



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Adriano Teixeira Pereira

**Efeito da suplementação com resveratrol sobre os marcadores  
bioquímicos de dano muscular e oxidativo em militares submetidos  
a exercícios físicos intensos**

Rio de Janeiro

2011

Adriano Teixeira Pereira

**Efeito da suplementação com resveratrol sobre os marcadores bioquímicos de dano muscular e oxidativo em militares submetidos a exercícios físicos intensos**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Josely Correa Koury  
Coorientador: Prof. Dr. Marcos de Sá Rego Fortes

Rio de Janeiro  
2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SÍRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

P436 Pereira, Adriano Teixeira.  
Efeito da suplementação com resveratrol sobre os marcadores bioquímicos de dano tecidual e oxidativo em militares submetidos a exercícios físicos intensos / Adriano Teixeira Pereira. – 2011.  
54 f.

Orientadora: Josely Correa Koury.  
Coorientador: Marcos de Sá Rego Fortes.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição.

1. Resveratrol – Teses. 2. Estresse oxidativo – Teses. 3. Esportes – Aspectos fisiológicos – Teses.  
I. Koury, Josely Correa. II. Fortes, Marcos de Sá Rego. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. IV. Título.

nt

CDU 547.56

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

---

Assinatura

---

Data

Adriano Teixeira Pereira

**Efeito da suplementação com resveratrol sobre os marcadores bioquímicos de dano muscular e oxidativo em militares submetidos a exercícios físicos intensos**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Aprovada em 7 de dezembro de 2011.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Josely Correa Koury  
Instituto de Nutrição - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Marcos de Sá Rego Fortes  
Instituto de Pesquisa da Capacitação Física do Exército

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Flávia Fioruci Bezerra  
Instituto de Nutrição - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Glorimar Rosa  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2011

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa Flavia, que sempre fez parte das minhas realizações, alegrias e sonhos. Obrigado por você existir e por me fazer tão feliz.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Altair e Auxiliadora, pelo amor incondicional e apoio constante que transformam meus sonhos em realidade;

Ao meu amor, Flavia, pela compreensão, companheirismo e por fazer parte dos meus sonhos e me fazer tão feliz ao seu lado;

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Josely Correa Koury pela disponibilidade com que me recebeu, pela orientação, pela atenção, pela paciência e carinho. Muito obrigado pela oportunidade de aprender, de crescer e de me tornar uma pessoa melhor;

Ao Instituto de Pesquisa da Capacitação Física do Exército pela oportunidade acadêmica, apoio irrestrito, confiança, incentivo e acompanhamento constante na realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde do Instituto de Nutrição da UERJ, em especial à minha turma de mestrado pela convivência, amizade e aprendizado;

Ao laboratório de citotoxicidade e genotoxicidade de drogas do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), na pessoa do Prof. Marcos Dias Pereira e Marcio Antônio de Barros Sena pelas análises e resultados dos exames laboratoriais realizados.

BOM MESMO É IR À LUTA COM DETERMINAÇÃO, ABRAÇAR A VIDA E VIVER COM PAIXÃO, PERDER COM CLASSE E VIVER COM OUSADIA. POIS O TRIUNFO PERTENCE A QUEM SE ATREVE E A VIDA É MUITO BELA PARA SER INSIGNIFICANTE!

*Charles Chaplin*

## RESUMO

PEREIRA, Adriano Teixeira. *Efeito da suplementação com resveratrol sobre os marcadores bioquímicos de dano tecidual e oxidativo em militares submetidos a exercícios físicos intensos*. 2011. 54f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A repetição de exercícios físicos intensos e o desequilíbrio antioxidante podem induzir a um estado oxidativo, podendo ocorrer oxidação de lipídios e de proteínas, provocando diversas alterações na função celular e tecidual. O consumo de antioxidantes pode trazer benefícios, porém, atualmente esta assertiva é controversa. Os polifenóis possuem grande poder antioxidante e entre eles o resveratrol é o mais estudado, exercendo sua ação antioxidante por meio de múltiplos mecanismos biológicos. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da suplementação com resveratrol sobre indicadores bioquímicos de lesão tecidual e de desequilíbrio oxidativo em militares submetidos a exercício físico intenso. Foram mensurados os fatores hematológicos, a concentração sérica de creatina quinase (CK), as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a carbonilação de proteínas (PC). Iniciaram o estudo 98 militares do gênero masculino (22, ± 1,9 anos). Anterior à suplementação e ao esforço físico, foi realizada a primeira coleta de sangue (T0), quando houve a composição aleatória dos grupos: Plac (maltodextrina) e Supl (resveratrol encapsulado - 100mg/dia). A suplementação permaneceu durante 15 dias, sendo 10 dias sem exercício físico e cinco dias com treinamento físico intenso (primeira fase, T1). Após este período, ambos os grupos realizaram exercícios físicos intensos durante 14 dias, sem uso de suplementação (segunda fase) e foi realizada nova coleta de sangue (T2). As hemácias ( $p < 0,01$ ), hematócrito ( $p < 0,01$ ) e a hemoglobina ( $p < 0,01$ ) reduziram, em ambos os grupos, ao longo do estudo. A CK aumentou (635%) após a primeira fase de treinamento (T1), em ambos os grupos, quando comparado com o valor basal (T0) ( $p < 0,01$ ). Após a segunda fase de treinamento (T2), retornou aos valores basais, em ambos os grupos. Após a primeira fase (T1), somente a concentração de PC foi menor (22,7%) no grupo suplementado ( $p = 0,044$ ), quando comparado ao grupo placebo, no mesmo período, retornando aos valores basais após a segunda fase (T2). As concentrações de TBARS se mantiveram similares para ambos os grupos durante todo o estudo. Os resultados do presente estudo sugerem que a ingestão de resveratrol protegeu a oxidação das proteínas e não influenciou, negativamente, a sinalização celular.

Palavras-chave: Resveratrol. Estresse oxidativo. Exercício.



## ABSTRACT

The repetition of strenuous exercise and antioxidant imbalance may induce an oxidative state, and there may be oxidation of lipids and proteins, leading to several changes in cellular function and tissue. Consumption of antioxidants may be beneficial, however currently this assertion is controversial. Polyphenols have antioxidant and great power among them resveratrol is the most studied, exerting its antioxidant action through multiple biological mechanisms. The aim of this study was to evaluate the effect of resveratrol supplementation on biochemical indicators of tissue injury and oxidative imbalance in military undergoing intense physical exercise. Haematological factors were measured, the serum creatine kinase (CK), the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonylation (PC). Military began the study 98 male ( $22 \pm 1.9$  years). Prior to supplementation and physical exertion, we performed the first blood sample (T0), when there was a random composition of groups: Plac (maltodextrin) and Supp (encapsulated resveratrol - 100mg/day). The supplementation was continued for 15 days and 10 days without exercise, and five days of intense physical training (the first phase, T1). After this period, both groups performed strenuous exercise for 14 days without supplementation (second phase) and we have made new blood collection (T2). Red blood cells ( $p < 0.01$ ), hematocrit ( $p < 0.01$ ) and hemoglobin ( $p < 0.01$ ) reduced in both groups throughout the study. The increased CK (635%) after the first training phase (T1) in both groups compared to baseline (T0) ( $p < 0.01$ ). After the second phase of training (T2), returned to baseline in both groups. After the first phase (T1), only the concentration of PC was lower (22.7%) in the supplemented group ( $p = 0.044$ ) compared to placebo in the same period, returning to baseline after the second stage (T2). The concentrations of TBARS remained similar for both groups throughout the study. The results of this study suggest that intake of resveratrol protected the oxidation of proteins and not negatively affect cell signaling.

Keywords: Resveratrol. Oxidative stress. Exercise

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de coleta de dados ao longo do estudo.....	31
Gráfico 1 - Contagem de Hemácias ao longo do estudo, em militares suplementados e não suplementados com resveratrol.....	37
Tabela 1 - Características antropométricas e de composição corporal dos militares que participaram do estudo com uso de suplemento ou placebo.....	37
Gráfico 2 - Percentual de hematócrito ao longo do estudo, em militares suplementados e não suplementados com resveratrol.....	38
Gráfico 3 - Concentração de hemoglobina ao longo do estudo, em militares suplementados e não suplementados com resveratrol.....	38
Gráfico 4 - Concentração de CK ao longo do estudo, em militares suplementados e não suplementados com resveratrol.....	39
Gráfico 5 - Concentração de proteína carbonilada ao longo do estudo, em militares suplementados e não suplementados com resveratrol.....	39
Gráfico 6 - Concentração de Malondialdeido ao longo do estudo, em militares suplementados e não suplementados com resveratrol.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
ATP	Adenosina trifosfato
CaCL <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CH <sub>2</sub>	Grupo metileno
CK	Creatina quinase
DNP	Dinitro-fenil-hidrazona
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPX	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
GSSH	Dissulfeto de glutaciona
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCL	Ácido clorídrico
HNE	Hidroxinonenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IMC	Índice de massa corporal
LDH	Lactato desidrogenase
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
NaCL	Cloreto de sódio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub> •	Radical superóxido
OH•	Radical hidroxila
RL	Radicais livres
ROO•	Radical peroxila
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Acido tiobarbitúrico
TCA	Acido tricloroacético
XD	Xantina desidrogenase
XO	Xantina oxidase

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	14
2.1	<b>Mecanismos de formação das Espécies Reativas de Oxigênio</b>	14
2.2	<b>O exercício físico como promotor de espécies reativas de oxigênio</b>	16
2.3	<b>Marcadores bioquímicos de dano oxidativo</b>	17
2.3.1	<u>Peroxidação lipídica</u>	17
2.3.2	<u>Oxidação das proteínas</u>	21
2.4	<b>Marcadores bioquímicos de lesão muscular</b>	22
2.5	<b>Sistemas de defesa antioxidante</b>	23
2.5.1	<u>Sistema antioxidante enzimático</u>	23
2.5.2	<u>Sistema antioxidante não enzimático</u>	24
3	<b>OBJETIVO GERAL</b>	29
3.1	<b>Objetivos Específicos</b>	29
4	<b>METODOLOGIA</b>	30
4.1	<b>População</b>	30
4.2	<b>Delineamento do estudo</b>	30
4.3	<b>Atividade física</b>	31
4.4	<b>Suplementação</b>	32
4.5	<b>Avaliação antropométrica</b>	32
4.6	<b>Coleta de sangue</b>	32
4.7	<b>Análises hematológicas e bioquímicas no sangue</b>	33
5	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	35
6	<b>RESULTADOS</b>	36
7	<b>DISCUSSÃO</b>	41
8	<b>CONCLUSÃO</b>	45
	<b>REFERÊNCIAS</b>	46

## INTRODUÇÃO

Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas com um ou mais elétrons não pareados na sua última camada de valência. São muito instáveis e reativos, tendendo a capturar elétrons de outras moléculas (CHEESEMAN; SLATER, 1993). Entre os radicais livres, as espécies reativas de oxigênio (ERO) são continuamente produzidas por processos metabólicos oxidativos e, quando produzidos em equilíbrio com a capacidade antioxidante, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico e na desintoxicação de drogas (RIMBACH et al., 1999).

Apesar de alguns efeitos benéficos, dependendo do nível de produção, as espécies reativas de oxigênio reagem com estruturas celulares, oxidando-as e alterando suas funções (GOLDFARB, 1999). Dentre essas alterações, ocorre a oxidação da camada lipídica da membrana celular (lipoperoxidação) e das proteínas, provocando diversas alterações na função celular e tecidual (ALESSIO, 1993). Esse quadro pode comprometer a homeostase do ambiente celular e tem sido relacionado com a ocorrência de algumas doenças (ZABTOCKA; JANUSZ, 2008) e processos de fadiga e lesão muscular (BARCLAY; HANSEL, 1990; BROTTTO; NOSEK, 1996; FRANKIEWICZ-JOZKO et al., 1996).

O treinamento físico regular provoca um aumento no consumo de oxigênio e na demanda energética produzindo uma quantidade maior de espécies reativas de oxigênio (DAVIES et al., 1982; JI; FU, 1992; ALESSIO, 1993; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Entretanto, o aumento moderado de espécies reativas de oxigênio, em função da sessão de exercícios físicos, parece exercer um importante papel na regulação das vias de sinalização celular que promovem a expressão genética (JACKSON, 2008; POWERS et al., 2011), aumentando a defesa antioxidante através de mecanismos adaptativos (NIESS; SIMON, 2007).

