Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Suplementação de açaí em ciclistas: efeitos sobre marcadores inflamatórios, oxidativos e capacidade aeróbia

Sara Ivone Barros Morhy Terrazas Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.
Área de concentração: Ciências Nutricionais.
Orientadora: Profa. Dra. Ellen Cristini de Freitas.

Araraquara
2018

Suplementação de açaí em ciclistas: efeitos sobre marcadores inflamatórios, oxidativos e capacidade aeróbia

Sara Ivone Barros Morhy Terrazas Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.
Área de concentração: Ciências Nutricionais.
Orientadora: Profa. Dra. Ellen Cristini de Freitas.

Araraquara

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S729s

Souza, Sara Ivone Barros Morhy Terrazas.
Suplementação de açaí em ciclistas: efeitos sobre marcadores inflamatórios, oxidativos e capacidade aeróbia / Sara Ivone Barros Terrazas Souza. -- Araraquara, 2018.
72 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração: Ciências Nutricionais.

Orientadora: Ellen Cristini de Freitas.

1. Açaí. 2. Antocianinas. 3. Antioxidante. 4. Exercício. 5. Capacidade aeróbia. I. Freitas, Ellen Cristini de, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: SUPLEMENTAÇÃO DE AÇAÍ EM CICLISTAS: EFEITOS SOBRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS, OXIDATIVOS E CAPACIDADE AERÓBIA

AUTORA: SARA IVONE BARROS MORHY TERRAZAS SOUZA
ORIENTADORA: ELLEN CRISTINI DE FREITAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área de conhecimento: Nutrição pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELLEN CRISTINI DE FREITAS
Escola de Educação Física e Esporte / Câmpus de Ribeirão Preto da USP

Prof. Dr. JOSÉ RODRIGO PAULI
Departamento de Ciência da Saúde / Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Ciências Aplicadas de Limeira / SP

Dra. FLÁVIA GIOLO DE CARVALHO
Escola de Educação Física e Esportes / Câmpus de Ribeirão Preto da USP

Prof. Dr. ENRICO FUINI PUGGINA
Escola de Educação Física e Esporte / Câmpus de Ribeirão Preto da USP

Prof. Dr. ERICK PRADO DE OLIVEIRA
Faculdade de Medicina / Universidade Federal de Urberlândia

Araraquara, 11 de dezembro de 2018

Agradecimentos Pessoais

Em primeiro lugar agradeço a Deus por proporcionar as condições necessárias para que este trabalho fosse executado com sucesso. Por me conceder sabedoria e iluminar meus passos a cada desafio, por inúmeras vezes resolver por mim os problemas que pareciam surgir de uma fonte inesgotável, e por dar-me paz de espírito e equilíbrio para prosseguir.

Agradeço aos meus pais (Werner e Letícia Terrazas) que incentivaram minha jornada acadêmica, doando do seu tempo e recursos para que eu tivesse sucesso em todos os meus projetos de vida. Agradeço também aos meus irmãos (Samyra e Werner Terrazas Filho) e cunhados (Sauro e Ane) por aliviarem meus fardos sempre que possível.

Agradeço em especial meu esposo Eder Souza, pela paciência, compreensão, ajuda com a execução da pesquisa e por cuidar tão bem dos nossos filhos durante minhas ausências.

Agradeço aos meus filhos (Ivan e Maya), que foram minha motivação para concluir o doutorado.

Agradeço aos meus amigos (Flávia, Priscila, Milena, Gabriela, Camila, Bryan e Tales) por não medirem esforços em meu auxílio, oferecendo um ombro amigo e ajuda técnica nos momentos mais delicados do processo de doutoramento, que é tão desafiador.

Agradeço também a família Giolo, pela amizade e acolhida em Ribeirão Preto, por terem me recebido e cuidado como um membro da família. Seu suporte foi essencial para o sucesso dessa empreitada.

Agradeço ainda aos amigos Matheus Ferreira e Gislaine Ortiz pela amizade e apoio durante esta jornada acadêmica.

Meus sinceros agradecimentos a todos!

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora, Professora Dra. Ellen Cristini de Freitas, que desde o mestrado acompanha meu trabalho, pela paciência, conselhos, por me conceder oportunidades de crescimento profissional e também pela amizade que desenvolvemos neste árduo processo.

A todos aos meus colegas de laboratório e voluntários da pesquisa que não mediram esforços em me auxiliar com a execução prática da pesquisa, em especial ao amigo Bryan pela execução dos testes físicos com os voluntários.

Ao amigo Matheus Ferreira pelo auxilio no processo de envase da polpa de açaí.

Meus sinceros agradecimentos ao professor Dr. Marcelo Papoti e seus alunos e ao professor Dr. Paulo Santiago, por concederem os equipamentos de simulação de treino para execução dos testes físicos com os voluntários desta pesquisa e pelo apoio durante a coleta de dados.

Agradeço também à professora Dra. Lusânia Antunes e ao Vinícius Venâncio pelo suporte na execução das análises do teste do cometa.

À colega Daniele Gonçalves pelo auxilio com as análises laboratoriais de interleucinas, bem com ao prof. Dr. Paulo Inácio por disponibilizar os equipamentos de laboratório para execução destas análises.

Agradeço à professora Dra. Maricely Uria Toro e seus alunos, ao Prof. Dr. Werner Terrazas, bem como à Universidade do estado do Pará – UEPA, pelo apoio na execução das análises químicas da polpa de açaí.

A professora Dra. Thais Borges César por disponibilizar sua estrutura de laboratório e reagentes para execução dos testes de TBARS e ABTS, e à Dra. Ana Lucia Martiniano Nasser, pelo auxílio com as análises.

A todos os professores de disciplinas e supervisores de estágio de docência que tive durante esta jornada acadêmica, pela transferência de conhecimento e por compartilharem experiências.

Ao professor Dr. Enrico Puggina, que tem acompanhado minha jornada acadêmica desde o mestrado, sempre concedendo sugestões pertinentes para a melhoria da qualidade do trabalho final.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Unesp e ao Programa de pós-graduação em alimentos e nutrição pela formação e graduação a mim concedidos. À Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto - USP, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP pela estrutura física e recursos disponibilizados para a execução da pesquisa, bem como a todos os funcionários das mencionadas instituições, que de alguma forma contribuíram para a qualidade desta pesquisa.

Em especial, agradeço às funcionárias da seção de pós-graduação da FCFAr - Unesp pelo zelo e paciência em sempre conceder informações pertinentes e por cuidarem de todo processo administrativo envolvido na formação dos alunos.

Por último, e não menos importante, gostaria de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001) pelo suporte financeiro para execução deste trabalho, bem como ao Grupo Petruz Fruity pela confiança em conceder a polpa de açaí pasteurizada para que esta pesquisa fosse realizada.

À todos os envolvidos na construção, no desenvolvimento e finalização desse trabalho, que possamos colher bons frutos!

Epígrafe

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável, para aprender a conhecer a influência libertadora do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer."

Albert Einstein

Resumo

Objetivo: Investigar os efeitos da suplementação com polpa açaí sobre marcadores bioquímicos de estresse oxidativo, inflamação e de capacidade aeróbia, que podem influenciar o desempenho de atletas de resistência. **Métodos:** Foi realizado um estudo crossover randomizado, placebo controlado, com “wash-out” de 30 dias. Dez atletas ciclistas (Idade: 33,5±4,7 anos; IMC: 23,99±1,38kg/m^2; treino: 200km/semana) receberam suplementação com 400g/dia de polpa de açaí pasteurizada (AÇ) ou 400g/dia de placebo (PL) durante 15 dias. Antes e após cada período de suplementação foram avaliados peroxidação lipidica (MDA), capacidade antioxidante do soro, danos no DNA em sangue periférico (teste do cometa), IL-6 e TNF-α e registro alimentar, além de ser realizado teste incremental em clicoergometro, a fim de avaliar modificações no desempenho fisico e capacidade aerobia. A rotina de treino diária foi registrada durante as fases de intervenção. Os dados obtidos foram analisados utilizando modelo de regressão linear com efeitos mistos ($p \leq 0,05$). **Resultados:** Após a suplementação AÇ houve aumento da capacidade antioxidante do soro ($p=0.006$) e redução da peroxidação lipídica ($p=0.01$). Não houve modificação dos marcadores inflamatórios. Mesmo sem aumento da carga máxima alcançada durante o teste incremental, após a intervenção com AÇ foi observado redução de 29% ($p=0,025$) sobre a concentração de lactato sanguíneo a 300 watts de potência em comparação ao teste inicial, e de 28% ($p=0,028$) comparado ao pós PL. Houve também aumento da ILan em resposta a suplementação com polpa de açaí (AÇ-Pré: 223,85±17,11W; AÇ-Pós: 244,29±12,61W; $p=0,006$; PL-Pré: 220,05±23,84W; PL-Pós: 230,71±13,93W; $p=0,133$). Não foi observado efeito protetor do AÇ sobre os danos oxidativos no DNA. **Conclusão:** A suplementação AÇ contribuiu para minimizar a peroxidação lipídica, mas não protegeu contra os danos oxidativos presentes no DNA. O AÇ também esteve relacionado a menores elevações na concentração de lactato sanguíneo durante o teste incremental e ao aumento da ILan, sinalizando melhoria da capacidade aeróbia dos atletas ciclistas, e sustentando a hipótese de que suplementação com pequenas doses de múltiplos antioxidantes contidos no AÇ, pode favorecer respostas adaptativas ao treinamento em atletas de resistência.

