 2008). Em nosso estudo houve aumento da glutathione total, porém ainda não foi suficiente para proteger do estresse oxidativo e dano tecidual.

No entanto, um estudo anterior mostraram que uma alta concentração de NAC (1,8 g por dia durante 2 semanas) aumentou cisteína plasma mas não melhorou o plasma GSH significativamente (WITSCHI et al. , 1995). Portanto, é

possível que apesar dos aumentos em cisteína, os efeitos antioxidantes da GSH pode não ser realizado.

O fato de uma única dose de 1200mg de NAC não ter sido suficiente para ter efeito antioxidante, frente a outros estudos, onde após um mínimo de 3 dias de administração desta substância demonstraram tais efeitos, pode ter base no mecanismo dose-resposta, fato que foi exposto em estudo sobre a vitamina E (1600 UI/dia) em que a redução máxima do estresse oxidativo, não ocorreu antes de 16 semanas de suplementação (ROBERTS et al., 2007).

NAC é usada clinicamente em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica crônica (DPOC) ou síndrome de angústia respiratória aguda (ARDS). NAC suplementação durante um curto período (5 dias) diminuiu significativamente a fagocitose e melhorou o nível de GSH no sangue de pacientes com DPOC (SADOWSKA et al., 2007; BRIDGEMAN et al., 1994). Além disso, suplementação de NAC em baixas concentrações (600 mg) por dia por 14 semanas reduziu radicais superóxido e melhorado glutathiona peroxidase em voluntários saudáveis, enquanto que uma alta dose em 1200 mg por dia reduziu significativamente a hidrogênio peróxido (H_2O_2) em pacientes com DPOC (BRIDGEMAN et al., 1994). Evidência interessante NAC mostrou que inibiu a fadiga muscular (FERREIRA e REID, 2008).

Os resultados desse estudo não confirmaram nosso objetivo. Os achados demonstraram que a suplementação com NAC não alterou o dano oxidativo, e teve uma tendência dano tecidual (ldh) lactato desidrogenase . Em nosso estudo todos os participantes realizaram um recordatório alimentar durante três dias, após as estatísticas verificamos que a quantidade de ferro foi acima dos níveis sugeridos.

A NAC pode apresentar limitação como antioxidante, e ainda, apresentar possíveis efeitos pró-oxidante pela sua fácil interação com ferro. Pois, Neal et al. (1998), sugerem que os íons de ferro livre liberados na inflamação, em contato a NAC levam a formação de peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e radicais sulfidrilas como $RS\cdot^-$, $RSO\cdot^-$. Têm sido demonstrados que a produção de $O\cdot^-$ derivada de leucócitos polimorfonucleares potencializam a liberação catalítica de

ferro, potencializando o efeito pró-oxidante da NAC (BIEMOND et al., 1984; BOLANN e ULVIK, 1990). Segundo CHILDS et al., (2001) o ferro é um metal de transição que tende a seqüestrar os sítios ativos de antioxidantes hidrossolúveis desestabilizando-os quimicamente.

A suplementação antioxidante pode ser feita via dietética ou suplementar. A fibra da dieta pode ser parcialmente responsável pela baixa biodisponibilidade de carotenoides via dietética comparada a suplementos purificados. Foi observada uma redução na biodisponibilidade de beta-caroteno, licopeno e luteína ingeridos sob forma de suplemento misto causada pela presença de diferentes fibras dietéticas (RIEDL et al., 1999).

As frutas e vegetais contêm muitos compostos com potencial atividade antioxidante, como vitaminas C e E, carotenoides, clorofilas, e uma variedade de antioxidantes fitoquímicos como compostos fenólicos simples, glicosídeos e flavonoides (PELLEGRINI et al., 2007).

A maioria dos antioxidantes presentes em citros é vitamina C e polifenóis, principalmente flavonoides. A vitamina C proporciona proteção contra a oxidação descontrolada no meio aquoso da célula, devido ao seu alto poder redutor. Os polifenóis são substâncias com grande poder de neutralizar as moléculas de radicais livres (KLIMCKAC et al., 2007; JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007).

O sistema não-enzimático inclui as vitaminas E, C e betacaroteno, GSH, e NAC entre outros. A maioria desses oxidantes são encontrados na alimentação e podem ser suplementados por uma dieta alimentar. A Vitamina E e betacaroteno são antioxidantes lipossolúveis e protegem as membranas celulares dos ataques por RL. A vitamina C e a glutathione são hidrossolúveis e fundamentais na regeneração da Vitamina E proteção dos constituintes lipídicos e protéicos celulares (Urso e Clakson, 2003).