No entanto, a repetição de exercícios intensos, hábito alimentar inadequado e insuficiente período de recuperação ao esforço tendem a induzir a um estado de estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção e a eliminação das espécies reativas de oxigênio (SIES, 1986). Sendo assim, quando um programa de treinamento ultrapassa a capacidade de adaptação de um indivíduo, poderão ser observados efeitos prejudiciais. Esse desequilíbrio entre a demanda do exercício e a capacidade antioxidante conduz a um estado de fadiga crônica com redução do

desempenho, acompanhado de sinais e sintomas conhecido como supertreinamento ou “overtraining” e que exige maior tempo de recuperação (ARMSTRONG; VANHEEST, 2002; MARGONIS et al., 2007).

Para prevenir ou reduzir a ação dos radicais livres o corpo possui sistemas de defesa antioxidante que podem ser classificados como enzimático e não enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), presentes predominantemente no meio intracelular. Já o sistema não enzimático inclui compostos endógenos como bilirrubina, ceruloplasmina, coenzima Q e ácido úrico; além dos dietéticos como vitamina C,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno e polifenóis, com atuação predominante no meio extracelular (POWERS; LENNON, 2000).

Dentre os polifenóis, o resveratrol tem se destacado por sua ação antioxidante por meio de múltiplos mecanismos biológicos, como a prevenção da oxidação do LDL pela quelação do cobre, o seqüestro de radicais livres, a indução ao aumento de várias enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPx, a substituição do estrogênio na proteção do endotélio vascular, entre outros (PINTO et al., 1999; SAIKO et al., 2008).

O modelo biológico ideal para estudos sobre desequilíbrio oxidativo é aquele cuja capacidade antioxidante está alterada em função de estímulos gerados na ausência de doenças, como ocorre na prática de exercícios físicos. Um bom exemplo de atividade física muito intensa e de longa duração é o estágio do Curso Básico Pára-quedista, na qual o desequilíbrio oxidativo gerado pode trazer sérios problemas ao desempenho e à saúde do militar. Por isso, este grupo é considerado como um bom modelo de estudo para investigar a ação de substâncias antioxidantes como o resveratrol. O objetivo do presente projeto foi avaliar o efeito da suplementação com resveratrol sobre o desequilíbrio oxidativo em militares submetidos a exercícios físicos intensos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mecanismos de formação das Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio são produzidas continuamente através de fontes exógenas (exposição à radiação, poluentes do ar, álcool, cigarro) e fontes endógenas (processos metabólicos oxidantes) (CHEESEMAN; SLATER, 1993; THOMAS, 2000). Segundo Halliwell; Guttendge (1999) o oxigênio que respiramos é metabolizado em nosso organismo da seguinte maneira: 10 a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases, como a enzima xantina desidrogenase/oxidase, presente no endotélio de capilares da maioria dos tecidos e a enzima NADPH citocromo P-450 redutase, presente principalmente na membrana do retículo endoplasmático de hepatócitos. Os 85 a 90% restante são utilizados pela mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons.

Os componentes da cadeia de transporte de elétrons estão organizados na membrana interna da mitocôndria e são agrupadas em quatro complexos protéicos e dois componentes isolados que conectam os complexos (BARJA, 1999). Segundo Muller et al.(2004) o complexo I ou NADH desidrogenase recebe os elétrons provenientes do NADH e transfere-os para a Ubiquinona(UQ), promovendo a translocação de prótons da matriz para o espaço intermembranar. O complexo II ou succinato desidrogenase recebe os elétrons do succinato e também os transfere para a UQ. Por ser hidrofóbica, a UQ move-se livremente na bicamada lipídica e transporta os elétrons para o complexo III, que recebe os elétrons e os transfere para o citocromo C. Quando a UQ é oxidada, há liberação de prótons para o espaço intermembranar, contribuindo para a produção do gradiente de prótons. O citocromo C é uma proteína periférica ligada à membrana mitocondrial interna por interações eletrostáticas que transfere os elétrons que recebe do complexo III para o complexo IV. O complexo IV ou citocromo oxidase recebe os elétrons do citocromo C e os transfere para o O<sub>2</sub>, formando H<sub>2</sub>O (95 a 98% do oxigênio).

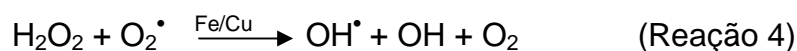
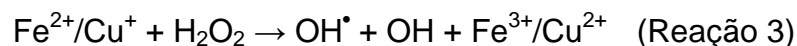
No entanto, em razão da sua configuração eletrônica, o oxigênio tem forte tendência a receber um elétron de cada vez e, em consequência, 2 a 5% do oxigênio são reduzidos univalentemente gerando intermediários reativos denominados espécies reativas de oxigênio, apresentando alta reatividade para

outras biomoléculas, principalmente lipídios e proteínas das membranas celulares (FINAUD et al., 2006).

A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera a formação do radical superóxido ( $O_2^\bullet$ ) (Reação 1). Pelo processo de dismutação, o superóxido recebe mais um elétron e dois íons hidrogênio, formando o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Essa reação é catalisada pela SOD que acelera a reação a  $10^4$  vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico (Reação 2). O peróxido de hidrogênio não é um radical livre; no entanto, representa um metabólito de oxigênio parcialmente reduzido (PAL, 1994).



Quando o  $H_2O_2$  recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ), 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. O radical hidroxila pode ser formado quando o  $H_2O_2$  reage com íons ferro ou cobre (Reação 3). A reação é conhecida como Reação de Fenton. Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre  $H_2O_2$  e  $O_2^\bullet$  (Reação 4), conduzindo à produção de radical hidroxila, a chamada Reação de Haber-Weiss (JENKINS, 1988).



Outras espécies reativas de interesse são os oxigênios *singletes*, que são formas de oxigênio spin-alteradas. Esses metabólitos derivados do oxigênio, considerados em conjunto, são denominados espécies reativas de oxigênio, em função da sua aumentada reatividade para as biomoléculas e, em geral, alteram o tamanho e a forma dos compostos com os quais eles interagem (Fischer, 1987). Além disso, o radical superóxido pode reagir diretamente com o óxido nítrico (NO), um radical livre centrado no nitrogênio, gerando peroxinitrito (Reação 5). Este pode levar à formação de um oxidante com características do radical hidroxila. Cada



espécie reativa de oxigênio tem suas próprias características, mostrando diferentes reatividades e tempos de meia-vida.(SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).



## 2.2 O exercício físico como promotor de espécies reativas de oxigênio

A mitocôndria é comumente citada como fonte primária de formação do superóxido durante a contração das fibras musculares, devido a estudos que apontaram que 2 a 5 % do oxigênio total consumido pela mitocôndria sofre redução eletrônica para formar superóxido (BOVERIS; CHANCE, 1973; LOSCHEN et al., 1974). Baseado nessa afirmativa, alguns autores assumiram que o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio está diretamente ligado ao aumento do consumo de oxigênio durante o exercício, implicando em um grande aumento (50 a 100 vezes) na geração de superóxido pelo músculo esquelético, durante contrações aeróbicas (KANTER, 1995; URSO; CLARKSON, 2003). No entanto, estudos mais recentes (ST-PIERRE et al., 2002; JACKSON, 2008) mostram que a taxa de produção do superóxido gerado pela mitocôndria é muito menor (< 0,15%) do que a estipulada inicialmente, já que foi observado que a mitocôndria não é a fonte primária de geração do superóxido durante a contração muscular (POWERS et al., 2011).

Os principais mecanismos de formação das espécies reativas de oxigênio a partir da prática de exercício são:

a) Interrupção temporária das bombas de ATP dependentes de cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) – esta leva ao aumento das concentrações intracelulares de cálcio, que durante o exercício pode ativar a via da xantina oxidase. Concentrações aumentadas de cálcio intramuscular durante períodos de exercício de alta intensidade podem ativar as proteases dependentes de cálcio, as quais convertem a xantina desidrogenase em xantina oxidase. A xantina oxidase usa o oxigênio molecular ao invés do  $\text{NAD}^+$  como receptor de elétrons e assim gera o radical superóxido (JENKINS, 1988).

b) Hipóxia e reoxigenação musculares temporárias - ocorrem em função das contrações e relaxamentos estabelecidos ciclicamente. Durante a contração, a compressão vascular estabelece um quadro de isquemia e, portanto, de hipóxia. No

relaxamento, ocorre a reperfusão e, conseqüentemente, a reoxigenação. Sob condições de hipóxia, os equivalentes reduzidos podem se acumular dentro da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, resultando em um fenômeno conhecido como estresse redutivo. Na reoxigenação, uma explosão (*burst*) de reduções monoeletrônicas pode converter o oxigênio molecular em radicais superóxido (FREDERIKS; BOSCH, 1995). As condições de hipóxia também estão envolvidas no aumento da atividade da óxido nítrico sintase (NOS), levando à formação de radicais do óxido nítrico. Estes radicais podem exercer um efeito pró-oxidante fraco quando isolados, entretanto, ao se combinarem com o superóxido formam um oxidante mais potente, o peroxinitrito (SUBUDHI et al., 2001).

c) Ativação de leucócitos - pode estimular a produção de radicais livres para melhorar os mecanismos de defesa do hospedeiro em resposta ao dano muscular induzido pelo exercício. Em particular, os neutrófilos podem reduzir o oxigênio molecular a radical superóxido via NADPH oxidase, a qual está inativa nas células em repouso. Processos similares têm sido observados em monócitos e eosinófilos (GOLDFARB, 1999).

d) Aumento das concentrações de  $Ca^{++}$  - pode ativar a enzima fosfolipase A2, a qual libera o ácido araquidônico a partir dos fosfolipídeos. A ciclooxigenase reage com o ácido araquidônico para gerar o radical hidroxil (FEHRENBACH; NORTHOFF, 2001).

## 2.3 Marcadores bioquímicos de dano oxidativo

Os biomarcadores de dano oxidativo refletem alterações nos sistemas biológicos, quando expostos aos efeitos de radicais livres e outras substâncias que causam lesões teciduais e celulares, devendo ser específicos e sensíveis às alterações e identificar efeitos biológicos (ZWART et al., 1999).

### 2.3.1 Peroxidação lipídica

A reação das espécies reativas de oxigênio com os ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular. A

LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lípidos insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996). A LPO talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (VACA et al., 1988; BABER; HARRIS, 1994).

O processo da LPO pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que o ácido graxo poliinsaturado (AGPI) sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ), formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (LIMA; ABDALLA, 2001).

Em meio aeróbio, o radical alquila inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico (LOOH). Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode propagar a LPO (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A terceira e última etapa da reação, a fase de terminação dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares (GARDNER, 1989; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Os radicais peroxila e alcoxila também podem sofrer dismutação ou clivagem  $\beta$  formando aldeídos, formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos ou sofrer um rearranjo formando produtos secundários da LPO (derivados hidroxil, ceto, ceto hidroxil e epoxi-hidroxil-ácido graxo). A velocidade do processo de LPO é limitada pelas fases de iniciação e propagação (HSIEH; KINSELLA, 1989; SPITELLER; SPITELLER, 1998).