Palavras-chave: Açaí; Antocianinas; Antioxidante; Exercício; Capacidade aeróbia.

Abstract

Objective: To investigate the effects of açaí pulp supplementation on oxidative stress, inflammation and aerobic capacity markers, which may influence the performance of endurance athletes. **Methods:** A 30-day randomized, placebo-controlled and cross-over design was performed. Ten cyclist athletes (Age: 33.5 ± 4.7y, BMI: 23.99 ± 1.38kg/m^2, training: 200 km / week) were supplemented with 400g/day of pasteurized açaí pulp (AÇ) or 400g/day of placebo (PL) for 15 days. Lipid peroxidation (MDA), serum antioxidant capacity, DNA damage in peripheral blood (comet assay), IL-6 and TNFα and food register, were evaluated before and after each supplementation period. In addition, an incremental test on cycle-ergometer was done, in order to evaluate changes on physical performance and aerobic capacity. The daily training routine was recorded during the intervention trials. Data were analyzed using a linear regression model with mixed effects ($p \leq 0.05$). **Results:** After supplementation, serum antioxidant capacity ($p=0.006$) and reduction of lipid peroxidation ($p=0.01$) were observed. There was no change in inflammatory markers. Even without increasing of the maximum load reached during the incremental test, a reduction of 29% ($p=0.025$) on the blood lactate concentration at 300 watts compared to the initial test, and 28% ($p=0.028$) in relation to post-PL. Also, there was an increase on intensity of anaerobic threshold in response to supplementation with AÇ (Pre-AÇ: 223.85 ± 17.11W; Post-AÇ: 244.29 ± 12.61W; $p=0.006$; Pre-PL: 220.05 ± 23.84W; Post-PL: 230.71 ± 13.93W; $p=0.133$). No protective effect of AÇ on oxidative DNA damage was observed. **Conclusion:** AÇ supplementation contributed to minimize lipid peroxidation but did not protect against oxidative damage in DNA. AÇ was also related to lower increases in blood lactate concentration during incremental test and to the increase on intensity of anaerobic threshold, signaling improvement of the aerobic capacity in cyclist athletes, and supporting the hypothesis of that supplementation with small doses of multiple antioxidants contained in the AÇ can favor adaptative responses to training in endurance athletes.

Key-words: Açai; Anthocyanins; Antioxidant; Exercise; Aerobic capacity.

SUMÁRIO

Resumo ix
Abstract x
Introdução 12
Objetivos 26

Capítulo 1 27
Consumo de polpa açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) por ciclistas modula marcadores oxidativos e de capacidade aeróbia: um estudo placebo controlado 27
Resumo 28
Introdução 29
Metodologia 31
Participantes 31
Tamanho amostral 31
Delineamento experimental 32
Avaliação alimentar 33
Suplementação 33
Dosagem de fenólicos totais da polpa de açaí 34
Dados fornecidos pelo fabricante. 35
Dosagem de antocianinas totais da polpa de açaí 35
Capacidade antioxidante da polpa de açaí - CUPRAC 36
Coleta de sangue venoso 36
Peroxidação lipídica no soro (ensaio TBARS) 36
Capacidade antioxidante no soro (ensaio ABTS) 37
Danos oxidativos no DNA (teste do Cometa) 37
Marcadores inflamatórios 38
Monitoramento da rotina de treino 38
Avaliação da capacidade aeróbia 39
Análises estatísticas 40
Resultados 40
Discussão 42
Conclusão 46
Referências 47
Tabelas e Figuras 55
Considerações Finais 59
Referências 60
Apêndice 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 66
Apêndice 2. Registro Alimentar 70
Apêndice 3. Diário de Treino 71
Anexo 1. Tabela de Foster 72

Introdução

Açaí: características botânicas, classificações da polpa, valor de mercado e alegações de saúde

O gênero *Euterpe* possui 28 espécies localizadas nas Américas Central e do Sul e distribuídas por toda a bacia amazônica. As três espécies que ocorrem com maior frequência são *E. oleracea*, *E. precatoria* e *Euterpe edulis*. No entanto, apenas as duas primeiras têm seus frutos comercialmente utilizados (1).

E. precatoria é nativa do estado do Amazonas, popularmente conhecida como “açaí-do-Amazonas” ou “Juçara”, é encontrado na Bacia do Rio Amazonas, em uma área de terras altas e planícies, comumente encontrada no sul do equador e especialmente na Amazônia ocidental (2). *E. oleracea*, popularmente conhecida como “açaí-do-Pará”, é encontrada principalmente em terras baixas e em terras alagáveis do estuário do rio Amazonas, nos estados brasileiros do Pará, Maranhão, Tocantins, Amapá e também na Guiana e na Venezuela. (2,3).

As espécies também diferem morfologicamente. A palmeira de *E. precatoria* tem uma altura média de 20 m e possui caule único. Os frutos são globosos, medindo de 0,9 a 1,3 cm de diâmetro, de coloração verde quando imaturos, vermelhos no estágio intermediário e roxo escuro quando maduros. *E. oleracea* é uma palmeira multicaule, com até 25 hastes por touceira. Em sua forma adulta, os troncos medem entre 3 e 20 m e um

diâmetro de 7 a 18 cm. Em seu estado maduro, os frutos apresentam coloração roxa escura e diâmetro em torno de 13,5 mm (4). Na colheita, é possível diferenciar as espécies através das características botânicas da palmeira e também pelo tamanho da fruta, mas quando a polpa está preparada para o consumo, não é possível saber qual tipo de açaí está sendo consumido (1) (Figura 1).

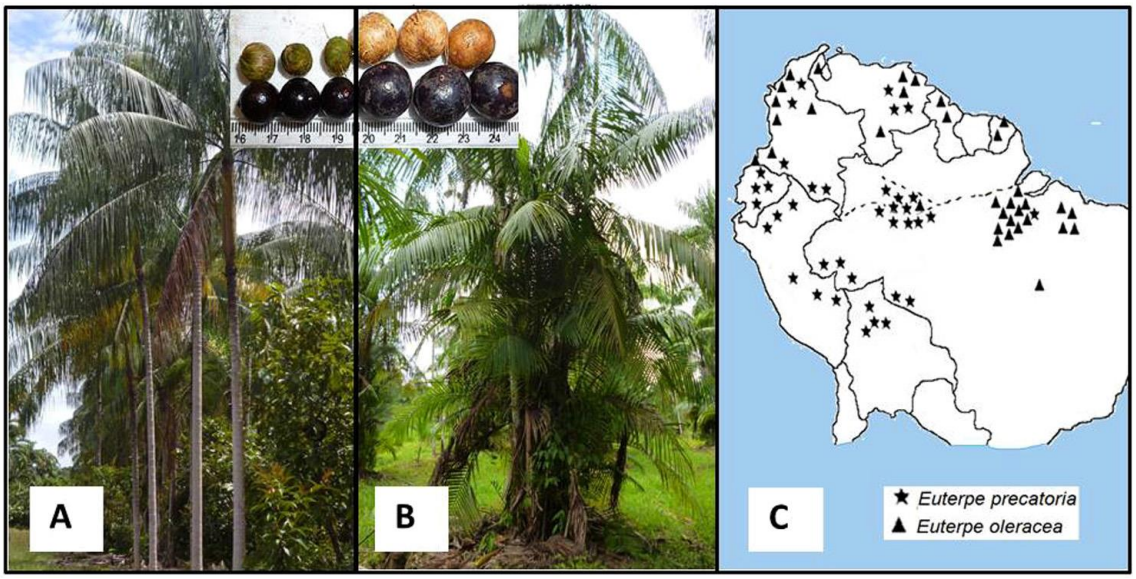

Figura 1. Sementes e palmeiras de (A) E. precatoria e (B) E. oleracea e (C) distribuição botânica das duas espécies (1).

Ainda com relação ao fruto no estado maduro, em ambas as espécies o epicarpo é uma camada muito fina e o mesocarpo tem por volta de 1–2 mm de espessura, sendo que a semente representa a maior parte do volume da fruta, cerca de 80-95% (5,6) (Figura 2).

Polpa de açaí é o produto extraído da parte comestível do fruto do açaizeiro após amolecimento através de processos tecnológicos adequados

(7). O despolpamento do fruto é realizado em despolpadores verticais específicos para a extração do açaí. Possuem forma cilíndrica, são dotados de peneira na parte inferior e podem ser de vários tamanhos. Nesse processo, o despolpamento se dá em decorrência do atrito entre os frutos, as paredes e as pás do despolpador, em velocidade constante e com adição de água, cuja quantidade depende do tipo de açaí que se deseja obter (8).

Figura 2. Corte transversal dos frutos de *Euterpe* no estado maduro, com vistas das camadas de epicarpo, mesocarpo, endocarpo e da semente (adaptado).