Em nossos dados não houve diferença estatísticas na maioria das Vitaminas avaliadas, porém, a quantidade de Vitamina C apresentou elevada, ou seja, acima dos valores recomendados pelas DRI'S em 2002 (COZZOLINO e COLI, 2002), podendo ter mascarado os resultados do exercício físico e placebo. E a ingesta de alimentos onde os participantes realizaram um recordatório

alimentar de três dias, na totalidade esteve dentro dos padrões sugeridos, podendo sugerir que em um ambiente nutricional adequado, ou seja, níveis adequados, a suplementação exógena de antioxidantes não produz efeitos satisfatórios.

São poucos os trabalhos que se dedicaram em estudar efeitos de antioxidantes agudamente, valendo ressaltar o estudo de Valadão e colaboradores (2011), que encontraram resultados que indicam que uma única dose de café aumenta a atividade de enzimas antioxidantes, melhorando a proteção contra o estresse oxidativo em ratos. Em outro estudo realizado por Leelarungrayub e colaboradores em 2011 também realizado em curto prazo, onde efetuaram uma avaliação agudamente, mas nenhum resultado foi encontrado por eles, confirmando nossos achados.

Dessa forma também podemos dizer que os resultados mostram que NAC a 1.200 mg por dia a curto prazo não reduz o estresse oxidativo do exercício de curta duração. No entanto, o contraste em aplicativo ainda precisa de mais provas, porque baixa níveis de radicais livres que geram nas mitocôndrias são muito importantes para a força muscular normal, e eles aumentam mais com maior força (POWERS e JACKSON, 2008).

Este estudo também precisava de evidências mais específicas de NAC mostrando os benefícios ou efeitos adversos entre baixa e alta dose suplementação no futuro.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a suplementação de 1200 mg/dia de NAC, não foi capaz de aumentar a biodisponibilidade de Glutathione reduzida e total no plasma dos atletas, nem de atenuar possíveis efeitos deletérios do exercício físico. Servindo como orientação a potenciais usuários que os possíveis efeitos protetivos não ocorrem com o uso de duas doses de 600mg de NAC, e sim provavelmente a ingestão alimentar contribua muito para um efeito maior antioxidante.

Com base neste estudo fica evidente a necessidade de investigações de curto e longo prazo utilizando suplementação de NAC, para verificar se existe uma relação real entre dose-resposta.

REFERÊNCIAS

ALESSIO, H. M. ;GOLDFARB, A. H. Lipid Peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. **J. Appl. Physiol.**; 64: 1333-1336, 2006.

ARAUJO, M. C. **Efeitos do exercício físico regular e suplementação de licopeno sobre marcadores de estresse oxidativo na Doença Arterial Coronariana.** Dissertação de Mestrado. Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício (LAFIBE) – UNESC, 2008.

ARUOMA, O. L. et al. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free. Radic. Biol. Med.** n. 6, p. 593-597, 1989.

BARREIROS, A. L. S., DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova.** 2006; 29 (1): 113-123.

BANERJEE, A. K.. et al. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n. 253, p. 307–312, 2003.

BIESALSKI, H. K. The role of Antioxidants in Nutritional Support. **Nutrition.** 16 (7/8): 593 – 596, 2000.

BLOOMER, R. J. Chapter 1 effect of exercise on oxidative stress biomarkers, **Advances in Clinical Chemistry**, v. 46, p. 1–50, 2008.

BRIDGEMAN, M. M. E. et al. Effect of N-acetyl cysteine on the concentrations of thiols in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lung tissue, **Thorax**, v. 49, n. 7, p. 670–675, 1994.

CARMELI, E.; LAVIAM, G.; REZNICK, A.Z. The role of antioxidant nutrition in exercise and aging. In: Radák Z, editor. **Free radicals in exercise and aging**. Champaign: Human Kinetics. 73-115, 2000.

CHANCE, B., SIES, C. H., BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiology**, n.59, p. 527-605, 1979.

CHILDS, A. et al. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. **Free Radical Biology Medicine**, n.31, p.745-753, 2001.

COZZOLINO, S. M. F.; COLI, C. Novas recomendações de nutrientes: interpretação e utilização. In: INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE – ILSI/Brasil. Usos e aplicações das “Dietary Reference Intakes” – DRIs. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição** – SBAN; International Life Sciences Institute – ILSI, 2002. p. 4-15.

FAISAL, A. et al. Prior moderate and heavy exercise accelerate oxygen uptake and cardiac output kinetics in endurance athletes. **Journal of Applied Physiology**, n. 106, p.1553–1563, 2009.

FERREIRA, L. F.; REID, M. B. Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue, **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 3, p. 853–860, 2008.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress: relationship with Exercise end training. **Sports Medicine**, n.36, p. 327-358, 2006.

FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R. J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. **Dynamic Medicine**, v. 8, n.1, p. 1 – 25, 2009.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. Assay of glutathione peroxidase. **Meth. Enzymol.** 105: 114-21, 1984.