As avaliações da LPO em sistemas biológicos efetuam-se na medida de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo e as principais metodologias utilizadas são:

a) Dienos conjugados;

Podem ser detectados pela sua absorção no UV, apresentando absorção máxima entre 230 e 235 nm (HALIWELL; GUTERIDGE, 1999). Entretanto, a medida da absorção neste comprimento de onda pode sofrer interferências, principalmente na análise de amostras biológicas, devido à presença de outras substâncias que absorvem luz neste mesmo comprimento de onda (BENZIE, 1996). O método pode ser bastante útil, quando se trabalha em sistemas homogêneos ou isolados, ou seja, quando se conhecem todos as possíveis interferentes presentes na amostra. Também se pode medir a absorção no UV após a separação dos componentes por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o que torna o resultado mais confiável. Contudo, os resultados devem ser expressos como dienos conjugados ou pela somatória dos hidroperóxidos e seus produtos de redução, hidroxí-derivados, considerando-se que a maioria das colunas usadas nestas análises (C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>) não consegue separá-los (FREI et al., 1988).

b) Malondialdeído (MDA);

É um produto secundário da LPO, derivado da  $\beta$ -ruptura de endociclicização de ácidos graxos polinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico (PETERSEN; DOORN, 2004). O MDA foi o foco de atenção da LPO durante muitos anos, pelo fato de poder ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA). O teste padrão, introduzido por Kohn e Liversedge, em 1944, é bastante popular porque é simples e rápido. Consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de TBA, em meio ácido e em alta temperatura. Essa reação, chamada de “teste das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)”, representa múltiplos métodos que utilizam o TBA, formando o complexo MDA:TBA (1:2), que tem absorção máxima em 532 nm e apresenta fluorescência ( $\lambda_{exc} = 515$  nm e  $\lambda_{em} = 553$  nm). Neste teste utiliza-se como padrão o MDA obtido pela hidrólise do tetrametoxipropano ou tetraetoxipropano. A avaliação do MDA pelo teste com TBA não é específica, pois outras substâncias que ocorrem em materiais biológicos também reagem com o TBA (VASCONCELOS et al., 2007). A técnica utilizando HPLC com detecção no UV, recentemente desenvolvida por Katepe, em soro

humano, revela-se mais específica, pois o soro é acidificado para liberar o MDA ligado ao grupo amino de proteínas.

c) Hidroxinonenal (HNE);

É o produto majoritário da oxidação de AGPI. Várias técnicas foram desenvolvidas para sua determinação em amostras biológicas, em sua forma livre, pois a recuperação de HNE no plasma é muito baixa e, como acontece com todos os aldeídos, há necessidade de sua derivatização para análise em HPLC (THÉROND et al., 2000). A derivatização com 2,4-dinitrofenilidrazina (DNFH), seguida de cromatografia em camada delgada e HPLC, com detecção por espectrofotometria no UV, consome um tempo considerável. Neste sentido, foi proposto um método utilizando-se 1,3-cicloexanodiona, que forma um derivado que pode ser detectado por fluorescência (YOSHINO et al., 1986). A seletividade do método pode ser aumentada por utilização de tetraidrofurano ao invés de cinco outros solventes, porém a recuperação de HNE é muito baixa (cerca de 8%) (HOLLEY et al., 1993). Mais recentemente, a quantificação de HNE em plasma passou a ser realizada com pentafluorobenzil-hidroxilamina para formar o derivado pentafluorobenziloxima, que é analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização química negativa (GC/NICI-MS) usando HNE deuterado como padrão interno. Por esse método, apesar de haver um aumento significativo na recuperação de HNE do plasma (60 a 80% versus 8%), sua concentração permanece, ainda, mais baixa do que a de outros aldeídos marcadores de LPO, devido, provavelmente, à ligação aos grupos sulfidril ou amina de proteínas (THÉROND et al., 2000).

d) Isoprostanos;

São produtos derivados da oxidação de AGPI por via não enzimática. Os isoprostanos mais comumente determinados são os da família F2 -isoprostanos, derivados da oxidação do ácido araquidônico (MOORE; ROBERTS, 1998). Ao contrário do que ocorre com os hidroperóxidos lipídicos (produtos primários da peroxidação lipídica - LPO), que se decompõem rapidamente nos fluidos e tecidos humanos, o F2 - isoprostanos são produtos secundários da LPO, quimicamente estáveis podendo, inclusive, ser dosados na urina. Essa estabilidade é a razão pela qual a sua quantificação desperta interesse, com o aparecimento de muitos protocolos para sua análise. Além disso, são produtos específicos da LPO, estão presentes em quantidades detectáveis em todos os fluidos biológicos e tecidos, sua

formação aumenta drasticamente em modelos animais de dano oxidativo e é modulada pelo estado antioxidante e seus níveis não são afetados pelo conteúdo de lipídios da dieta. Os isoprostanos seriam os melhores marcadores da LPO in vivo, não fosse pelo fato de estarem presentes em concentrações muito baixas em fluidos biológicos. Portanto, a quantificação destes produtos requer a utilização de técnicas ainda não disponíveis na maioria dos laboratórios como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Contudo, técnicas mais simples, como os imunoenaios, têm sido desenvolvidas, o que tornará esta determinação mais disponível (LAWSON et al., 1999).

### 2.3.2 Oxidação das proteínas

As espécies reativas de oxigênio também podem oxidar as proteínas e inibir a síntese proteica. As proteínas são, provavelmente, as mais afetadas pelos danos oxidativos por serem, em larga escala, catalisadores ao invés de mediadores estequiométricos (DALLE-DONNE et al., 2003). Durante a oxidação, as proteínas podem sofrer modificações na sua estrutura ou na sua função enzimática. Tais modificações podem levar à perda de aminoácidos ou à sua fragmentação, ocasionando modificações na função estrutural e catalítica das proteínas atingidas, podendo inibir o sistema proteolítico (LEVINE; STADTMAN, 2001; BLOOMER et al., 2006).

A oxidação das proteínas é acompanhada por um aumento global do nível de grupos de proteínas carboniladas, sendo utilizados como índices gerais para ocorrência do dano oxidativo (FINAUD et al., 2006).

A oxidação direta de lisina, arginina, prolina e treonina fornecem derivados carbonílicos. Além disso, grupos carbonila podem ser introduzidos em proteínas via reação com aldeídos derivados da LPO (MDA, HNE) ou gerados a partir da reação de redução de açúcar ou produtos de sua oxidação com resíduos de lisina (BERLETT; STADTMAN, 1997; AKAIKE, 2000; SHACTER, 2000).

O conteúdo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como marcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse oxidativo. É necessário, porém, identificar a natureza do grupo carbonila e qual dos resíduos de aminoácido sofreu o dano, já que a ligação de certos aldeídos a proteínas pode gerar carbonilas

por glicoxidação, não sendo, necessariamente, indicativo de oxidação de aminoácidos.

Há diversas técnicas para se medir a presença de grupo carbonila em proteínas, sendo imprescindível uma preparação adequada da amostra (LEVINE et al., 1990). Por isso, tal análise em plasma humano requer uma exaustiva sequência de procedimentos para separar as proteínas. O método mais conveniente é o espectrofotométrico, baseado na reação de DTNB com o grupo carbonila, que forma a hidrazona da proteína, cuja leitura de absorvância é feita a 370 nm (MCCALL; FREI, 1999; LEVINE, 2002; VASCONCELOS et al., 2007).

#### **2.4 Marcadores bioquímicos de lesão muscular**

O exercício físico provoca lesões nos músculos esqueléticos, além de outros tecidos, que variam desde uma lesão ultra-estrutural de fibras musculares até traumas envolvendo a completa ruptura do músculo, permitindo um extravasamento do conteúdo intracelular (enzimas, proteínas e fragmentos de proteína) (CLARKSON; NEWHAM, 1995). O aumento da concentração de proteínas citosólicas na circulação sanguínea após o exercício reflete a lesão muscular porque essas moléculas não têm a capacidade de atravessar a barreira da membrana sarcoplasmática (BROWN et al., 1997).

Miller; Gonçalves (1999) descreveram a localização, a função e a aplicação clínica da avaliação das proteínas citosólicas no plasma, entre elas:

##### **a) Creatina quinase (CK)**

Está presente em maior concentração no cérebro e nos músculos liso, cardíaco e esquelético. Possui baixo peso molecular o que permite o seu fácil extravasamento para o plasma. A CK catalisa a transferência de um grupo fosfato entre a creatina fosfato e a ADP, produzindo creatina e ATP. A atividade de CK no plasma encontra-se elevada em todos os tipos de distrofia muscular.

##### **b) Lactato desidrogenase (LDH)**

Está presente em muitos tecidos, especialmente nos músculos esqueléticos, coração e fígado. A LDH catalisa a conversão reversível do lactato a piruvato. Possui cinco isoenzimas, sendo a LDH5 encontrada nos músculos esqueléticos e no fígado.

A atividade da LDH no plasma encontra-se elevada quando há dano ou destruição celular.

Em condições basais de repouso, os valores séricos de CK e LDH variam amplamente de acordo com o método utilizado, devendo cada laboratório determinar seus próprios padrões de normalidade.

## 2.5 Sistemas de defesa antioxidante

Nas fibras musculares há tanto os antioxidantes enzimáticos como os não enzimáticos que trabalham como uma unidade complexa para controlar as espécies reativas de oxigênio (FINAUD et al., 2006). Dentro das fibras musculares esses antioxidantes são estrategicamente compartimentados no citoplasma e dentro de várias organelas. Coletivamente esses antioxidantes protegem as fibras musculares das injúrias oxidativas durante os períodos de aumento da produção de oxidantes (POWERS; JACKSON, 2008).

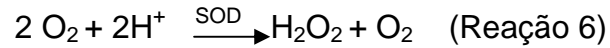
Segundo Bianchi; Antunes (1999) existem várias formas de proteção contra o dano oxidativo como agentes que convertem espécies reativas de oxigênio em moléculas menos ativas e previnem a sua transformação para formas mais reativas; diminuição da disponibilidade de pró-oxidantes como íons Ferro e Cobre por meio de proteínas de ligação; e vários agentes endógenos ou consumidos na dieta, com baixo peso molecular, que são capazes de “varrer” espécies reativas de oxigênio.

### 2.5.1 Sistema antioxidante enzimático

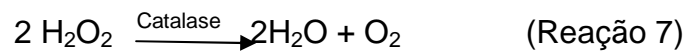
O sistema antioxidante enzimático está presente, predominantemente, no meio intracelular sendo representado principalmente pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (VASCONCELOS et al., 2007). Suas respectivas funções e localização são:

A SOD catalisa a dismutação do ânion radical  $O_2^{\bullet -}$  a  $H_2O_2$  e  $O_2$  (reação 6). As principais formas de superóxido dismutases, encontradas em humanos, são a Cobre/Zinco - SOD localizada no citosol, além de lisossomas, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (tetramérica) e a Manganês - SOD localizada na mitocôndria (DAS et al., 1997; POWERS; LENNON, 2000).

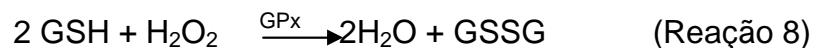




A CAT atua na decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (reação 7). A CAT, cujo sítio ativo contém o grupo heme, está enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete. A CAT também é encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco (ANTUNES et al., 2002).



A GPx atua sobre peróxidos em geral, em uma reação que tem a glutatona como co-fator (reação 8). A família de GPx reduz  $\text{H}_2\text{O}_2$  e outros peróxidos a água ou álcool (equação 3). Apresenta-se sob 4 formas: GPx 1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; GPx 2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx 3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos, e a GPx 4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo, também, o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais à base timina do DNA. A família de GPx integra o grupo de selenoproteínas que apresentam o selênio (Se) em seu sítio ativo. O mineral é obtido da alimentação ligado a aminoácidos: selenometionina, em alimentos de origem vegetal e selenocisteína, em alimentos de origem animal (JENKINS; GOLDFARB, 1993; ANTUNES et al., 2002).



### 2.5.2 Sistema antioxidante não enzimático

O sistema antioxidante não enzimático apresenta-se principalmente no meio extracelular, sendo por isso analisado em plasma e soro sanguíneo. Compõe-se de um conjunto de antioxidantes que podem ser agrupados em compostos produzidos *in vivo*, como é o caso da glutatona (GSH), da ubiquinona e do ácido úrico ou em

compostos obtidos diretamente da alimentação tais como vitaminas, polifenóis e outros (VASCONCELOS et al., 2007). Suas respectivas funções e localização são:

A Glutathione (GSH) é um tripeptídeo que exerce funções essenciais na célula, destacando-se sua função como cofator da família de enzimas GPx, em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto de glutathione (GSSH). A GSH é o único tiol não protéico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular antioxidante inclui a desintoxicação de xenobióticos e de espécies reativas de oxigênio. A falha nesta função resulta na formação de meta-hemoglobina e conseqüente incapacidade do eritrócito em transportar oxigênio, além de causar uma variação na forma do eritrócito, impedindo sua passagem pelos órgãos vitais (ALVES et al., 2003).

A coenzima Q<sub>10</sub> ou ubiquinona é o único lipídio sintetizado de forma endógena pela via do mevalonato, que apresenta função redox. É um antioxidante que desempenha papel central na cadeia respiratória mitocondrial, na cadeia de transporte de elétrons extra-mitocondrial, participa da regulação da permeabilidade e diminui a oxidação de proteínas nas membranas celulares, previne a oxidação do DNA e impede a disfunção endotelial, provavelmente por aumentar a disponibilidade de NO. O ubiquinol (C<sub>10</sub>QH<sub>2</sub>) é o produto da redução de CoQ, sua forma antioxidante, que inibe a iniciação e propagação da LPO, com conseqüente impedimento da formação de radical peroxila (ROO•). Outra função antioxidante da coenzima Q<sub>10</sub> é a regeneração da vitamina E do radical tocoferila (TURUNEN et al., 2004).

O ácido úrico deriva do metabolismo das purinas e é produzido pela oxidação de hipoxantina e xantina pela xantina oxidase (XO) e xantina desidrogenase (XD). Na maioria das espécies, a enzima peroxissomal urato-oxidase converte urato a alantoína, que, por sua vez, é convertida a alantoato e depois a glioxilato e uréia, todos produtos mais solúveis em água que o urato. Seres humanos e outros primatas não apresentam a urato-oxidase, daí, o urato acumula-se no plasma e é excretado na urina. Em pH fisiológico, o ácido úrico é dissociado a urato, que tem solubilidade menor em água e sua concentração encontra-se muito próxima de seu limite de solubilidade (300 µM). Por isso o excesso de produção de urato leva à formação de cristais, o que ocorre na enfermidade gota, tratada com alopurinol, inibidor de XO/XD. O ácido úrico atua como antioxidante por sua capacidade de quelar metais de transição e sua concentração no plasma é maior que a de outros antioxidantes, como vitaminas C e E (GHISELLI et al., 2000).