Segundo as normas do ministério da agricultura, o açaí está classificado de acordo com a adição de água durante o processo de despolpamento, em tipo A, B e C. O tipo A é o açaí grosso ou especial em que a polpa foi extraída com adição de água e filtração, apresentando acima de 14% de sólidos totais e uma aparência muito densa. O Tipo B é o açaí médio ou regular, em que a polpa foi extraída com adição de água e

filtração, apresentando acima de 11 a 14% de sólidos totais e uma aparência densa. E o tipo C é o açaí fino ou popular, em que a polpa é extraída com adição de água e filtração, apresentando de 8 a 11% de sólidos totais e uma aparência pouco densa (7). Para o presente estudo foi utilizado o açaí tipo A.

Segundo o IBGE, o Brasil produziu em 2011 um total de 215,4 mil toneladas de Açaí. O estado do Pará foi o principal contribuinte, com 50,8% da produção nacional. O estado do Amazonas vem em seguida, respondendo por 41,5% do total do Brasil (9). Quando combinada com a produção de todos os estados produtores brasileiros, a produção de açaí em 2011 foi de aproximadamente 215,3 mil toneladas, e o preço por tonelada de açaí era de cerca de US$ 3,22 milhões, superando assim o preço por tonelada de soja com valor de mercado de US$ 2,20 milhões, e também de outros produtos alimentícios exportados, como por exemplo, a castanha-do-brasil com valor de mercado de US$ 2,41 milhões por tonelada (10).

A produção agrícola nacional de açaí em 2017 foi de 1,33 milhão de toneladas, sendo o Pará o maior estado produtor com 98,3 % do total nacional. O valor da produção foi avaliado em R$ 5,54 bilhões (11).

Várias empresas de manufatura têm comercializado agressivamente produtos de açaí em formulações como comprimidos, sucos, bebidas energéticas entre outros, principalmente nos Estados Unidos, Europa e Japão (12). Este amplo crescimento global do consumo de açaí tem sido impulsionado pela veiculação de alegações das suas muitas propriedades essenciais importantes na nutrição humana. É fonte de energia, fibras,

antocianinas, minerais e ácidos graxos monoinsaturados (MUFA). Por essa razão, é considerado um alimento funcional, auxiliando na prevenção de diversas doenças degenerativas (13-15).

Os principais constituintes encontrados na matéria seca são lipídios (50%), fibras (25%) e proteínas (10%). A quantidade de carboidratos (glicose, frutose e sacarose) é relativamente baixa, entre 2,96% e 3,55% (1). Com relação à sua atividade farmacológica, vários estudos *in vitro* e *in vivo* tem relacionado ao açaí efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, cardioprotetores, hipocolesterolêmicos, antigenotóxico e anticâncer (1,12).

Antocianinas: características químicas e biodisponibilidade

As antocianinas são pigmentos pertencentes à classe dos flavonoides, responsáveis por uma ampla variedade de cores em frutas e vegetais, que vão do vermelho-alaranjado, ao vermelho vivo, roxo e azul. Na natureza, encontram-se associadas a moléculas de açúcar que são derivadas de estruturas agliconas denominadas antocianidinas (16).

A estrutura básica das antocianinas é o cátion favílico (cátion 2-fenilbenzopirílio). Os diferentes tipos de antocianinas diferem entrei si apenas nos grupamentos ligados aos anéis nas posições 3' (R1), 4' (R2), 5' (R3), 3 (R4), 5 (R5), 6 (R6) e 7 (R7), que podem ser átomos de hidrogênio, hidroxilas ou metoxilos (16) (Figura 3).

As antocianinas presentes no açaí representam cerca de 90% da capacidade antioxidante do fruto, sendo a cianidina 3-O-glicosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo as antocianinas predominantes (17,18) (Figura 4).

De acordo com a farmacocinética relatada por Martens-Talcott, et al. (19), o tempo de concentração máxima das antocianinas da polpa de açaí no plasma é de 2,2 horas e meia vida de 6,56 horas.

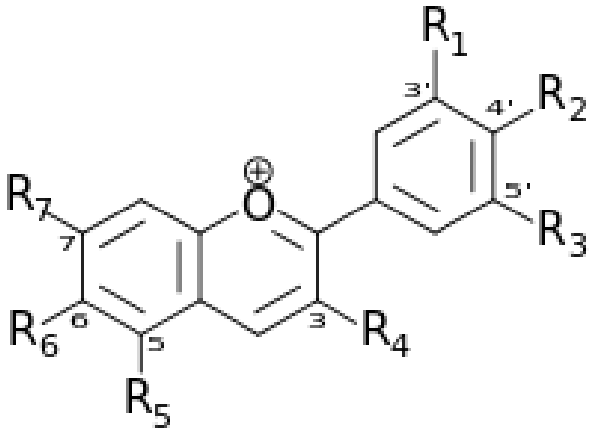

Figura 3. Estrutura básica das antocianinas (cátion 2-fenilbenzopirílio).

A estabilidade química das antocianinas possui grande importância, considerando seus benefícios para a saúde e ainda seu eventual utilização como corante natural. Sua estabilidade pode ser afetada por fatores como pH, temperatura, concentração, luz, solventes, presença de oxigênio, enzimas, outros flavonóides, proteínas e metais (20).

Estudos chegaram a demostrar uma absorção limitada (cerca de 1%) das antocianinas, associada às suas propriedades altamente polares, à glicosilação e à presença de múltiplos grupos hidroxila como parte de sua estrutura (21-23). Além disso, foi sugerido que as antocianinas poderiam ser degradadas no ambiente de alto pH do duodeno (23). Contudo, pesquisadores indicaram que os estudos existentes parecem ter subestimado a quantidade de antocianinas absorvida, considerando estudos

recentes de farmacocinética usando antocianinas marcadas com ^{13}C, que destacaram taxas de biodisponibilidade mais altas do que o esperado e maior tempo de permanência de metabólitos relacionados às antocianinas, em específico às cianidina-3-glucoside, no sistema circulatório (24,25).

A baixa absorção relatada pelos estudos anteriores parece estar relacionada à limitação dos métodos empregados na identificação e quantificação de antocianinas e seus metabólitos em fluidos biológicos, dentre eles a avaliação indireta do cátion flavílico, que é a forma de antocianina que predomina em pH <2. Como consequência, estruturas que não são capazes de regenerar este íon por reativação da amostra devido ao metabolismo in vivo e / ou modificações na estrutura química não serão detectadas (26). Outra questão é o potencial de degradação desses compostos durante a preparação da amostra (27) e também a ligação dos compostos e metabólitos à proteínas na corrente sanguínea (28).

Apesar de terem diferentes tamanhos moleculares e tipos de açúcar ou grupos acila ligados, as antocianinas também podem ser absorvidas intactas (20). Assim como os outros flavonoides, as antocianinas são metabolizadas originando glucurono-, sulfo- ou metil-derivados no trato gastrointestinal proximal. Mas curiosamente, pequenas quantidades de compostos não metabolizados também foram identificados na circulação sistêmica e na urina. Embora um mecanismo para a absorção de antocianinas glicosiladas ainda seja altamente especulativo (29), transportadores de estômago, transportadores intestinais de glicose e a permeabilidade da junção estreita têm sido citados como possíveis

mecanismos de transporte (30-32). No entanto, a grande maioria dos estudos em animais e dados de farmacocinética humana sugerem que o intestino é o principal local de absorção de antocianinas (25,29,32). Apesar da presença de glicosídeos de antocianinas e metabólitos conjugados de fase II na circulação, a maioria das antocianinas absorvidas está presente como produtos de menor peso molecular oriundos de degradação química e microbiana (24,25,33).

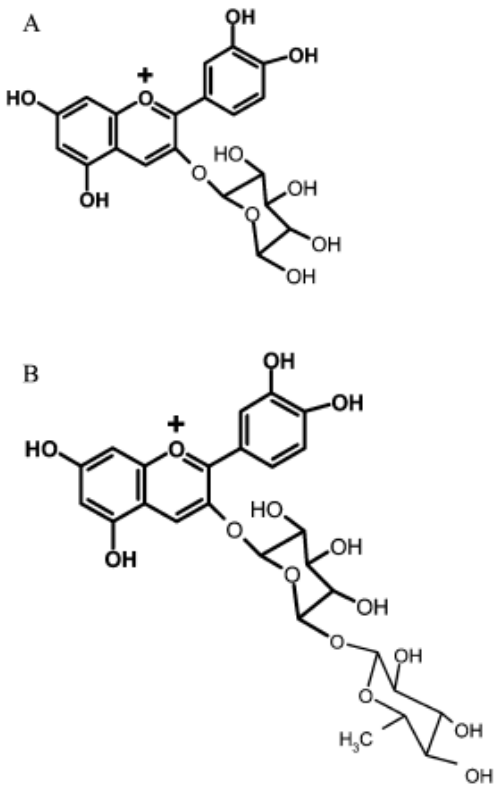

Figura 4. Estruturas químicas da cianidina-3-O-glicosídeo (A) e cianidina-3-O-rutinosídeo (B) (19).