FLOYD, R.A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Experimental Biology and Medicine.*, Maywood, v. 222, p. 236-245, 1999.

GLEESON, M. et al. Effect of exercise-induced muscle damage on the blood lactate response to incremental exercise in humans. **European Journal of Applied Physiology**, n. 77, p. 292-295, 1998.

GOHIL, K. et al. Blood glutathione oxidation during human exercise. **J Appl Physiol.** n. 64, p. 115-119, 1988.

JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2007.

JI, L. L.; LEICHTWEIS, S. Exercise and oxidative stress sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. **Age**, v. 20, p. 91-106, 1997.

HABER, F.; WEISS, J. On the catalysis of hydroperoxide. **Naturwissenschaften**, n. 20, p. 948-950, 1932.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, n. 102 (Suppl 10), p. 5 -12, 1994.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology Medicine University Press**, Oxford, NY, 1999.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4.ed. Oxford, UK: Clarendon Press, 2007.

HOLDINESS, M. R. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. Clin Pharmacokinet. n. 20, p.123-134, 1991.

HOLLANDER, J. et al. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. **Mech. Ageing**. 116: 33-45, 2000.

KAURANEN, K.; SIIRA, P.; VANHARANTA, H. Delayed-onset muscle soreness and motor performance of the upper extremity. . **European Journal of Applied Physiology**, n. 84, p. 302-309, 2001.

KLIMCZAK, I. et al. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3-4, p. 313-322, 2007.

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

KÖNIG, D.; BERG, A. Exercise and oxidative stress: is there a need for additional antioxidants. **Österreichisches Journal Für Sportmedizin**, n.3, p. 6-15, 2002.

KONG, Q.; LILLEHEI, K. O. Antioxidant inhibitors for câncer therapy. **Medical Hypotheses**, v. 51, p.405 – 409, 1998.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinc, oxidative stress and physical activity. **Revista de Nutrição**. v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

JAIN, N.; NASEEMA, I.; AHMADB, J. Evaluation of DNA damage and metabolic syndrome parameters in diabetic rabbits supplemented with antioxidants. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, n. 23, p. 197–205, 2009.

LEELARUNGRAYUB, D., et al. N-Acetylcysteine Supplementation Controls Total Antioxidant Capacity, Creatine Kinase, Lactate, and Tumor Necrotic Factor-Alpha against Oxidative Stress Induced by Graded Exercise in Sedentary Men. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 6, 2011.

MACINTYRE, D. L. et al. Different effects of strenuous eccentric exercise on the accumulation of neutrophils in muscle in women and men. **European Journal of Applied Physiology**, n. 81, p. 47-53, 2000.

MACINTYRE, D. L. et al. Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. **European Journal of Applied Physiology**, n. 84, p. 180-186, 2001.

MATSUO, M.; KANEKO, T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák Z. **Free radicals in exercise and aging**. Champaign: Human Kinetics, p. 73-115, 2000.

MASTALOUDIS, A.; LEONARD, S. W.; TRABER, M. G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. **Free radical biology & Medicine**. 31(7): 911-922, 2001.

MEDVED, I. et al. N-acetylcysteine enhances muscle cysteine and glutathione availability and attenuates fatigue during prolonged exercise in endurance-trained individuals. **J. Appl. of Physiol.** 97: 1477 – 1485, 2004.

MOOREN, F.; VÖLKER, K. Molecular and Cellular Exercise Physiology. **Human Kinetics**, p. 179-197, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. 5. ed, 2007.

PELLEGRINI, N. et al. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 1, p. 103-111, 2007.

PINHO, R. A. **Efeito da suplementação de n-acetilcisteína e do exercício físicos sobre os marcadores de estresse oxidativo pulmonar induzido pela exposição aguda ao carvão mineral**. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica-UFRGS, 2005.

PINHO, R.A.; et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rats skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell Biology International**, n. 30, p. 848-853, 2006. 68

PINHO, R. A. et al. N-Acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. **Environmental Research**, n. 99, p.355–360, 2005.

POLIDORI, M. C. et al. Physical activity and oxidative stress during aging. **Inter. J. Sports Med.** 21: 154 – 157, 2000.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. “Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production,” **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1243–1276, 2008.

PRAET, S. F. E.; VAN LOON, L. J. C. Optimizing the therapeutic benefits of exercise in Type 2 diabetes. **Journal of Applied Physiology**, n.103, p. 1113–1120, 2007.

PRYOR, W. A.; GODBER, S. S. Noninvasive measures of oxidative stress status in human. **Free radical Biology and Medicine**, v. 10, p.177-184, 1991.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced Oxidative Stress: Cellular mechanisms and Impact on Muscle Force Production. **Physiology Review**, n. 88, p. 1243 – 1276, 2008.

RADÁK, Z. et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and dna in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcome. **Free Rad. Biol. Med.** 27: 69 – 74, 1999.