O termo “vitamina E” é a designação comum de duas diferentes famílias de compostos que ocorrem na natureza: os tocoferóis e os tocotrienóis, que exibem, qualitativamente, a atividade biológica do  $\alpha$ -tocoferol, que é o composto mais potente e, geralmente, a forma predominante. Estruturalmente, tocoferóis e tocotrienóis diferem apenas na cadeia lateral e ambos se classificam em  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , dependendo do número e posição do grupo metila. O tocoferol é o antioxidante lipossolúvel que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas e lipoproteínas. Intercepta o radical peroxila ( $RO_2\bullet$ ), resultante com a formação do radical tocoferila, que será regenerado por ascorbato, glutatona ou ubiquinol à tocoferol (BUETTNER, 1993).

O ácido ascórbico é essencial ao homem, pois não pode ser sintetizado a partir da glicose que é seu precursor, como ocorre em plantas e na maioria dos animais. Em sistemas biológicos, em pH fisiológico (7,4), 99,95% da vitamina C ( $AsCH_2$ ) encontra-se na forma de ascorbato ( $Asc^-$ ), que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um  $H^\bullet$  ou  $[H^+ + e^-]$  para um radical. O ascorbato ( $AsCH^\bullet$ ) atua como antioxidante sobre espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, em ambiente biológico aquoso, resultando na formação do ânion radical semidesidroascorbato ( $Asc^\bullet$ ), ou ascorbila, pouco reativo. Atua eficientemente sobre o ânion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio, o hipoclorito e os radicais hidroxila e peroxila. O ascorbato pode atuar diretamente nas membranas celulares, por impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na face lipofílica da membrana. Além disso, pode regenerar o ânion radical urato, fechando o ciclo de atuação antioxidante do mesmo (HALLIWELL; GUTTENDGE, 1999).

Os carotenóides são pigmentos intensamente coloridos, lipossolúveis, sintetizados por plantas e microrganismos, presentes em muitos alimentos, particularmente frutas, vegetais e peixes. Existem mais de 600 tipos de carotenóides e apenas 10% têm atividade pró-vitamina A, que é a capacidade de conversão dos carotenóides em retinol. As propriedades antioxidantes dos carotenóides estão associadas com sua capacidade de capturar radicais e outras espécies, como oxigênio *singlete*, em baixas concentrações e em baixa pressão parcial de oxigênio, tais como aquelas da maioria dos tecidos sob condições fisiológicas. No entanto, as funções de carotenóides da dieta na prevenção de doenças não estão

definitivamente estabelecidas, havendo muita controvérsia na literatura (EL-AGAMEY et al., 2004).

Os polifenóis são moléculas oriundas do metabolismo secundário dos vegetais e normalmente estão envolvidos na proteção contra raios ultravioletas e agressões por patógenos, insetos e fungos (SCALBERT; WILLIAMSON, 2009). Constituem um grupo heterogêneo de várias classes de substâncias com propriedade antioxidante (CLARKSON; THOMPSON, 2000). Devido a sua elevada capacidade antioxidante, os polifenóis têm sido associados a benefícios à saúde como cardioproteção, anti-agregação plaquetária, redução de lipídeos e de glicose plasmáticos (SEERAM et al., 2008; LEIFERT; ABEYWARDENA, 2008). Os polifenóis compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos nos vegetais, tornando-os fontes destas substâncias, presentes em vários alimentos e bebidas, sendo em quantidades maiores na uva e em seus derivados (CASTELLI, 1996; SILVA et al., 2005).

Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonóides (antocianinas, proantocianinas, catequinas, flavanóis e flavonóis), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos), uma larga variedade de taninos e os estíbenos (resveratrol) (FRANCIS, 2000; MALACRIDA; MOTTA, 2005; MARGARITIS; ROUSSEAU, 2008).

Entre os polifenóis destaca-se o resveratrol que é uma fitoalexina produzida por diversas plantas, em especial, na uva e seus derivados (FREMONT, 2000). Na uva esta fitoalexina é sintetizada na casca como resposta ao estresse causado por ataque fúngico, dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta. O resveratrol é sintetizado naturalmente na planta sob duas formas isômeras: trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno). O isômero trans-resveratrol é convertido para cis-resveratrol em presença da luz visível, pois esta forma é mais estável (SAUTER et al., 2005).

O organismo humano possui alto grau de absorção intestinal do resveratrol. Embora a biodisponibilidade da dose oral encapsulada seja pequena, foram observados efeitos antioxidantes com uma dose de 25 mg.d-1 (GU et al., 2000; GOLDBERG et al., 2003; WALLE et al., 2004; ALMEIDA et al., 2009). O efeito da ingestão de altas doses de resveratrol, tanto em animais como em humanos, foram investigados e não foram encontrados efeitos adversos, evidenciando a não toxicidade do mesmo (WILLIAMS et al., 2009; COTTART et al., 2010).

O resveratrol exerce efeitos antioxidantes nos sistemas biológicos por meio de múltiplos mecanismos biológicos, como a prevenção da oxidação do LDL via a quelação do cobre, o sequestro de radicais livres, a indução do aumento de várias enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona redutase, a proteção do endotélio vascular, entre outros (PINTO et al., 1999; SAIKO et al., 2008).

A ação antioxidante do resveratrol foi identificada em diferentes situações, entre elas, na atividade anti-neoplásica, anti-viral, neuroprotetora, anti-envelhecimento e anti-inflamatória (ANEKONDA, 2006; SHEN et al., 2006; KIM et al., 2006; KIRIMLIOGLU et al., 2008; PANDEY; RIZVI, 2011). Apesar da constatação das ações antioxidantes do resveratrol, não foram encontrados na literatura estudos que envolvessem a suplementação com resveratrol prevenindo danos celulares e teciduais durante a realização de exercícios físicos intensos.

O potencial efeito antioxidante do resveratrol sobre biomarcadores de lesão tecidual e dano oxidativo observado em população saudável sobre intenso exercício físico, pode estabelecer bases de conhecimentos para estudos relacionados com elevado estágio de estresse oxidativo causado por outros fatores que não a atividade física.

### **3 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da suplementação com resveratrol sobre indicadores bioquímicos de lesão tecidual e de desequilíbrio oxidativo em militares submetidos a exercício físico intenso.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

- Identificar alterações bioquímicas de lesão tecidual e de oxidação de lipídeos e proteínas, antes e durante a prática de exercício físico intenso;
- Avaliar a influência da suplementação com resveratrol sobre os indicadores de lesão tecidual e de oxidação de lipídeos e proteínas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 População

Dentre os militares matriculados para o Curso Básico Pára-quedista do Exército Brasileiro (n= 160), aceitaram participar do estudo 100 militares do gênero masculino ( $22,9 \pm 1,8$  anos). Dez dias antes do início do curso, foi realizada uma avaliação médica a fim de atestar as condições de saúde dos voluntários. Foram usados como critérios de exclusão: o uso de medicamentos (antibióticos e anti-inflamatórios); de suplementação com substâncias antioxidantes; e a existência de lesões neuromusculares, ou alguma enfermidade. Assim, 98 militares foram divididos através de sorteio em dois grupos. O grupo suplementado (n=49) recebeu suplementação de resveratrol e o grupo placebo (n= 49) recebeu maltodextrina.

Por motivos de desistência voluntária, em função da exigência física e psicológica do curso ou por ocorrência de lesões, somente 16 militares do grupo suplementado e 28 do grupo placebo concluíram o estudo, sendo esta a amostragem considerada para o estudo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (COEP 028.3.2007/2008). Os voluntários concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### 4.2 Delineamento do estudo

A coleta de todos os dados ocorreu na Área de Estágio Pára-quedista do Exército Brasileiro, no RJ, local do treinamento físico. No início do estudo (T0), foi realizada a primeira coleta de sangue, a divisão aleatória dos grupos e, para caracterizar os participantes, foram mensurados dobras cutâneas, massa corporal e estatura.

Segundo o modelo duplo-cego, os participantes de ambos os grupos fizeram uso do suplemento (SUPL) ou placebo (PLA) durante 15 dias (primeira fase), sendo este período dividido em 10 dias sem atividade física intensa, visando o nivelamento do consumo e a otimização da biodisponibilidade do resveratrol e cinco dias com treinamento físico intenso. Ao final da primeira fase foi realizada a segunda coleta de sangue (T1). Após os 15 dias de suplementação, ambos os grupos realizaram exercícios físicos intensos durante 14 dias, sem uso de qualquer substância

antioxidante (segunda fase). Finalizando o estudo, foi realizada a terceira coleta de sangue (T2). A Figura 1 sintetiza o desenho experimental.

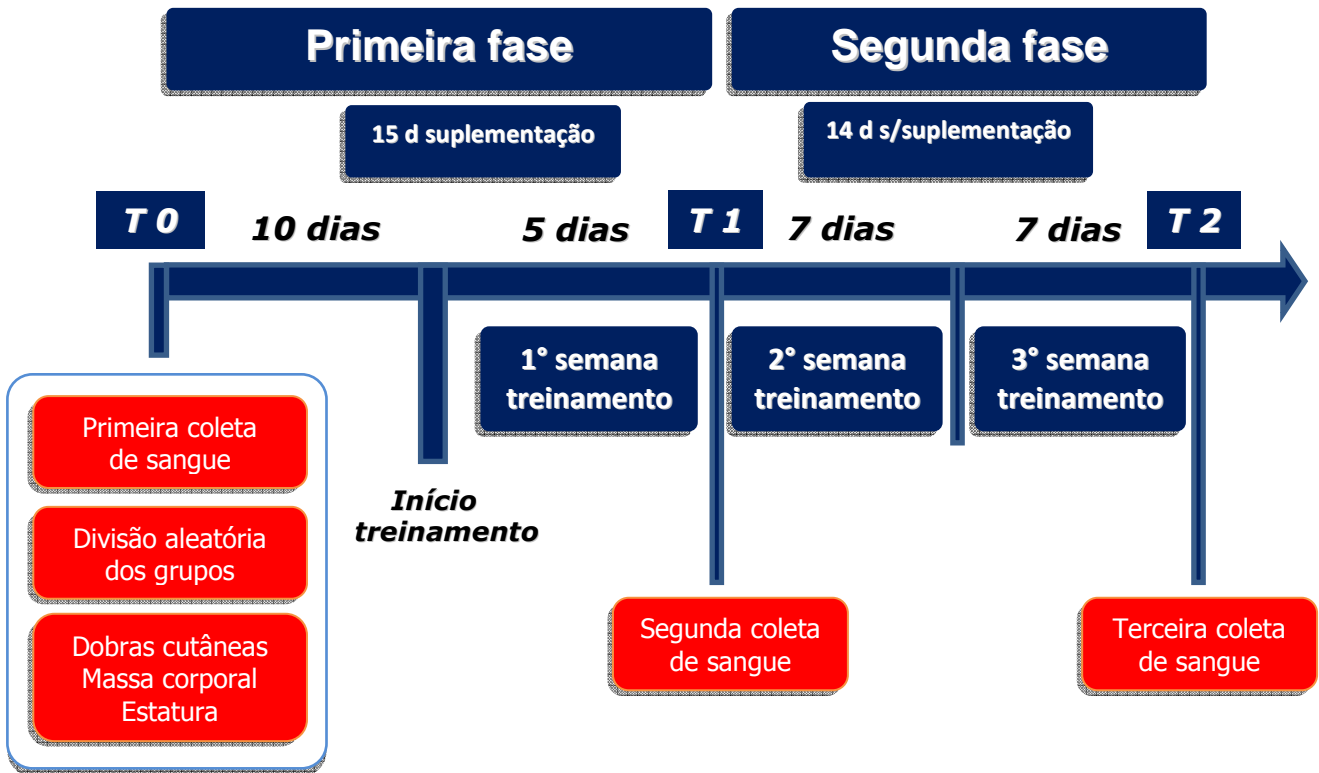


Figura 1- Esquema de coleta de dados ao longo do estudo.