Fosfolipídios e terpenos têm sido relatados como auxiliares no transporte transepitelial de antocianinas isoladas do açaí (34). Neste sentido, quando presentes em um sistema alimentar (abacate, chocolate e polpa de

açaí) os fosfolipídios podem promover o transporte de antocianinas através da barreira intestinal pela fusão com membranas lipídicas (35). No caso dos terpenos, podem agir no trato gastrointestinal por meio da criação de passagens temporárias nos epitélios gástricos através de interações com a membrana (34).

O destino biológico dos metabólitos de antocianinas, segundo a visão tradicional do metabolismo xenobiótico, sugere que a conjugação metabólica torna os sítios reativos inertes ou de polaridade aumentada, resultando em rápida eliminação. Entretanto, o impacto sobre a atividade biológica de tais mudanças estruturais marcantes sobre a massa e polaridade do flavonoide é difícil de prever. Recentemente foi levantada uma hipótese de que a bioatividade das antocianinas resulta dos altos e persistentes níveis de circulantes de metabólitos fenólicos de baixo peso molecular (36,37). Para testar essa hipótese, a bioatividade da cianidin-3-O-glicosídeo foi testada em relação a 21 de seus subprodutos catabólicos usando modelos celulares endoteliais vasculares, musculares lisos e monócitos. Os resultados indicaram que a antocianina original foi, na maioria dos casos, menos ativa do que seus catabólitos fenólicos. Em termos gerais, a evidência desta investigação sugere que a bioatividade das antocianinas *in vivo* resulta da exposição a uma variedade de catabólitos, modulando várias vias de inflamação e adesão celular (38).

Exercício e suplementação antioxidante

Nas modalidades de esportes de resistência, como corrida, ciclismo e triatlo, os atletas costumam realizar muitas horas por semana de treinamento em exercícios aeróbicos. Este tipo de treinamento depende do uso de oxigênio no músculo esquelético para fornecer energia durante essas atividades (39).

O ciclismo de estrada profissional é um esporte de extrema resistência. Em algumas fases deste esporte a intensidade do exercício chega a ser muito elevada, em que o ciclista profissional deve completar períodos prolongados de exercício, com subidas em montanhas altas e contra-relógio, a altas porcentagens (~ 90%) do consumo máximo de oxigênio (VO_2máx) e acima do limiar anaeróbio. Diversos estudos têm analisado as respostas fisiológicas de ciclistas de estrada de nível amador, porém evidências sugerem que suas descobertas podem não ser diretamente extrapoladas para o ciclismo profissional. Um exemplo disso ocorre ao comparar altas cargas de trabalho em que tanto o limiar ventilatório quanto o ponto de compensação respiratório ocorrem. Neste aspecto o ciclista profissional apresenta aproximadamente 65% e 90% do VO_2máx para essas variáveis respectivamente, enquanto que ciclistas amadores apresentam em torno de 60% e 80% do VO_2máx respectivamente, onde se observa uma marcada diferença entre esses valores, sugerindo que tais variáveis submáximas podem ser fatores

importantes de desempenho em eventos de resistência, como corridas profissionais (40).

Com relação à natureza oxidativa do treinamento de resistência, quando as cargas de treinamento são muito altas pode haver aumento exacerbado da produção de radicais livres, e neste caso, as defesas antioxidantes se fazem necessárias para proteger as células dos danos causados pelos radicais livres. Esse potencial para danificar as células é descrito como estresse oxidativo e pode resultar em uma resposta inflamatória do sistema imunológico e comprometer o desempenho do atleta. Além disso, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio também causa danos oxidativos ao DNA (39,41).

Neste sentido, existe uma quantidade substancial de evidências de que as cargas de treinamento de resistência de alta intensidade ou de duração prolongada estimulam o aumento da produção de radicais livres e o estresse oxidativo (42). Este efeito também foi demonstrado em atletas competindo em eventos de ultra-resistência, incluindo ultra-maratonas e triatlo *ironman*. Claramente, os atletas precisam equilibrar as cargas de treinamento para evitar um risco elevado de fadiga, doença ou lesão (43,44).

Embora o estresse oxidativo possa resultar em uma resposta inflamatória, também é possível que os radicais livres desempenhem um importante papel fisiológico nas adaptações de treinamento. Nos últimos anos tem havido um debate a respeito do consumo excessivo de

antioxidantes como agente redutor das respostas adaptativas relacionadas ao treinamento (45).

Existem várias opções de suplementos antioxidantes disponíveis para atletas que desejam aumentar sua ingestão de antioxidantes, tanto por meio de fontes alimentares como de antioxidantes isolados. Suplementos antioxidantes são cada vez mais promovidos na comunidade geral e esportiva, utilizando diversas alegações relacionadas à melhor disponibilidade de energia, rápida recuperação pós-exercício, melhor saúde cardiovascular e imunológica (39).

Vários suplementos antioxidantes baseados em alimentos tem se revelado promissores em melhorar os resultados durante o exercício, incluindo mirtilos, suco de cereja e açaí (46-48).

O consumo de mirtilos por indivíduos bem treinados durante seis semanas e antes do exercício prolongado (2,5 h de corrida) também foi demonstrado, e resultou em maior contagem de células NK pós-exercício e uma concentração aumentada de citocinas anti-inflamatórias em comparação com um grupo controle (46). Embora não associado ao exercício, é interessante considerar o efeito da suplementação com bebida contendo 25g de mirtilos selvagens liofilizados durante seis semanas em homens com fatores de risco cardiovascular, sobre a redução nos níveis de bases de DNA oxidadas endogenamente em comparação ao placebo (49).

Em atletas, a suplementação com suco de cereja por sete dias, antes e após o treino, melhorou substancialmente a recuperação pós-

exercício de força isométrica em comparação com o placebo (47). Ainda, a suplementação de atletas com bebidas formuladas à base de açaí mostrou melhora da capacidade antioxidante plasmática, perfil lipídico sérico (48), percepção de esforço e resposta cardiorrespiratória, além de atenuar o estresse metabólico induzido pelo exercício (50).

A suplementação com doses de antioxidantes isolados também foi avaliada. A quercetina é um dos poucos suplementos antioxidantes que foi examinado em vários estudos e demonstrou um benefício de desempenho consistente. Em um estudo de desempenho de corrida, em que indivíduos não treinados foram suplementados com 1000 mg dia de quercetina durante duas semanas, foi observado aumento na distancia percorrida em um teste de esteira de 12 minutos e aumento de DNA mitocondrial muscular comparado ao placebo (51). Em outro estudo, o consumo máximo de oxigênio e o tempo de fadiga aumentaram após sete dias de suplementação de quercetina em comparação ao placebo (52), novamente em indivíduos não treinados, por isso não está claro se esse benefício seria visto em atletas altamente treinados.

Um estudo conduzido com atletas suplementados por 14 dias com 20g de melatonina como antioxidante, apresentaram melhora do estado antioxidante geral acompanhada de redução dos danos oxidativos ao DNA (53) (Figura 5). No entanto ainda há dúvidas quanto ao benefício e até mesmo à segurança da suplementação com um antioxidante único em alta dose. Um exemplo disso é relatado por estudos com suplementação isolada de vitamina E na forma de α-tocoferol, que contraditoriamente aumentaram

marcadores de estresse oxidativo comparado com placebo, durante o Campeonato Mundial de Triatlo (54).

Diante do exposto, ainda há controvérsias a respeito dos efeitos da suplementação antioxidante em atletas, e até o momento ainda não está bem consolidado na literatura se os antioxidantes aumentam ou atenuam as respostas adaptativas ao treinamento e os possíveis mecanismos subjacentes a essa observação (55).

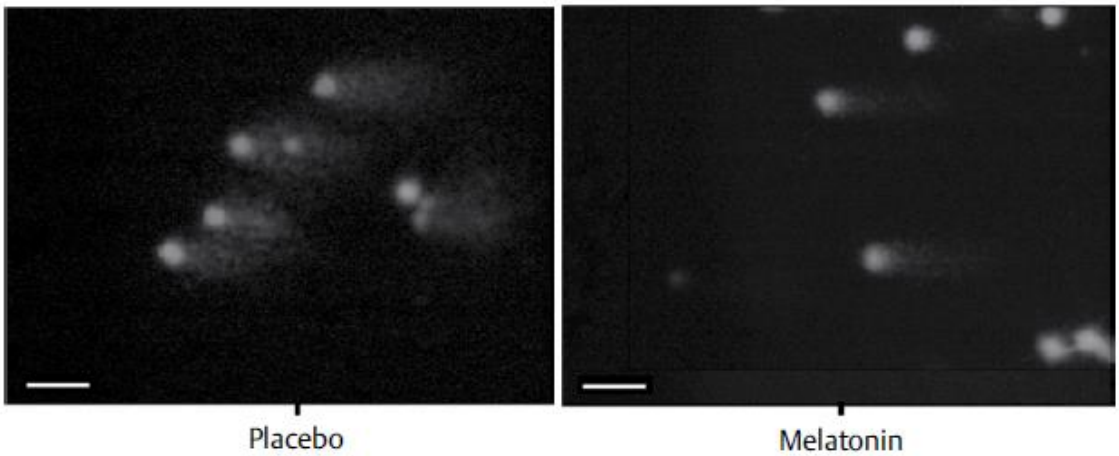

Figura 5. Quantificação do dano ao DNA expresso em porcentagem da intensidade da cauda medida no pós-exercício após a suplementação antioxidante com melatonina ou placebo (53).