RAMIREZ-TORTOSA, M. et al. Oxidative stress status in liver mitochondria and lymphocyte DNA damage of atherosclerotic rabbits supplemented with water soluble coenzyme Q10. **BioFactors**, n.32, p. 263–273, 2008.

REID, M. B. et al. N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. **J. Clin. Invest.** 94: 2468 – 2474, 2004.

REPINE, J. E.; BAST, A.; LANKHORST, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Respir. Crit. Care Med.* 156:341-357, 1997.

ROBERTS, L.J., et al., The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. **Free Radic Biol Med.** , 2007.

RISTOW, M. et al., “Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans,” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 21, p. 8665–8670, 2009.

RISTOW, M. et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. **Proceeding of the National Academy of Science**, n.21, v. 106, p. 8665 -8670, 2009.

ROKITZKI, L. et al. Alpha-tocopherol supplementation in racing cyclists during extreme endurance training. *Int J Sport Nutr.* 1994; 4:253-64.

SACHECK, J. M et al. Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(12):1575-88..

SADOWSKA, A. M. et al. "Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose effects: a review," ***Pulmonary Pharmacology and Therapeutics***, v. 20, n. 1, p. 9–22, 2007.

SAMPIERI, R. H., COLLADO, Carlos Fernandes. & LUCIO, Pilar Batista. ***Metodologia de Pesquisa***, 3 ed, São Paulo-S.P. Editora Mc Graw – Hill, 2006.

SAXTON, J. M.; DONNELLY, A. E.; ROPER, H. P. Indices of free-radical-mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work. ***European Journal of Applied Physiology***, n.68, p.189-193, 1994.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. ***Revista Brasileira de Medicina do Esporte***: 10, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151786922004000400008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 Out 2011.

SIES, H.; CADENAS, E. Antioxidant activity of 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxyindole, and DOPA against microsomal lipid peroxidation and its dependence on vitamin E. ***Free Radical Research Community***, n. 6, p.11-7, 1989.

SILVA, L. A. ***Efeitos da suplementação de antioxidantes sobre marcadores de estresse oxidativo e resposta inflamatória aguda após a lesão muscular induzida pelo exercício excêntrico***. Dissertação de Mestrado. Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício (LAFIBE) – UNESC, 2006.

SILVA, L. A. et AL. N-Acetylcysteine Supplementation and Oxidative Damage and Inflammatory Response After Eccentric Exercise. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, n. 18, p. 379-388, 2008.

SMITH, C. M. et al. Inherited glutathione-s-transferase deficiency is a risk factor for pulmonary asbestosis. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** 3: 471-477, 1999.

SUREDA, A. et al. A. Influence of an Antioxidant Vitamin-Enriched Drink on Pre- and Post-Exercise Lymphocyte Antioxidant System. **Annals of Nutrition & Metabolism**, n. 52, p. 233–240, 2008.

TERBLANCHE, S. E. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. *Cell Biol Int.* 23: 749-753, 2000.

THOMAS, M. J. The Role of Free Radicals and Antioxidants. **Nutrition**, n.16, p. 716 – 718, 2000.

THOMPSON, D. et al. Prolonged vitamin C supplementation and recovery from demanding exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2001;11:466-81.

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

VALADÃO, S. et al. Increase of the Activity of Phase II Antioxidant Enzymes in Rats after a Single Dose of Coffee. **Journal Agric Food Chem.** , 2011. Oct 4.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, n. 39, p. 44 – 48, 2007.

VANCINI, R. L. et al. Radical livre, estresse oxidativo e exercício. **Revista do Centro de Estudos de Fisiologia do Exercício**, Universidade Federal de São Paulo, p. 1 -10, 2005.

VIEIRA, N. A. Efeito do treinamento de resistência de força no sistema neuromuscular em atletas de voleibol. **CONEXÕES, revista da Faculdade de Educação Física da UNICAMP**, Campinas, v. 6, ed. especial, p.84-96, jul. 2008.

WALSH, N. P. Et al Glutamine, exercise and immune function: links and possible mechanisms. *Sports Med.* 1998;26:177-91.

WITSCHI, A. et al. "Supplementation of N-acetylcysteine fails to increase glutathione in lymphocytes and plasma of patients with AIDS," *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 11, n. 1, p. 141–143, 1995.

ZHANG, Z.; SHEN, H. M. et al. Critical role of GSH in silica-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in macrophages. **Am. J. Physiol.** 277: 743-748, 1999.

ZOPPI, C. C et al. 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.

ZOPPI, C. et al. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Revista Paulista de Educação Física**, jul/ dez 2003, p. 119-130.

ZOPPI, C. C. et al. Vitamin C and E supplementation effects in Professional soccer players under regular training. **Journal of the International of Society of Sports Nutrition.** 3 (2): 37-44, 2006.

ANEXO A