#### 4.3 Atividade física

O Curso Básico Pára-quedista do Exército Brasileiro é dividido em duas etapas distintas, a primeira é baseada em três semanas de treinamento físico intenso para a seleção dos militares e a segunda, com duração de quatro semanas, para aprendizagem técnica. O presente estudo não alterou a rotina de treinamentos e transcorreu durante a primeira etapa (três semanas), quando os militares realizaram exercícios físicos intensos durante 5h diárias (07:00 h às 12:00 h), 5 dias na semana (segunda à sexta -feira). Como prática comum, os militares foram orientados a manter a hidratação durante todo o período de treinamento intenso.

Ambos os grupos foram submetidos à mesma rotina de treinamento diário, executando as atividades no mesmo ritmo, conduzido pelo instrutor guia (ginástica calistênica). As atividades físicas consistiram em corrida contínua e treinamento neuromuscular específico para atividades militares como pista de cordas, ginástica



básica, pista de treinamento em circuito, ginástica com toros, flexão na barra e flexão de braço.

#### 4.4 Suplementação

A suplementação com 100 mg de resveratrol encapsulado/dia foi estabelecida aleatoriamente, pois não foram encontrados estudos que envolvessem a suplementação com resveratrol prevenindo danos celulares e teciduais durante a realização de exercícios físicos intensos.

Entretanto, foi considerado a maior demanda de antioxidantes exigida para a prática de exercício intenso e o bom condicionamento físico dos militares, pois foram previamente testados no teste físico de entrada com índices mínimos pré-estabelecidos na Portaria nº 101-DECEX. Além disso, Almeida et al (2009) observaram os efeitos de diferentes concentrações (25 a 150 mg) de resveratrol e não identificaram efeitos colaterais.

As cápsulas foram ingeridas pela manhã (duas unidades/dia), visando a maior biodisponibilidade (Cottart *et al.*, 2010) e o resveratrol foi encapsulado pela Farmácia de Homeopatia Quintessência LTDA. CGC 311.255.860.003-06.

#### 4.5 Avaliação antropométrica

A massa corporal total foi mensurada em balança digital Filizola<sup>®</sup>, com precisão de 100 gramas. A estatura foi obtida com o uso de estadiômetro portátil e, posteriormente, foi calculado o índice de massa corporal (IMC) dividindo a massa corporal total pela estatura elevado ao quadrado ( $\text{Kg/m}^2$ ). A avaliação da composição corporal foi determinada a partir da mensuração das dobras cutâneas (DC): peito, abdominal e coxa, medidas com compasso Lange. Para o cálculo do percentual de gordura foi utilizado o protocolo de 3DC de Jackson e Pollock (1978).

#### 4.6 Coleta de sangue

Foram realizadas três coletas de sangue: no momento basal (T0), ao final da primeira fase de treinamento (15<sup>o</sup> dia de suplementação; T1) e ao final da segunda fase de treinamento (14<sup>o</sup> dia de treinamento sem a utilização do suplemento; T2).

Para a realização das coletas de sangue, após o término da sessão de treinamento, os militares realizaram uma única refeição e permaneceram em jejum por seis horas até a coleta de sangue. Durante este período, os voluntários foram incentivados a manter a hidratação consumindo somente água.

Amostras de sangue (15 ml) foram coletadas através de punção venosa em tubos apropriados contendo ou não anticoagulantes (heparina e EDTA) para obtenção do plasma ou soro. Os tubos com heparina foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos para separação do plasma e células. O plasma foi armazenado em tubos *ependorf* e foram congelados (-20°C) para posteriores análises bioquímicas. Os tubos contendo EDTA foram mantidos sob refrigeração para determinação de indicadores hematológicos. O sangue contido nos tubos livres de anticoagulante foi destinado às análises enzimáticas.

#### **4.7 Análises hematológicas e bioquímicas no sangue**

A análise hematológica foi determinada através do Analisador Hematológico automático ABX micros 60<sup>®</sup>, com os seguintes valores de referência de normalidade para o homem: a quantidade média de hemácias por milímetro cúbico é de 4,5 a 6,1  $10^6/\text{mm}^3$ , as cifras de hematócrito oscilam entre 39% e 53% e a concentração normal de hemoglobina varia em torno de 12,8 g/dl a 17,8 g/dl.

Para identificar lesão muscular foi determinada a concentração de CK, pelo método de imunoinibição (kit Ebran Prod Laboratoriais, São Paulo; valor de referência CK: 24 – 195 UI/L).

A LPO foi analisada pela dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), pelo método colorimétrico (STEELS et al., 1994). Inicialmente 1000  $\mu\text{L}$  de TCA 10% (ácido tricloroacético) foram adicionados a 500  $\mu\text{L}$  de plasma, para desproteinização, seguido de centrifugação a 4000 rpm por 6 min e o recolhimento do sobrenadante. O ensaio foi feito com 100  $\mu\text{L}$  deste plasma desproteinizado, 300  $\mu\text{L}$  de TCA 10%, 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,1 M e 600  $\mu\text{L}$  de TBA 1% em NaOH 0,05 M. A mistura reacional foi incubada em *ependorfs* bem fechados a 100°C por 15 minutos. Os *ependorfs* foram resfriados e a absorbância lida em espectrofotômetro a 532 nm. Os valores de absorbância foram empregados para determinar a concentração de malondialdeído (MDA) em mmol / L de plasma.

A carbonilação das proteínas foi determinada pela derivatização da carbonila de proteínas oxidadas com dinitrofenilhidrazina (DNPH) (DALLE-DONNE et al., 2003). Foi utilizado 0,1 mL de plasma para determinação da concentração de proteínas pelo método de Stickland. Aplicou-se 0,35 mL de proteínas em uma membrana de nitrocelulose úmida com PBS (tampão fosfato salino livre de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ ). A membrana foi incubada com 0,1mg de DNPH por mL (HCl 2N) por 5 minutos, para derivatização das proteínas carboniladas, formando dinitro-fenil-hidrazona (DNP). A seguir, a membrana foi lavada com ácido clorídrico (HCl) 5N para remoção do DNPH não reagido e incubada em solução bloqueadora por 24h. A ligação com o anticorpo primário ocorreu com a incubação da membrana com 2mL da solução bloqueadora recém preparada acrescida de 4 $\mu$ L de anti-DNP por 2h a temperatura ambiente com agitação suave. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS. Para a ligação do anticorpo secundário IgG, a membrana foi incubada inicialmente em Tris-HCl 50mM pH 7.5 contendo cloreto de sódio (NaCl) 15mM por 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, transferiu-se a membrana para um recipiente contendo a solução bloqueadora livre de fosfato e azida e adicionou-se o anticorpo secundário. Para a revelação, tratou-se a membrana com diaminobenzidina tetrahydroclorato e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ). Após o aparecimento das bandas, a membrana foi lavada com água destilada e transferida para tampão PBS. A análise das imagens (densitometria) foi feita usando-se o programa VisionWorks LS software (UVP-Bioagency).

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. A comparação intragrupo foi testada pela Análise de Variância com medidas repetidas, seguida de pós-teste de Tukey para verificar onde estavam as diferenças encontradas. Para a comparação intergrupos foi utilizada a Análise de Variância considerando dois fatores (tempo e uso de suplementação ou placebo), seguida de pós-teste de Holm Sidak para verificar onde estavam as diferenças encontradas. A análise estatística foi realizada pelo software Sigma Stat 3.5 e valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 6 RESULTADOS

No início do estudo (T0) todos os militares apresentaram características antropométricas (Tabela 1), perfil hematológico (Gráficos 1, 2 e 3) e bioquímico (Gráficos 4, 5 e 6) similares.

A contagem de hemácias ( $p<0,01$ ), do percentual de hematócrito ( $p<0,01$ ) e da concentração de hemoglobina ( $p<0,01$ ) reduziram em ambos os grupos ao longo do estudo (Gráficos 1, 2 e 3).

A concentração da CK ( $p<0,01$ ) aumentou (em média 635%) após a primeira fase de treinamento (T1), em ambos os grupos, quando comparado com o valor basal (T0). Após a segunda fase de treinamento (T2) retornou aos valores basais (T0), em ambos os grupos (Gráfico 4).

Após 15 dias de suplementação (primeira fase), para todas as variáveis bioquímicas estudadas, o uso de resveratrol suplementar não causou diferença entre os grupos, exceto sobre a concentração de proteína carbonilada, que foi menor (22,7%) no grupo suplementado ( $p=0,044$ ), quando comparado ao grupo placebo no mesmo período.

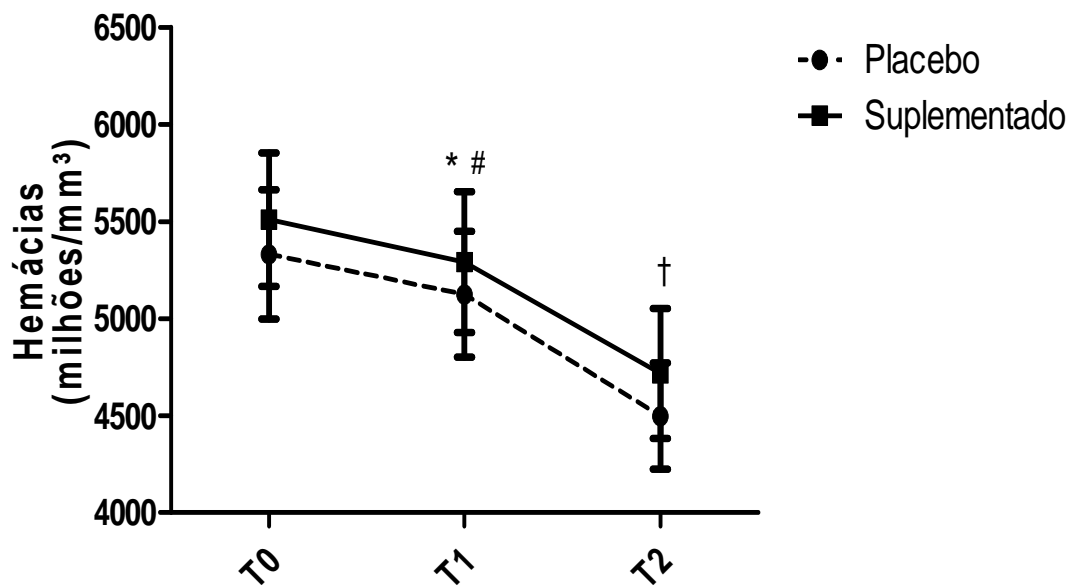
A concentração de proteína carbonilada retornou ao perfil inicial após 14 dias com exercícios físicos intensos, sem uso de suplementação (segunda fase) (Gráfico 5). Os produtos da LPO, não foram influenciados pela prática da atividade física intensa ou pelo uso da suplementação com resveratrol, pois se mantiveram similares para ambos os grupos durante todo o estudo (Gráfico 6).

**Tabela 1** – Características antropométricas e de composição corporal dos militares que participaram do estudo com uso de suplemento ou placebo.

	<b>Grupo Suplementado</b>	<b>Grupo Placebo</b>
n	16	28
Idade (anos)	22,8 ± 2	22,9± 1,7
Massa corporal (Kg)	69,8 ± 7,3	70,5 ± 8,7
Estatura (m)	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	22,6 ± 2,6	23,1 ± 1,9
Gordura (%)	12,5 ± 3,7	12,9 ± 3,1

IMC – índice de massa corporal.

Não houve diferença entre os grupos

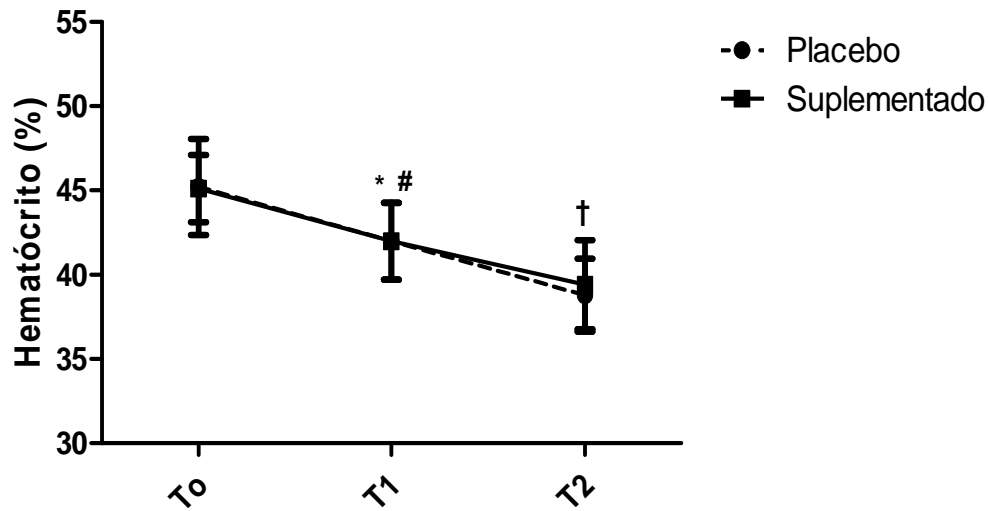


**Gráfico 1** – Contagem de Hemácias ao longo do estudo, em militares suplementados e não suplementados com resveratrol;

\* Diferença intragrupo entre T0 e T1, ( $p < 0,01$  em ambos os grupos);

# Diferença intragrupo entre T1 e T2, ( $p < 0,01$  em ambos os grupos);

† Diferença intragrupo entre T0 e T2, ( $p < 0,01$  em ambos os grupos).