Tendo em vista a natureza oxidativa do ciclismo de estrada, associada às elevadas demandas antioxidantes deste esporte de resistência, e considerando os efeitos positivos da suplementação antioxidante baseada em alimentos sobre variáveis que impactam no desempenho físico durante o exercício, é provável que as notáveis propriedades antioxidantes da polpa de açaí possam ser úteis em atenuar os

efeitos do estresse oxidativo decorrentes do exercício intenso, bem como minimizar processos inflamatórios e agir sobre variáveis de capacidade aeróbia, que afetam o desempenho de ciclistas.

Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da suplementação com polpa açaí sobre marcadores oxidativos, inflamatórios e de capacidade aeróbia que podem influenciar no desempenho físico de atletas ciclistas, por meio dos seguintes parâmetros:

- Quantificação da peroxidação lipídica (em termos de malondialdeído) e capacidade antioxidante do soro como indicadores de estresse oxidativo, antes e após os períodos de suplementação.
- Determinação do dano ao DNA expresso em porcentagem da intensidade da cauda (teste do cometa) a partir do sangue periférico, antes e após os períodos de suplementação.
- Quantificação de marcadores inflamatórios (IL-6 e TNF-α) antes e após os períodos de suplementação.
- Análise do desempenho físico através da avaliação da capacidade aeróbia dos ciclistas antes e após os períodos de suplementação.
- Avaliação quantitativa da ingestão alimentar dos ciclistas, antes e durante os períodos de suplementação.

Capítulo 1

Consumo de polpa açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) por ciclistas modula marcadores oxidativos e de capacidade aeróbia: um estudo placebo controlado

Sara Ivone Barros Morhy Terrazas Souza[1]
Bryan Steve Martinez Galan[1]
Flávia Giolo de Carvalho[2]
Lusânia Maria Greggi Antunes[3]
Vinícius Venâncio[3]
Marcelo Papoti[2]
Ellen Cristini de Freitas[1,2]

[1] Programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil.
[2] Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, EEFERP/USP, Brasil.
[3] Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, FCFRP/USP, Brasil.

Resumo

Introdução: A polpa de açaí é fonte de antocianinas e tem sido associada a efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antigenotóxicos. Estudos anteriores mostraram que a suplementação antioxidante baseada em alimentos ricos em polifenóis leva a um aumento do tempo até a exaustão e o VO_2max, modulando os níveis de lactato sanguíneo, melhorando também a função mitocondrial e a biogênese. No entanto, não está claro se a suplementação com polpa de açaí pode beneficiar atletas fisiologicamente adaptados ao treinamento físico. **Objetivo:** Verificar o efeito da suplementação com polpa de açaí, fonte de polifenóis antocianinas (284,46 mg/400g), sobre marcadores de estresse oxidativo, inflamação e capacidade aeróbia de atletas ciclistas. **Métodos:** Foi realizado um estudo crossover randomizado, placebo controlado, com "wash-out" de 30 dias. Dez atletas ciclistas amadores (Idade: 33,5±4,7 anos; IMC: 23,99±1,38 kg/m^2; treino: 200 km/semana) receberam suplementação com 400g/dia de polpa de açaí pasteurizada (AÇ) ou 400g/dia de placebo (PL) durante 15 dias. Antes e após cada período de suplementação foram avaliados peroxidação lipídica e capacidade antioxidante do soro, danos no DNA em sangue periférico (teste do cometa), IL-6 e TNF-α, além de ser realizado teste incremental em clicloergometro, a fim de avaliar modificações no desempenho fisico e capacidade aerobia. Os dados obtidos foram analisados utilizando modelo de regressão linear com efeitos mistos ($p \leq 0,05$). **Resultados:** Após a suplementação AÇ houve aumento da capacidade antioxidante do soro ($p=0.006$) e redução da peroxidação lipídica ($p=0.01$). Não houve modificação dos marcadores inflamatórios. Mesmo sem aumento da carga máxima alcançada durante o teste incremental, após a intervenção com AÇ houve uma redução de 29% ($p=0,025$) da concentração de lactato sanguíneo a 300 watts de potência em comparação ao teste inicial, e de 28% ($p=0,028$) em comparação ao placebo. Houve também aumento da ILan em resposta a suplementação AÇ (AÇ Pré: 223,85±17,11W; AÇ Pós: 244,29±12,61W; $p=0,006$; PL Pré: 220,05±23,84W; PL Pós: 230,71±13,93W; $p=0,133$) Apenas após o consumo de placebo houve aumento da porcentagem de DNA na cauda do cometa (<0.001). **Conclusão:** Em resumo, a suplementação AÇ contribuiu para minimizar a peroxidação lipídica e aumentar a capacidade antioxidante no soro, mas não atenuou os danos oxidadivos presentes no DNA. O AÇ também esteve relacionado a menores elevações na concentração de lactato sanguíneo durante o teste incremental e ao aumento da ILan, sugerindo melhoria da capacidade aeróbia dos participantes, confirmando os efeitos da polpa de açaí sobre biomarcadores que podem influenciar o desempenho de atletas de ciclistas.

Palavras-chave: Açaí; polifenóis; capacidade aeróbia; exercício; atletas.

Introdução

O açaí é considerado uma das frutas mais populares e amplamente consumidas na região norte do Brasil. É fruto da palmeira *Euterpe oleracea* Martius, nativa da região amazônica. Em seu estado maduro a polpa do açaí apresenta cor roxo-escura e constitui 5 – 15% do peso do fruto (1,2). Nos últimos anos o consumo de açaí e produtos derivados como sucos, bebidas instantâneas em pó, barras, cápsulas, *smoothies* etc., tem aumentado substancialmente no Brasil e no mundo, devido sua relação com benefícios à saúde (3,4).

A composição fitoquímica do açaí revela a cianidina 3-O-rutinosídeo e cianidina 3-O-glicosídeo como antocianinas predominantes, bem como a presença de outros compostos fenólicos dentre os quais várias flavonas e derivados de flavanóis (5-8). As antocianinas representam cerca de 90% da capacidade antioxidante total do açaí, que chegou a ser observada como maior que a do suco de uva muscadínea e de vários *berrys*, como mirtilos de arbusto alto, morangos, amoras, framboesas e *cranberrys* (7,6). Este elevado conteúdo de polifenóis antioxidantes confere ao açaí um importante papel como alimento funcional, podendo ser utilizado como suplemento alimentar (9,10).

Foi demonstrado que a suplementação com açaí melhorou o estado antioxidante, e foi capaz de aumentar a atividade da enzima catalase e a capacidade antioxidante total no soro, bem como reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e LDL oxidada (11-13) em humanos, além de atuar modulando as ROS e a expressão gênica de enzimas antioxidantes em ratos (14,15) e proporcionando maior eficiência na proteção contra danos ao DNA de células hepáticas e renais de camundongos (16). Efeitos anti-inflamatórios também têm sido associados aos polifenóis da polpa de açaí (17,18).

Sendo assim, possivelmente a polpa de açaí possua propriedades funcionais que podem ser úteis para atletas de resistência que realizam exercícios de natureza oxidativa, capazes de aumentar a produção de radicais livres. Quando esta produção se torna descontrolada ocorre dano celular, e este potencial é descrito como stress oxidativo, que resulta numa resposta inflamatória do sistema imune que pode comprometer o desempenho do atleta (19,20). O papel das ROS na patologia de numerosas doenças é conhecido, e o seu acúmulo também causa danos oxidativos ao DNA (21).

Neste sentido, ensaios clínicos têm associado o consumo de polifenóis isolados ou presentes na dieta a resultados relacionados ao exercício, tais como o aumento do tempo de fadiga, aumento do VO_2Máx, modulação da concentração de lactato sanguíneo e aumento da biogênese e função mitocondrial em indivíduos não treinados (22-14). Em atletas, foi observado que a suplementação com bebidas funcionais contendo açaí melhorou a capacidade antioxidante plasmática, perfil lipídico sérico (25), percepção de esforço e resposta cardiorrespiratória, além de atenuar o estresse metabólico induzido pelo exercício (26). No entanto, ainda há grande escassez de estudos que demonstrem os efeitos do consumo regular da polpa de açaí pura sobre marcadores de estresse oxidativo e de desempenho físico em atletas.

Diante disto, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da suplementação com polpa açaí sobre marcadores oxidativos, inflamatórios e de capacidade aeróbia, que podem influenciar no desempenho de atletas de resistência. Hipotetizamos os efeitos benéficos da suplementação com polpa de açaí sobre processos inflamatórios e oxidativos, sendo capazes de combater danos oxidativos presentes no DNA, bem como agir positivamente sobre parâmetros de capacidade aeróbia em atletas ciclistas.