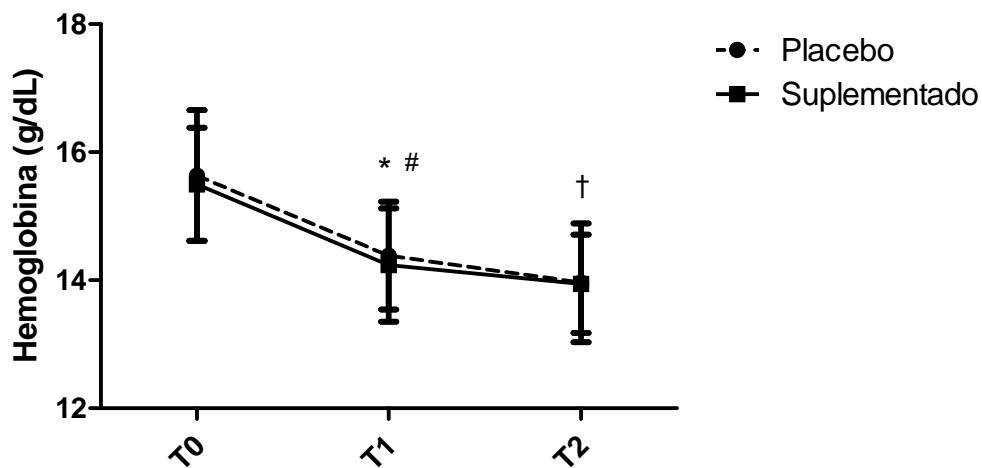


**Gráfico 2** - Percentual de hematócrito ao longo do estudo, em militares suplementados e não suplementados com resveratrol;

\* Diferença intragrupo entre T0 e T1, ( $p < 0,01$  em ambos os grupos);

# Diferença intragrupo entre T1 e T2, ( $p < 0,01$  em ambos os grupos);

† Diferença intragrupo entre T0 e T2, ( $p < 0,01$  em ambos os grupos).

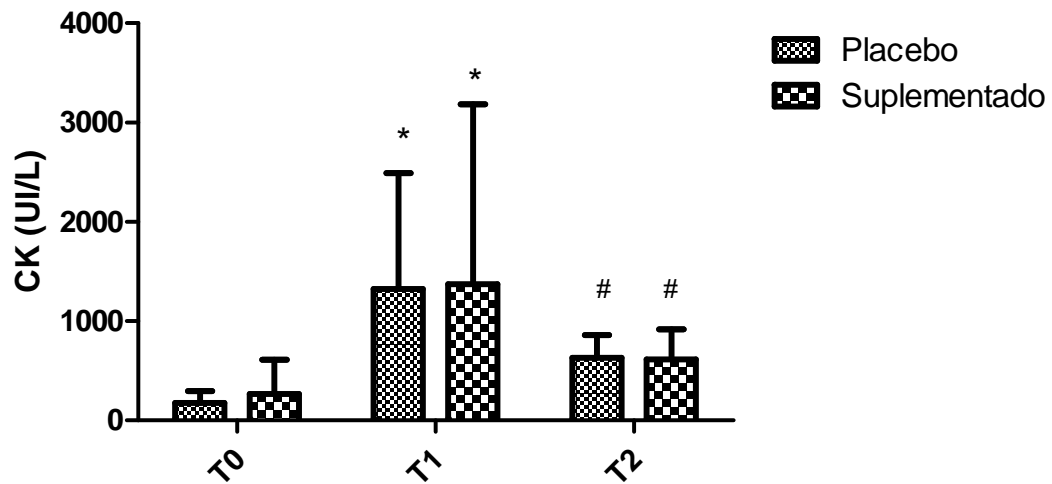


**Gráfico 3** - Concentração de hemoglobina ao longo do estudo, em militares suplementados e não suplementados com resveratrol;

\* Diferença intragrupo entre T0 e T1, ( $p < 0,01$  em ambos os grupos);

# Diferença intragrupo entre T1 e T2, ( $p < 0,01$  em ambos os grupos);

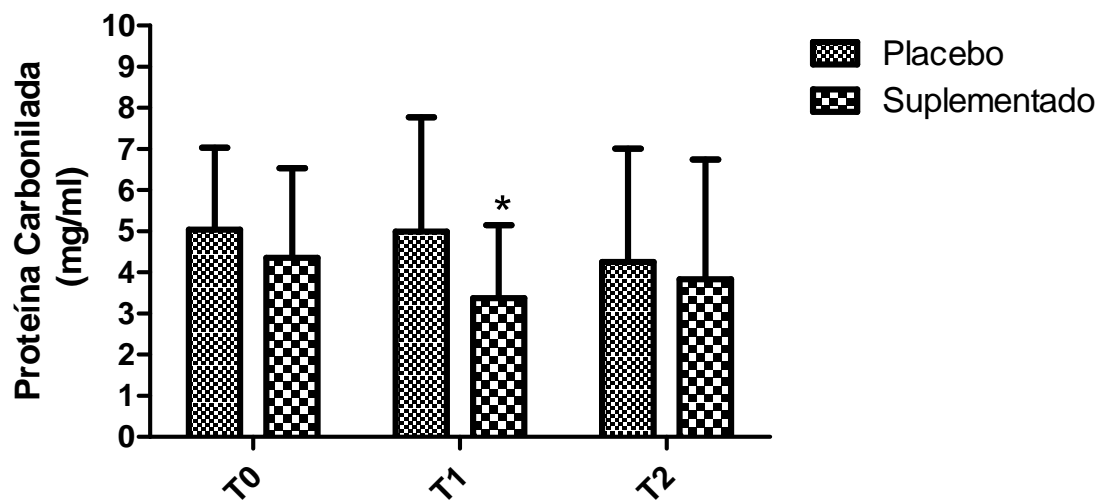
† Diferença intragrupo entre T0 e T2, (somente para o grupo placebo,  $p < 0,01$ ).



**Gráfico 4** - Concentração de CK ao longo do estudo, em militares suplementados e não suplementados com resveratrol;

\* Diferença intragrupo entre T0 e T1 ( $p < 0,01$  em ambos os grupos);

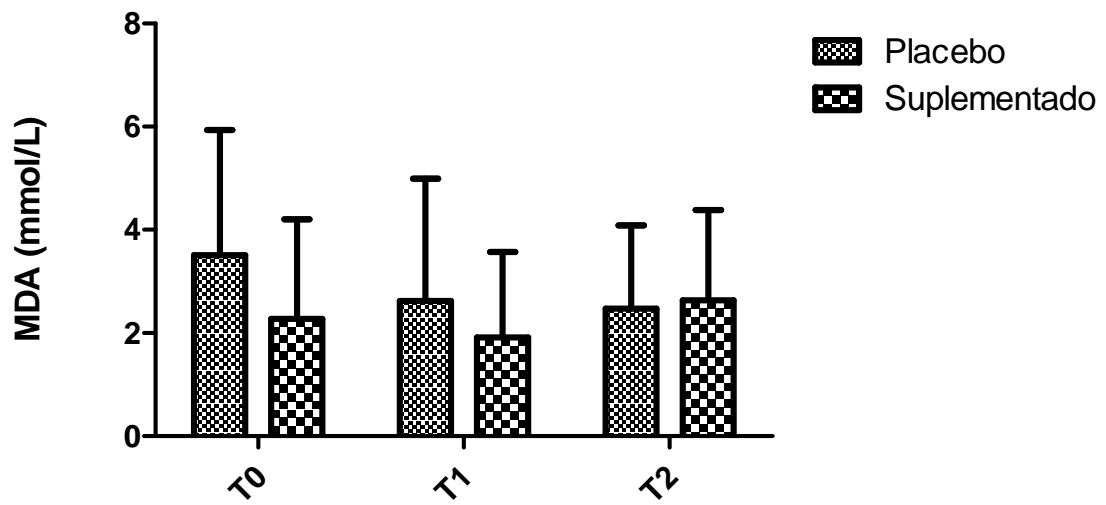
# Diferença intragrupo entre T1 e T2, (placebo,  $p = 0,019$ ; suplementado  $p = 0,013$ ).



**Gráfico 5** - Concentração de proteína carbonilada ao longo do estudo, em militares suplementados e não suplementados com resveratrol;

\* Diferença em T1 entre os grupos placebo e suplementado ( $p = 0,04$ ).





**Gráfico 6** - Concentração de Malondialdeído ao longo do estudo, em militares suplementados e não suplementados com resveratrol;  
Não houve diferença significativa durante todo o estudo.

## 7 DISCUSSÃO

Os participantes do estudo, de ambos os grupos, eram adultos, eutróficos, de acordo com o IMC (OMS, 2000) e apresentaram composição corporal compatível com as exigências para o desempenho profissional do Exército Brasileiro (RODRIGUES et al. 2004; RODRIGUES et al. 2007). No início do estudo, todos apresentavam bom condicionamento físico, exigência para a matrícula no Curso Básico Pára-quedista, avaliado por testes físicos com índices mínimos pré-estabelecidos pela Portaria nº 101 – DECEX.

Os resultados referentes aos valores hematológicos mostraram, em ambos os grupos, uma redução na contagem das hemácias, no percentual do hematócrito e na concentração de hemoglobina, possivelmente, devido ao aumento do volume plasmático em resposta ao exercício físico intenso e à manutenção da hidratação que ocorreu durante o treinamento e o jejum. A manutenção dos valores hematológicos dentro das faixas consideradas adequadas suporta a possibilidade de hemodiluição e afasta a hipótese de anemia marginal.

Estudos apontam para as vantagens do uso de suplementação com antioxidantes por atletas (PETERNELJ; COOMBES, 2011). Porém, os efeitos desta suplementação sobre parâmetros de lesão muscular são ambíguos e de difícil comparação pela diversidade de estratégias de suplementação (tempo e dosagem), diferentes populações e protocolos de exercícios (GOLDFARB, 1999; MCGINLEY et al. 2009).

A CK é a enzima mais estudada para identificar lesão muscular, devido à prática de exercício intenso, com predominância da contração muscular na fase excêntrica (SORICHTER, et al., 1999), pois seu extravasamento para a circulação sanguínea está relacionado com a lesão ultra-estrutural de fibras musculares (CLARKSON; NEWHAM, 1995).

Em condições basais de repouso, os valores séricos de CK variam amplamente de acordo com o método utilizado, devendo cada laboratório construir seus próprios padrões de normalidade (MILLER; GONÇALVES, 1999). Além disso, existe uma grande variabilidade dos resultados em função da idade, gênero, raça, massa muscular, nível de treinamento, tipo, intensidade e duração do exercício (BRANCACCIO et al., 2007).

Stupka et al. (2001), encontraram como resposta a um exercício agudo praticado por sedentários, um aumento diferenciado na concentração de CK de acordo com o sexo, sendo significativamente menor em mulheres (182%) do que em homens (920%). Collinson et al. (1995), observaram um aumento de 22,6 vezes na concentração sérica de CK em marinheiros após intensos exercícios de treinamento militar.

Os militares deste estudo apresentaram valores de CK, em T0, acima (108%) do considerado adequado pelo valor de referência adotado (24 – 195 UI/L). Treinamentos diários podem resultar em elevação crônica da CK e a concentração em repouso costuma ser maior em atletas do que o encontrado em sedentários (FALLON et al., 1999; HORTOBAGYI; DENHAN, 1989). O uso da suplementação com resveratrol (primeira fase) não influenciou o indicador de lesão muscular, pois os dois grupos apresentaram aumento da concentração sérica de CK. Similar ao observado por Morillas-Ruiz et al. (2006), que encontraram aumento da concentração sérica dessa enzima, quando compararam o resultado basal com os obtidos após exercício intenso em ciclistas condicionados e suplementados com polifenóis. Esses resultados mostram que a suplementação com polifenóis não é capaz de prevenir a lesão muscular, assim como outros nutrientes antioxidantes, como as vitaminas C e E, que não protegem contra o dano muscular (SHAFAT et al., 2004). Porém, alguns autores relatam que há proteção da força e da fadiga, como Bowtell et al. (2011) que não observaram diminuição da concentração sérica de CK. No entanto, encontraram um aumento na recuperação da força isométrica, após suplementação com suco de cereja, 7 dias antes e dois dias após a execução de 10 séries de 10 repetições de extensão de joelhos.

A redução da concentração sérica de CK ao final da segunda fase do estudo, em ambos os grupos, caracteriza uma adaptação ao exercício que, possivelmente, ocorreu por vários estímulos entre eles, a diminuição do recrutamento dos neutrófilos e monócitos para os locais de dano muscular inicial; a promoção de alterações estruturais, como a redução do comprimento e aumento do número de sarcômeros; e o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e biogênese mitocondrial (CLARKSON; HUBAL, 2002; NIESS; SIMON, 2007; SACHDEV; DAVIES, 2008). Os resultados obtidos após a primeira e segunda fase, analisados em conjunto, indicam que a suplementação com resveratrol não retardou a sinalização celular,

possivelmente mediada pelas ERO, permitindo a adaptação ao esforço (POWERS; JACKSON, 2008).

A produção de radicais livres é uma sequela do aumento do consumo de oxigênio que ocorre com o exercício e guarda uma estreita relação com o dano muscular (KANTER et al., 1993). A produção de radicais livres ocorre tanto durante o exercício como durante o estado de repouso no período de recuperação (GOLDFARB, 1993). A produção de níveis baixos a moderados de ERO, durante a realização de exercícios físicos, parece exercer a função de sinalizadores celulares para a adaptação ao exercício. Entretanto, a alta e contínua produção de ERO pode gerar dano oxidativo a todos os tipos de moléculas biológicas (POWERS et al., 2011).

O dano oxidativo atinge proteínas, lipídios e DNA podendo causar prejuízos estruturais e funcionais às células (ALESSIO, 1993). No entanto, as proteínas são, provavelmente, mais afetadas pelos danos oxidativos por serem, em larga escala, catalisadores ao invés de mediadores estequiométricos (DALLE-DONNE et al., 2003). A exposição de proteínas às espécies reativas de oxigênio, altera a estrutura físico-química com modificações globais, como a conversão para derivados de carbonila (BEAL, 2002). Tais modificações podem levar à perda de aminoácidos ou à sua fragmentação, ocasionando modificações na função estrutural e catalítica das proteínas atingidas, podendo inibir o sistema proteolítico (LEVINE; STADTMAN, 2001; BLOOMER et al., 2006).

Tem sido relatado que o resveratrol exerce ações químicas e fisiológicas, com propriedades estrogênicas, antiplaquetária, anti-inflamatória e potentes ações antioxidantes, inibindo a formação de radicais livres no cérebro, medula espinhal, fígado e membrana das células vermelhas. (YANG; PIAO, 2003; SHAKIBAEI et al., 2009; PANDEY; RIZVI, 2011).

Não foram encontrados na literatura estudos que investigassem a ação do resveratrol sob marcadores de oxidação proteica induzida por atividade física intensa em humanos. No entanto, foi pesquisada a ação do resveratrol sobre a oxidação proteica induzida pelo *t*-Butilhidroperóxido em plasma humano. O estresse oxidativo foi induzido no plasma de 17 voluntários saudáveis pela incubação de  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> *tert*-Butilhidroperóxido (*t*-BHP) por 30 min a 37°C. Aos plasmas foram adicionadas diferentes concentrações de resveratrol (10, 1, 0,1 μmol L<sup>-1</sup>) e foi observado menor

concentração de carbonilas em todas as variações, embora o plasma incubado com  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  demonstrou maior proteção às proteínas (PANDEY; RIZVI, 2010).

No presente estudo a suplementação com resveratrol durante 15 dias, reduziu a carbonilação das proteínas, quando comparado com o grupo placebo no mesmo período de tempo. A concentração de proteína carbonilada retornou ao perfil inicial após a realização de exercícios físicos intensos durante 14 dias sem o uso do suplemento. Assim, a suplementação com resveratrol pode ser relevante para a manutenção da funcionalidade celular, protegendo contra as consequências negativas causadas pela produção de espécies reativas de oxigênio, evitando a disfunção endotelial e o desenvolvimento de doenças crônicas, permitindo a manutenção da higidez física dos militares, que é uma condição essencial para alcançar o melhor desempenho durante a realização do curso.

A ação das espécies reativas de oxigênio sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, leva à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996). Ryan et al. (2010) verificaram que o resveratrol não influenciou a peroxidação lipídica em músculo de ratos jovens, após contrações isométricas do gastrocnêmio. Entretanto, impediu o aumento da oxidação dos lipídios, após contrações isométricas, em ratos com idade avançada.

O malondialdeído (MDA) é um dos produtos da lipoperoxidação e é muito utilizado para quantificar a peroxidação lipídica. Existem vários métodos para sua detecção, entre eles o ácido tiobarbitúrico (TBA). O método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) não é específico para o MDA, pois outros aldeídos não relacionados à peroxidação participam da mesma reação de cor (VASCONCELOS et al., 2007). Em função disso, alguns autores têm encontrado pequena ou nenhuma variação detectável nos valores de MDA (ALESSIO et al., 2000; DIXON et al., 2006).

No presente estudo, a suplementação com resveratrol não influenciou a oxidação dos lipídios, pois a concentração de MDA permaneceu similar ao longo do estudo, para ambos os grupos. Evidenciando que o exercício intenso (grupo placebo) não foi capaz de aumentar a peroxidação lipídica e que o resveratrol não aumenta a proteção (grupo suplementado). Esta hipótese baseia-se nas adaptações promovidas pelo exercício, possivelmente as relacionadas com o aumento da capacidade antioxidante (NIESS; SIMON, 2007).

## 8 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a suplementação com 100mg/dia de resveratrol encapsulado, não foi capaz de proteger a lesão tecidual e reduzir a peroxidação lipídica. Porém, influenciou a redução da carbonilação das proteínas, possivelmente, protegendo a função estrutural e catalítica das proteínas. Estes resultados, em conjunto, apontam para a ação antioxidante positiva do resveratrol, sem interferência sobre a adaptação promovida pelo exercício físico intenso.

O presente estudo é pioneiro na investigação da ação antioxidante do resveratrol em militares após treinamento físico intenso, tornando-se base de conhecimento para estudos futuros. Cabe ressaltar dois aspectos relevantes para a investigação do uso de suplementos com antioxidantes, o condicionamento físico dos participantes e a intensidade dos exercícios físicos a serem executados, pois ambos podem influenciar sobre as vias de sinalização celular, necessárias para a adaptação muscular.

## REFERÊNCIAS

- AKAIKE, T. Mechanisms of biological S-nitrosation and its measurement. *Free Radic Res.*, v. 33, n. 5, p. 461-9, 2000.
- ALESSIO, H. M.; HAGERMAN, A.E.; FULKERSON, B.K.; AMBROSE, J.; RICE, R.E.; WILEY, R.L. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc.* v. 32, n 9, p. 1576-81, 2000.
- ALESSIO, H.M. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* v. 25, n. 2, p. 218-24, 1993.
- ALMEIDA, L.; VAZ-DA-SILVA, M.; FALCÃO, A.; SOARES, E.; COSTA, R.; LOUREIRO, A.I.; LOPES, C.F.; ROCHA, J.F.; NUNES, T.; WRIGHT, L.; SILVA, P.S. Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol. Nutr. Food Res.* v. 53, p. S7–S15, 2009.
- ALVES, A.A.; PEREIRA DA SILVA, L.; MACEDO, D.V.; KUBOTA, L.T. Amperometric sensor for glutathione reductase activity determination in erythrocyte hemolysate. *Anal Biochem.* v. 323, n. 1, p. 33-8, 2003.
- ANEKONDA, T.S. Resveratrol - A boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev.* v. 52, n. 2, p. 316-26, 2006.
- ANTUNES, F.; DERICK, H.; CADENAS, E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med.* V. 33, n. 9, p. 1260-7, 2002.
- ARMSTRONG, L.E.; VANHEEST, J.L. The unknown mechanism of the overtraining syndrome: clues from depression and psychoneuroimmunology. *Sports Med.* V. 32, n. 3, p. 185-209, 2002.
- BARBER, A.D.; HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. *Amer. Pharm.* V. 34, n. 9, p. 26-35, 1994.
- BARCLAY, J.K.; HANSEL, M. Free radicals may contribute to oxidative muscle fatigue. *Can J Physiol Pharmacol.* V. 69, p. 279-284, 1990.
- BARJA, G.; Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* V. 31, n. 4, p. 347-66, 1999.
- BEAL, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med.* V. 32, n. 9, p. 797-803, 2002.
- BENZIE, I.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nut.* V. 47, p. 233-61, 1996.
- BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* V. 15, n. 33, p. 20313-6, 1997.

- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr Campinas*. V. 12 n. 2, p. 123-30, 1999.
- BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A.H.; MCKENZIE, M.J. Oxidative stress response to aerobic exercise: comparison of antioxidant supplements. *Med Sci Sports Exerc*. V. 38, n. 6, p. 1098-105, 2006.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. v. 134, n. 3, p. 707-16, 1973.
- BOWTELL, J.L.; SUMNERS, D.P.; DYER, A.; FOX, P.; MILEVA, K.N. Montmorency cherry juice reduces muscle damage caused by intensive strength exercise. *Med. Sci Sports Exerc*. V. 43, n. 8, p. 1544-51, 2011.
- BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, N.; LIMONGELLI, F.M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *British Medical Bulletin*. V. 81 and 82, p. 209–230, 2007.
- BROTTO, M.A.P.; NOSEK, T.M. Hydrogen peroxide disrupts  $Ca^{+2}$  released from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibres. *J Applied Physiol*. V. 81, p. 731-737, 1996.
- BROWN, S.J.; CHILD, S.H.; DONNELLY, A.E. Exercise-induced skeletal muscle damage and adaptations following repeated bouts of eccentric muscle contractions. *J Sports Sci*. v. 15, p. 215-222, 1997.
- BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. v. 300, n. 2, p. 535-43, 1993.
- CASTELLI, W.P. *Lipids, risk factors and ischaemic heart disease*. *Atherosclerosis*. v. 124, p. S1-9, 1996.
- CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. v. 49, n. 3, p. 481-93, 1993.
- CLARKSON, P.M.E.; NEWHAM, D.J. Association between muscle soreness, damage, and fatigue. *Adv Exp Med Biol*. V. 384, p. 457-469, 1995.
- CLARKSON, P.M.; HUBAL, M.J. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil*. V. 95, n. 6, p. 2485-94, 2003.
- CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *American Journal of Clinical Nutrition*. V. 72, p. 637-46, 2000.
- COLLINSON, P.O.; CHANDLER, H.A.; STUBBS, P.J.; MOSELEY, D.S.; LEWIS, D.; SIMMONS, M.D. Measurement of serum troponin T, creatine kinase MB isoenzyme, and total creatine kinase following arduous physical training. *Ann Clin Biochem*. V. 32, n. 5, p. 450-3, 1995.



COTTART, C.H.; NIVET-ANTOINE, V.; LAGUILLIER-MORIZOT, C.; BEAUDEUX, J.L. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol Nutr Food Res*. V. 54, n. 1, p. 7-16, 2010.

DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*. V. 9, p. 169-76, 2003.

DAS, K.C.; LEWIS-MOLOCK, Y.; WHITE, C.W. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. V. 17, p. 713-26, 1997.

DAVIES, K.J.A.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G.A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*. V. 107, p. 1198-205, 1982.

DIXON, C.B.; ROBERTSON, R.J.; GOSS, F.L.; TIMMER, J.M.; NAGLE, E.F.; EVANS, R.W. The effect of acute resistance exercise on serum malondialdehyde in resistance-trained and untrained collegiate men. *J Strength Cond Res*. V. 20, n. 3, p. 693-8, 2006.

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G.M.; MCGARVEY, D.J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D.M.; TRUSCOTT, T.G.; YOUNG, A.J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys*. V. 430, n. 1, p. 37-48, 2004.

FALLON, K.E.; SIVYER, G.; SIVYER, K.; DARE, A. The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. *Br J Sports Med*. V. 33, p. 264-69, 1999.

FEHRENBACH, E.; NORTHOFF, H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev*. v. 7, p. 66-89, 2001.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress - Relationship with exercise and training. *Sports med*. V. 36, n. 4, p. 327-58, 2006.

FISCHER, A.B. Intracellular production of oxygen-derived free radicals. *Proceedings of a Brook Lodge Symposium*. P. 27-29, 1987.

FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World*. V. 45, p. 208-13, 2000.

FRANKIEWICZ-JOZKO, A.; FAFF, J.; SIERADZAN-GABELSKA, B. Changes in concentration of tissue free; radical marker and serum creatine kinase during post-exercise period in rats. *Eur J Applied Physiol*. V. 74, p. 470-474, 1996.