Metodologia

Participantes

O estudo incluiu dez atletas ciclistas amadores, com idade de 33,5 ± 4,7 anos, estatura de 1.81 ± 0.06 m, peso de 78.22 ± 6.93 kg e índice de massa corporal (IMC) de 23,99 ± 1,38 kg/m^2. Estavam engajados em rotinas de treino em ciclismo de 8 horas semanais, e praticaram ciclismo pelo menos durante os dois últimos anos consecutivos. Cada participante informou a rotina de treinamento através de relatório de treinamento diário, registrado durante o período de intervenção de 15 dias, para determinar a carga de treinamento. Indivíduos fumantes, portadores de doenças crônicas tais como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, gastrintestinais, alterações hematológicas, que faziam uso de hormônios e drogas anti-inflamatórias não foram incluídos neste estudo. Antes do início da pesquisa, os participantes foram informados detalhadamente sobre o protocolo experimental (objetivos, metodologia, benefícios e riscos) e assinaram voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto (EEFERP - USP), Ribeirão Preto, Brasil (Protocolo nº 1.641.336).

Tamanho amostral

O tamanho amostral foi calculado com base nos resultados de um estudo cross-over, randomizado e placebo controlado conduzido por Del Bo' et al. (27), que demostrou o consumo de uma dose de mirtilos (alimento fonte de antocianinas) por homens saudáveis como sendo suficiente para melhorar a defesa antioxidante das células contra danos no DNA. No presente estudo, dez indivíduos foram calculados para avaliar o efeito antioxidante da suplementação com polpa de açaí sobre possíveis danos presentes no DNA, com média das diferenças de 5.1 (DP 5.52), nível de significância de 0.05 e poder estatístico de 80%.

Delineamento experimental

Foi conduzido um estudo crossover, randomizado, placebo controlado e com medidas repetidas, em que os indivíduos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo A (n=5) e grupo B (n=5), que foram suplementados com 400g/dia de polpa de açaí (AÇ) e 400g/dia de bebida placebo (PL) após o treino. A um grupo foi atribuída a sequência AÇ/*Wash-out*/PL, enquanto que ao outro foi atribuída a sequência PL/*Wash-out*/AÇ. Cada período de suplementação foi de 15 dias, seguido por wash-out de 30 dias. Os voluntários foram instruídos a manter seus hábitos alimentares e de estilo de vida habituais, mas abster-se de consumir fontes externas de polpa de açaí ou outros alimentos à base de açaí e suplementos antioxidantes durante a pesquisa. A rotina de treino, parâmetros antropométricos, alimentares, oxidativos, inflamatórios e de desempenho foram avaliados conforme representado na figura 1.

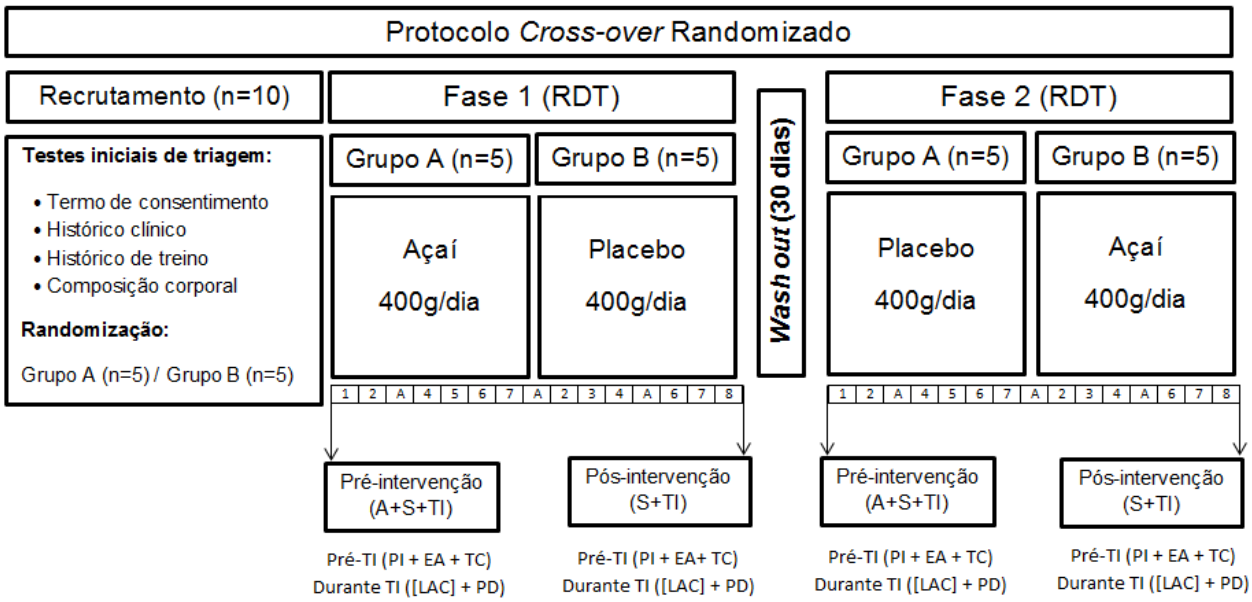

Figura 1. Delineamento experimental. RDT = Registro diário de treino; A = Registo Alimentar; S = Coleta de sangue venoso; TI = Teste incremental; PI = Parâmetros inflamatórios; EA = Estado antioxidante; TC = Teste do cometa; [LAC] = Concentração de lactato sanguíneo; PD = Parâmetros de desempenho.

Composição corporal

Para fins de caracterização da amostra, um aparelho de impedância bioelétrica (InBody 720, Biospace, Tokyo, Japão) foi utilizado para determinar a massa corporal (kg) e composição, incluindo massa gorda (kg), massa magra (kg) e porcentagem de gordura corporal, com os participantes descalços, sem adornos metálicos, vestindo roupas leves, em jejum completo de 2 horas, sem ingerir bebida alcoólica e sem praticar atividade física nas últimas 24 horas.

Avaliação alimentar

A avaliação da dieta foi realizada quantitativamente por meio de registro alimentar de três dias alternados, realizados antes e durante a suplementação com açaí e placebo. A precisão dos registros foi baseada em um conjunto de fotografias de alimentos preparados que são frequentemente consumidos no Brasil e seus respectivos tamanhos de porção (28). As análises dos dados dietéticos obtidos foram realizadas utilizando o programa Dietbox, versão 6.9.8, 2018, Dietbox Informática, Porto Alegre, RS, Brasil, utilizando o banco de dados da tabela brasileira de composição de alimentos – TACO (29).

Suplementação

A polpa de açaí pasteurizada foi obtida a partir de frutos de uma única safra por despolpamento industrial. Foi fornecida pelo grupo Petruz Fruity (Castanhal, Pará, Brasil) em embalagens de 1kg congeladas a -20 ºC. O Quadro 1 mostra a informação nutricional da polpa de açaí conforme fornecida pelo fabricante.

Mertens-Talcott et al. (17), verificou aumento da capacidade antioxidante plasmática ao ofertar dose única de suco de açaí clarificado (7mL/Kg) contendo 531 mg/L de antocianinas, o equivalente a cerca de 290 mg de antocianinas para um indivíduo de 78 kg. Deste modo, 400 g de polpa de açaí pasteurizada, contendo cerca de 285 mg de antocianinas foi

definida como dose para avaliar os possíveis efeitos antioxidantes desta suplementação.

A suplementação placebo consistia em 400g de uma solução aquosa livre de compostos fitoquímicos, contendo fibra (1.22g), goma xantana (1.40g), ácido cítrico (1.10g), essência de açaí (0.10g), edulcorante sucralose (0.54g), corante alimentício em gel preto (0.10g), corante alimentício em gel salmão (0.10g), corante alimentício em gel verde escuro (0.10g), corante alimentício em gel marrom (0.10g), corante alimentício em pó roxo batata (0.89g), corante alimentício em pó vinho bordô (1.57g), a fim de criar uma cor púrpura semelhante à da polpa de açaí.

Tanto a polpa de açaí pasteurizada quanto o placebo foram embalados em porções de 400g, embaladas em vácuo parcial, e armazenados a -20ºC até distribuição em recipientes térmicos. Os participantes foram orientados a manter as porções congeladas, e algumas horas antes do consumo transferir para temperatura de refrigeração (+4°C a +10ºC) para descongelamento parcial.

O consumo de ambas as bebidas foram monitorados por meio de fotos enviadas através de aplicativos de mensagens para *smart fones.*

Dosagem de fenólicos totais da polpa de açaí

Os fenólicos totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu (30). Foram misturados 0,5 mL de solução padrão ou extratos centrifugados com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:10 v/v) seguido por adição de 2 mL de carbonato de sódio (4:96, p/v). Após 2 h, a absorbância a 750 nm foi medida usando um espectrofotômetro (Epoch, Biotek). O etanol foi usado como um controle em branco. O teor fenólico total foi quantificado em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 g de peso fresco (mg GAE/100 g de PF) (31).

Quadro 1. Informação nutricional da polpa de açaí por porção de 400 gramas.

Nutriente	Quantidade
Valor energético	420 kcal = 1792 kj
Carboidratos	17.6 g
Proteínas	6.4 g
Gorduras Totais	37.2 g
Gorduras Saturadas	8.8 g
Gorduras *Trans*	0 g
Fibra Alimentar	14.8 g
Vitamina A	334.4 µg
Cálcio	204 mg
Ferro	2.6 mg

Dados fornecidos pelo fabricante.

Dosagem de antocianinas totais da polpa de açaí

As antocianinas monoméricas totais foram determinadas pela diferença entre a absorbância das amostras a pH 1,0 (tamponado com KCl a 0,025 *M*) e a pH 4,5 (tamponado com acetato de sódio a 0,4 *M*), a 510 nm e 700 nm respectivamente. Misturaram-se alíquotas de extratos centrifugados de 1,5 mL com 2,5 mL de tampão de pH 1 e tampão de pH 4,5, respectivamente. Após 30 min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Epoch, Biotek). O teor total de antocianinas foi quantificado como equivalentes de cianidina-3-glucósido por 100 g de peso fresco (mg / 100 g de FW) conforme descrito por Giusti (32) .

Capacidade antioxidante da polpa de açaí - CUPRAC

CUPRAC (copper reducing antioxidant capacity) é um método utilizado para a determinação da capacidade antioxidante de compostos redutores. Para este ensaio, adicionou-se 1 ml de CuCl2 (10-2M), 1ml de neocruprine (7,5x10-3), 1 ml de acetado de amônia (1 M) mais 1,1 ml da diluição da amostra a 1% com água, onde o volume final é 4,1 ml . Agitou-se a solução e deixou em repouso por 30 minutos, seguida da leitura das absorbâncias em 450 nm. E por meio do coeficiente da absortividade do trolox, encontou-se os valores em µmol de Trolox/g conforme descrito anteriormente (33).

Coleta de sangue venoso

Em jejum de 12h, foi colhida uma amostra de 20 mL de sangue da veia antecubital do braço no início e ao final de cada fase de suplementação, antes da realização do teste incremental. O material coletado foi empregado nas análises de parâmetros oxidativos, inflamatórios e teste do cometa. Este procedimento foi conduzido por técnicos habilitados em coleta de sangue.

Peroxidação lipídica no soro (ensaio TBARS)

O teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizado como indicador da peroxidação lipídica no soro (34,35). O 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) foi usado como padrão para equivalentes de malondialdeído (MDA) (1 mol TEP = 1 mol de MDA na reação com ácido tiobarbitúrico - TBA). Foram misturados 200 µL de padrão de MDA (0; 1,25; 1,88; 2,50; 3,13; 3,75; 6,25; 12,50 µM) e 200 µL de cada amostra de soro com 200 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) e depois 500 µL de coloração reagente (5,3 mg / mL de TBA diluído em ácido acético a 20%, pH 3,5), em seguida submetido ao vórtex, incubado a 100ºC por 60 minutos e arrefecido em gelo durante 10 min. Os padrões e as amostras foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 min e a absorvência do sobrenadante foi

determinada a 532 nm num leitor de microplacas (Epoch, Biotek). A concentração de TBARS baseou-se no coeficiente de extinção molar de MDA obtido por uma curva analítica.

Capacidade antioxidante no soro (ensaio ABTS)

O ensaio de 2,2'-azinobis (3-etilbenztiazolina sulfonato) (ABTS) foi utilizado para determinar a capacidade antioxidante no soro dos voluntários (36). Trolox foi usado como padrão. Foram adicionados 5 µl de uma solução 7 mM de ABTS juntamente com 88 ml de uma solução de persulfato de potássio 140 mM e a mistura foi deixada à temperatura ambiente, no escuro. Antes da utilização, a solução foi diluída (1:88) com um tampão de fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 (absorvância inicial a 734 nm de 0,7). 5 µL de padrão de Trolox (0, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50, 1,75, 2,00 mM) e 5 µL de cada amostra de soro foram misturados com 300 µL de solução ABTS+. Após 5 min, a absorvância a 734 nm foi medida num leitor de microplacas (Epoch, Biotek). A concentração antioxidante baseou-se no coeficiente de extinção molar de Trolox obtido por uma curva analítica.

Danos oxidativos no DNA (teste do Cometa)

O teste do cometa (pH>13) foi realizado de acordo com Singh et al. (37). 50 µL de sangue venoso foram misturados a 180 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Isto foi espalhado em lâminas de microscópio pré-revestidas com ponto de fusão normal 1,5% de agarose (Invitrogen) constituindo uma lâmina com duas camadas de agarose (38). As células foram cobertas com uma lamínula e mantidas a 4°C durante 10 min. As lamínulas foram removidas das lâminas e imersas em uma solução de lise recém-preparada consistindo em NaCl 2,5 M, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 100 mM, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 1% de Triton X-100 e Tris 10 mM, pH 10, durante 22 h a 4°C . Após a lise, as lâminas foram colocadas numa unidade de eletroforese contendo 300 mM de NaOH e 1 mM de EDTA a pH> 13 e deixadas durante 20 min

para desnaturar o DNA. A eletroforese foi executada durante 20 min a uma intensidade de campo elétrico de 1 $V.cm^{-1}$ (25 V e 300 mA). As lâminas foram posteriormente imersas num tampão de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) durante 5 min.

Depois de serem secas à temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol durante 2 min e armazenadas até a análise. Após a remoção do armazenamento, cada lâmina foi corada com GelRed (1:104) (Biotium, Hayward, CA, EUA) e imediatamente analisada. Todas as etapas foram realizadas na ausência de luz. As observações do cometa foram feitas com uma ampliação de 400x usando um microscópio de fluorescência (Zeiss, AxiostarplusW, Oberkochen, DE) equipado com um filtro de excitação de 510-560 nm e uma barreira de 590 nm. Cem nucleoides por indivíduo (50 nucleóides por lâmina) foram analisados por meio do software Comet Assay IV (Perceptive Instruments, Haverhill, Reino Unido). Os resultados do teste do cometa estão expressos como a porcentagem de DNA na cauda.

Marcadores inflamatórios

Os marcadores inflamatórios séricos foram analisados por meio de KIT ELISA (Enzime Linked Immunosorbent Assay) seguindo as instruções do fabricante: interleucina-6 (Millipore Human IL-6 ELISA Kit) e fator de necrose tumoral alfa (Millipore Human TNF-α ELISA Kit). A concentração mínima detectável de IL-6 é de 1,6 pg/mL, e de TNF-α é 3.5 pg/mL.

Monitoramento da rotina de treino

Os atletas foram monitorados durante os períodos de suplementação através de relatórios diários de treino no qual os atletas registraram a carga e a modalidade de treino realizado durante a intervenção. Foi avaliada a percepção subjetiva do esforço (PSE) usando-se a escala de Foster et al. (39,40), método que permite calcular a magnitude da carga interna através da associação da intensidade com a duração do treinamento. Os resultados obtidos por meio dos diários de treino foram usados para avaliar a

carga total do treino durante o período experimental, sendo denominado como somatória, permitindo a visualização da alternância e distribuição das cargas. Além da somatória da carga, foi calculada a monotonia das cargas através da média da somatória da carga, dividido pelo desvio padrão; (Monotonia = Média das cargas ÷ DP) e a densidade das cargas por meio da multiplicação da monotonia pela somatória das cargas: Densidade = Monotonia × Somatória (41).

Avaliação da capacidade aeróbia

Os participantes foram submetidos a um teste incremental em bicicleta modelo speed, acoplada a um rolo simulador de treinamento para ciclismo (CycleOps®). O teste incremental foi programado e executado com o auxílio do sofware Virtual Training. A conexão entre a bicicleta e o software foi feita por sensor ANT (Garmin®). O teste iniciou com aquecimento a 150 watts (W) de potência durante cinco minutos. Após o aquecimento, foi iniciado o teste incremental a 150 W, com incrementos de 25 W a cada dois minutos até a exaustão voluntária do participante. A frequência cardíaca (FC) foi monitorada durante todo o teste (Polar®, S810i). Ao final de cada esforço submáximo do teste incremental, foram coletados frequência cardíaca (FC), percepção subjetiva de esforço (PSE) e 25µL de sangue do lóbulo da orelha, para determinação da concentração de lactato ([Lac]) em lactímetro (Yellow Spring Instruments, modelo YSI-2300) (41). Os pontos obtidos da relação velocidade versus [Lac] foram submetidos a dois ajustes lineares (método bisegmentado), de modo que o limiar anaeróbio (LAn) correspondeu ao ponto de intersecção das retas (42). Através da análise linear entre FC e velocidade foi determinado a FC correspondente ao LAn (FCLAn). A PSE mais próxima do LAn foi definida como a PSE correspondente ao LAn (PSELAn). A potência máxima alcançada (Wmáx) foi determinada durante o último incremento no ciclo-ergômetro. Quando necessário, a fórmula de Kuipers (43) foi utilizada para ajustar a potência máxima aeróbia.