FREDERIKS, W.M.; BOSCH, K.S. The role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion damage of rat liver. *Histol Histopathol*. V. 10, p. 111-6, 1995.

- FREI, B.; STOCKER, R.; AMES, B.N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 85, n. 24, p. 9748-52, 1988.
- FREMONT, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*. v. 66, p. 663-73, 2000.
- GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med*. V. 7, n. 1, p. 65-86, 1989.
- GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. V. 29, n. 11, p. 1106-14, 2000.
- GOLDBERG, D. M.; YAN, J.; SOLEAS, G. J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin. Biochem*. v. 36, p. 79-87, 2003.
- GOLDFARB, A.H. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*. V. 25, p. 232-6, 1993.
- GOLDFARB, A.H. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Applied Physiol*. V. 24, p. 249-266, 1999.
- GU, X.; CHU, Q.; O'DWYER, M.; ZEECE, M. Analysis of resveratrol in wine by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr*. V. 881, p. 471-481, 2000.
- HALLIWELL, B.; GUTTENDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>o</sup> Ed. New York. Oxford, 1999.
- HOLLEY, A.E.; WALKER, M.K.; CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. Measurement of n-alkanals and hydroxyalkenals in biological samples. *Free Radic Biol Med*. V. 15, n. 3, p. 281-9, 1993.
- HORTOBAGYI, T.; DENHAN, T. Variability in creatine kinase: methodological, exercise and clinically related factors. *Int J Sports Med*. v. 10, p. 69-80, 1989.
- HSIEH, R.J.; KINSELLA, J.E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. *Adv Food Nutr Res*. V. 33, p. 233-41, 1989.
- JACKSON, M.J. Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function? *Free Radic Biol Med*. V. 44, p. 132-141, 2008.
- JACKSON, A.S.; POLLOCK, M. L. Generalized equations for predicting body density of men. *British Journal of Nutrition*. V. 40, p. 497-504, 1978.
- JENKINS, R.R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med Sci Sport Exerc*. V. 25, n. 2, p. 210-2, 1993.

JENKINS, R.R. Free radical chemistry relationship to exercise. *Sports Med.* V. 5, p. 156-70, 1988.

JI, L.L.; FU, R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol.* V. 72, p. 549-54, 1992.

KANTER, M. Free radicals and exercise: effects of nutritional antioxidant supplementation. *Exerc Sport Sci Rev.* v. 23, p. 375–397, 1995.

KANTER, M.M.; NOLTE, L.A.; HOLLOSZY, J.O. Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J Appl Physiol.* V. 74, p. 965-9, 1993.

KIM, A.L.; ZHU, Y.; ZHU, H.; HAN, L.; KOPELOVICH, L, BICKERS DR. Resveratrol inhibit proliferation of human epidermoid carcinoma A431 cells by modulating MEK1 and AP-1 signalling pathways. *Exp Dermatol.* V. 15, p. 538-46, 2006.

KIRIMLIOGLU, V.; KARAKAYALI, H.; TURKOGLU, S.; HABERAL, M. Effect of resveratrol on oxidative stress enzymes in rats subjected to 70% partial hepatectomy. *Transplant Proc.* V. 40, n. 1, p. 293-6, 2008.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* V. 186, p. 464-78, 1990.

LEVINE, R.L.; STADTMAN, E.R. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol.* V. 36, n. 9, p.1495-502, 2001.

LEVINE, R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* V. 32, n. 9, p. 790-6, 2002.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cien Farm.* V. 37, n. 3, p. 293-03, 2001.

LOSCHEN, G.; AZZI, A.; RICHTER, C.; FLOHE, L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* v.15, n. 42, p. 68–72, 1974.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

MARGARITIS, I.; ROUSSEAU, A.S. Does physical exercise modify antioxidant requirements? *Nutr Res Rev.* v. 21, n. 1, p. 3-12, 2008.

MARGONIS, K.; FATOUROS, I.G.; JAMURTAS, A.Z.; NIKOLAIDIS, M.G.; DOUROUDOS, I.; CHATZINIKOLAOU, A.; MITRAKOU, A.; MASTORAKOS, G.; PAPASSOTIRIOU, I.; TAXILDARIS, K.; KOURETAS, D. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radic Biol Med.* v. 15, n.43, p.901-10, 2007.

MCCALL, M.R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med.* v. 26, p. 1034-53, 1999.

MCGINLEY, C.; SHAFAT, A.; DONNELLY, A.E. Does Antioxidant Vitamin Supplementation Protect against Muscle Damage? *Sports Med.* v. 39, n. 12, p. 1011-32, 2009.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. *Laboratório para o clínico.* 8. ed. São Paulo. Atheneu, 1999.

MOORE, K.; ROBERTS, L.J. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* v. 28, n. 6, p. 659-71, 1998.

MORILLAS-RUIZ, J.M.; VILLEGAS GARCÍA, J.A.; LÓPEZ, F.J.; VIDAL-GUEVARA, M.L.; ZAFRILLA, P. Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress. *Clinical Nutrition.* V. 25, p. 444–453, 2006.

MULLER, F.L.; LIU, Y.; VAN REMMEN, H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* v. 19, n. 47, p.49064-73, 2004.

NIESS, A.M.; SIMON, P. Response and adaptation of skeletal muscle to exercise--the role of reactive oxygen species. *Front Biosci.* v. 12, p. 4826-38, 2007.

PAL YU, B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* v. 74, p.139-62, 1994.

PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Resveratrol may protect plasma protein from oxidation under conditions of oxidative stress in vitro. *J Braz Soc.* v. 21, n. 5, p. 909-13, 2010.

PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Anti-oxidative action of resveratrol: implications for human health. *Arabian Journal of Chemistry.* v. 4, p. 293-98, 2011.

PETERNELJ, T.T.; COOMBES, J.S. Antioxidant Supplementation during Exercise Training: Beneficial or Detrimental? *Sports Med.* v. 21. [Epub ahead of print].

PETERSEN, D.R.; DOORN, J.A. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med.* v. 37, n. 7, p. 937-45, 2004.

PINTO, M.C.; GARCIA-BARRADO, J.A.; MACIAS, P. Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase. *J Agric Food Chem.* v. 47, p. 4842-46, 1999.

PORTARIA nº 101-DECEX, DE 29 DE SETEMBRO DE 2009 - Altera as Instruções reguladoras para a Inscrição, Seleção e Matrícula nos Cursos e Estágios Gerais do Centro de Instrução Pára-quedista General Penha Brasil (IRISM/ CIPqdt GPB IR 60-17).

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

POWERS, S.K.; LENNON, S.L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* v. 58, p. 1025-33, 2000.

POWERS, S.K.; TALBERT, E.E.; ADHIHETTY, P.J. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol.* v. 589, n. 9, p. 2129-38, 2011.

RIMBACH, G.; HÖHLER, D.; FISCHER, A.; ROY, S.; VIRGILI, F.; PALLAUF, J.; PACKER, L. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr.* V. 52, n. 3, p. 203-22, 1999.

RODRIGUES, A.V.S.; MARTINEZ, E.C.; ALVES, L.A.; PITALUGA FILHO, M.V.; PINTO, F.G.F.; CARVALHO LIMA, E.S.; NEVES, A.L.S.; BORGES-SANTOS, M.D.; BURINI, R.C. Muscular stress in soldiers of the brazilian army supplemented with cho and bcaa during operations. *Med Sci Sports and Exerc.* v. 39, p. s205, 2007.

RODRIGUES, A.V.S.; NERY, C.R.B.; MARTINEZ, E.C. Alterações da composição corporal e de parâmetros bioquímicos em militares após 76 horas de operações continuadas. In: *SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS DO ESPORTE, 27.* 2004, São Paulo. *Revista Brasileira de Ciências do Esporte.* São Caetano do Sul : CELAFISCS, 2004.

RYAN, M.J.; JACKSON, J.R.; HAO, Y.; WILLIAMSON, C.L.; DABKOWSKI, E.R.; HOLLANDER, J.M.; ALWAYS, S.E. Supression of oxidative stress by resveratrol after isometric contractions in gastrocnemius muscle of aged mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* v. 65, n 8, p. 815-31, 2010.

SACHDEV, S.; DAVIES, K.J.A. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology & medicine.* V. 44, p. 215-23, 2008.

SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat. Res.* v. 658, p. 68-94, 2008.

SAUTTER, C.K.; DENARDIN, A.O.A.; MALLMANN, C.A.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Nutrition.* v. 23, p. 2073S-2085S, 2009.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte.* v. 10, n. 4, p. 308-13, 2004.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* v. 32, n. 3-4, p. 307-26, 2000.

SHAFAT, A.; BUTLER, P.; JENSEN, R.L. Effects of dietary supplementation with vitamins C and E on muscle function during and after eccentric contractions in humans. *Eur J Appl Physiol.* v. 93, n. 1-2, p. 196-202, 2004.

SHAKIBAEI, M.; HARIKUMAR, K.B.; AGGARWAL, B.B. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res.* v. 53, n. 1, p. 115-28, 2009.

SHEN, M.; JIA, G.L.; WANG, Y.M.; MA, H. Cardioprotective effect of resveratrol in pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion induced injury in rats. *Vascul Pharmacol.* v. 45, n. 2, p. 122-6, 2006.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl.* v. 25, p. 1058-71, 1986.

SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; MATHIAS, C.J.; PANEK, A.D.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; RENNÓ, M.N.; FALCÃO, D.Q.; CERQUEIRA, D.M.; MINTO, A.B.; NOGUEIRA, F.L.; QUARESMA, C.H.; SILVA, J.F.; MENEZES, F.S.; Eleutherio, E.C. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacol Res.* v. 52, n. 3, p. 229-33, 2005.

SORICHTER, S.; PUSCHENDORF, B.; MAIR, J. Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. *Exerc Immunol Rev.* v. 5, p. 5-21, 1999.

SPITELLER, P.; SPITELLER, G. Strong dependence of the lipid peroxidation product spectrum whether Fe<sup>2+</sup>/O<sub>2</sub> or Fe<sup>3+</sup>/O<sub>2</sub> is used as oxidant. *Biochim Biophys Acta.* v. 20, p. 23-40, 1998.

STEELS, E.L.; LEARMONTH, R.P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology.* v. 140, p. 569-576, 1994.

ST-PIERRE, J.; BUCKINGHAM, J.A.; ROEBUCK, S.J.; BRAND, M.D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* v. 277, p. 44784-90, 2002.

STUPKA, M.; TARNOPOLSKY, M.A.; YARDLEY, N.J.; PHILLIPS, S.M. Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. *J Appl Physiol.* v. 91, p. 1669-78, 2001.

SUBUDHI, A.W.; DAVIS, S.L.; KIPP, R.W.; ASKEW, E.W. Antioxidant status and oxidative stress in elite alpine ski racers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* v. 11, p. 32-41, 2001.

THÉRON, P.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; DAVIT-SPRAUL, A.; CONTI, M.; LEGRAND, A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* v. 3, n. 5, p. 373-84, 2000.

THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*. v. 16, n. 7-8, p. 716-8, 2000.

TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*. v. 28, p. 171-99, 2004.

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

VACA, C.E.; WILHEM, J.; HARMS-RINGDA, H.L. M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. *A review. Mut. Res.* v. 195, p.137-149, 1988.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*. v. 30, v. 5, p. 1323-1338, 2007.

WALLE, T.; HSIEH, V.; DELEGGE, V.; OATIS, J.E. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.* v. 32, p. 1377-1382, 2004.

WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic, report of a WHO consultation. Geneva: *World Health Organization 2000*. (WHO Technical Report Series 894).

WILLIAMS, L.D.; BURDOCK, G.A.; EDWARDS, J.A.; BECK, M.; BAUSCH, J. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food Chem Toxicol.* v. 47, n. 9, p. 2170-82, 2009.

YANG, Y.B.; PIAO, Y.J. Effects of resveratrol on secondary damages after acute spinal cord injury in rats. *Acta Pharmacol Sin.* V. 24, n. 7, p. 703-10, 2003.

YOSHINO, K.; MATSUURA, T.; SANO, M.; SAITO, S.; TOMITA, I. Fluorometric liquid chromatographic determination of aliphatic aldehydes arising from lipid peroxides. *Chem Pharm Bull.* v. 34, n. 4, p. 1694-700, 1986.

ZABTOCKA, A.; JANUSZ, M. The two faces of reactive oxygen species. *Postepy High Med Dosw.* v. 62, p. 118-24, 2008.

ZWART, L.L.; MEERMAN, J.H.; COMMANDEUR, J.N.; VERMEULEN, N.P. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad. Biol. Med.* v. 26, p. 202-226, 1999.