Análises estatísticas

Os testes Shapiro-Wilk e Levene foram aplicados para avaliar a normalidade e homogeneidade dos dados, respectivamente. Teste *t* de student foi empregado para detectar diferenças entre os tratamentos no momento basal e nas variáveis de treino. Para verificar o efeito de cada intervenção nas diferentes fases de suplementação, um modelo de regressão linear múltipla com efeitos mistos foi adotado, em que tempo (pré e pós) e tratamento (AÇ ou PL) foram definidos como fatores independentes e a identificação numérica dos voluntários foi definida como variável de assunto, especificando a sequência de tratamento (AÇ vs PL ou vice-versa), a fim de detectar a presença de efeitos residuais do tratamento anterior. Os dados foram analisados pelo software IBM SPSS Statistics para Windows (Versão 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e o nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$.

Ainda, o teste Cohen (f^2) foi utilizado como medida do tamanho do efeito (effect size) para o modelo misto, por meio da formula: $f^2 = \omega^2 / 1- \omega^2$, em que $\omega^2 = x_1 - x_2 / S^2_{total}$, onde x_1 e x_2 são as médias dos tratamentos, e S^2_{total} é a soma das variâncias dos grupos. O efeito foi considerado nulo na faixa de 0.0 – 0.1, pequeno de 0.2 – 0.4, médio de 0.5 – 0.7 e grande de 0.8 - ≥ 1.0 (44).

Resultados

As características antropométricas e de treino dos participantes estão apresentadas na tabela 1. Os resultados não mostraram diferenças entre os grupos. O teor de fenólicos totais, antocianinas totais e a capacidade antioxidante da polpa de açaí pasteurizada utilizada neste estudo, foram analisados e estão apresentados na tabela 2.

Todos os parâmetros nutricionais avaliados estão de acordo os valores de referência para pessoas saudáveis propostos pelas DRIs e não ultrapassam o limite máximo tolerável (45) (Tabela 3). Os resultados mostram que a suplementação com açaí elevou a ingestão de fibras e

gorduras, que esteve acima daquela observada após a suplementação placebo, porém no limite de significância (fibras pós-açaí vs. fibras pós-placebo p=0.057; gorduras pós-açaí vs. gorduras pós-placebo p=0.064).

Os resultados das avaliações de peroxidação lipídica e capacidade antioxidante no soro dos ciclistas estão apresentados na tabela 4. Após a suplementação com polpa de açaí, observou-se redução de 8.53% da peroxidação lipídica no soro (MDA) (p=0.005) e aumento da capacidade antioxidante (p=0.005). Estas diferenças foram expressivas em comparação aos resultados após a suplementação placebo (p<0.001).

Com relação à porcentagem de DNA na calda do cometa, os testes mostraram que os grupos não partiram da mesma condição na fase 1, apresentando diferença estatística entre si antes do início da intervenção (P=0.007). Houve ainda diferença entre pré-placebo e pré-açaí no grupo B (P=0.012), sugerindo uma possível permanência de efeitos da suplementação placebo inicial mesmo após o *wash out*. Por essa razão os resultados para esta variável específica foram apresentados de forma desmembrada em grupos A e B, em vez de agrupados por tratamento. Neste cenário, o grupo B apresentou aumento significativo da porcentagem de DNA na calda do cometa após a suplementação placebo (P<0.001). Observou-se ainda uma tendência de elevação do dano no DNA associado à suplementação placebo, superior àquele observado após a suplementação com açaí, tanto no grupo A (P=0.07) como no grupo B (P=0.08). Não houve efeito protetor contra os danos oxidativos ao DNA associados à intervenção com açaí (Figura 2).

As citocinas inflamatórias IL-6 e TNF-α presentes no soro também foram avaliadas, a fim de investigar alguma ação anti-inflamatória dos compostos fenólicos do açaí nos atletas. No entanto, não foram observadas alterações significativas destas variáveis após a suplementação com açaí ou placebo (Tabela 5).

Ao avaliar a cinética da concentração de lactato sanguíneo durante o teste incremental (Figura 3), observou-se que após a suplementação com polpa de açaí houve redução de 29% na concentração de lactato (p=0,025)

a 300 watts de potência em comparação ao teste inicial, e de 28% (p=0,028) em relação ao placebo. Ainda, em relação às variáveis de desempenho físico apresentadas na tabela 6, não houve aumento da Wmáx durante o teste incremental. No entanto, foi observado aumento da ILan em resposta à suplementação com polpa de açaí (p=0,006), que em comparação ao placebo esteve no limite de significância (p=0.058). Não houve diferenças significativas sobre a PSELan e sobre a frequência FCLan em relação ao teste inicial (Tabela 6).

Discussão

O propósito deste estudo foi verificar efeito da suplementação com polpa de açaí sobre marcadores inflamatórios, oxidativos e de capacidade aeróbia de atletas ciclistas. Os principais achados desta pesquisa são os seguintes: (a) O açaí reduziu a peroxidação lipídica e elevou a capacidade antioxidante no soro; (b) O açaí modulou a concentração lactato durante o teste incremental e elevou a intensidade de limiar anaeróbio; (c) O açaí não exerceu efeito protetor contra danos oxidativos ao DNA.

Os valores de MDA encontravam-se elevados ao inicio da intervenção, sugerindo presença de estresse oxidativo. Após o período de suplementação com açaí, houve redução significativa de MDA (f^2=0.94) e o aumento da capacidade antioxidante no soro dos voluntários (f^2=1.0), mostrando que o protocolo de suplementação foi efetivo e possui relevante importância prática, considerando o expressivo valor de f^2 (Tabela 4). Neste sentido, foram demonstrados os efeitos do consumo regular de polpa de açaí sobre a redução dos níveis plasmáticos da LDL oxidada e produtos da oxidação lipídica como o MDA, bem como o aumento dos níveis de capacidade antioxidante total (13). O incremento na atividade da catalase de células polimorfonucleares associadas à redução de ROS também foi observado após a ingestão regular de açaí, bem como redução da proteína carbonila e aumento dos níveis de grupos sulfidrila (11), sugerindo que esta fruta tem a capacidade de promover uma melhora geral no estado oxidativo.

Estes efeitos podem ser atribuídos às quantidades consideráveis de antocianinas e outros compostos fenólicos do açaí, além de tocoferóis e pequenas quantidades de carotenóides (10,46).

Estudos têm relatado os efeitos da suplementação antioxidante predominante em polifenóis sobre a melhora do estado antioxidante geral associado à redução de danos oxidativos ao DNA. Um estudo placebo controlado verificou que o consumo de uma única porção de 400g de mirtilos foi suficiente para melhorar a defesa antioxidante celular contra danos ao DNA de homens saudáveis (27). Ainda, outro estudo demonstrou que o consumo de 200 ml/dia de suco de fruta rico em antocianinas e polifenóis durante quatro semanas por pacientes de hemodiálise, foi capaz de reduzir o dano oxidativo ao DNA, bem como a peroxidação lipídica e proteica (47). Em homens portadores de fatores de risco cardiovascular, a suplementação com uma bebida contendo 25g de mirtilos liofilizados por seis semanas reduziu os níveis de bases de DNA oxidadas endogenamente em comparação ao placebo (48). No entanto, nenhum destes estudos esteve associado à prática de exercício ou foi conduzido com atletas.

Em contra partida, a suplementação com polpa de açaí ofertada no presente estudo revelou resultados inconsistentes com relação aos efeitos antioxidantes detectados no soro e a ausência de efeito protetor contra os danos oxidativos ao DNA (Figura 2). Embasando estes achados, um estudo de revisão sistemática (49) e outro de biomonitoramento envolvendo 141 indivíduos (50) não conseguiram demonstrar correlação entre os níveis de MDA e quebras de DNA ou dano oxidativo ao DNA. Outra questão se refere a fatores que podem interferir na qualidade dos resultados de estudos com intervenção dietética em humanos empregando teste do cometa. De acordo com Hoelz et al. (51), dentre estes fatores estão os efeitos sazonais, o estilo de vida, o grau de atividade física, os hábitos alimentares, a dose de suplemento ofertado e ainda o tempo de suplementação; e embora a comparação de diversos estudos disponíveis seja útil na definição da dose e

tempo ideal de intervenção, geralmente as limitações financeiras, bem como a capacidade dos laboratórios, são fatores limitantes comuns.

Após a suplementação placebo foi observado um aumento senssível do percentual de DNA na cauda do cometa (Figura 2), possivelmente devido aos corantes adicionados à formulação do placebo, que podem ter exercido efeitos genotóxicos. Estudos tem demostrado que pequenas doses de corantes tartarazina, azorrubina e eritrosina (presentes na composição doscorantes utilizados no placebo), são capazes induzir danos na estrutura do DNA (52-54). O metabolismo dos azo-corantes, como é o caso da tartarazina e azorrubina, resulta na produção do íon benzeno-diazônio, que reage com o DNA e resulta na formação de adutos de DNA. Corantes também induzem danos no DNA através de espécies reativas de oxigênio (52).

Em relação às citocinas inflamatórias, os atletas já apresentavam IL-6 e TNF-α elevados antes do início da intervenção, indicando processo inflamatório pré-existente (Tabela 5). A pesar de alguns estudos envolvendo consumo regular de alimentos ricos flavonoides demonstrarem sua ação sobre marcadores inflamatórios, como a redução de IL-6 (55,56) e TNF-α (57,58), em indivíduos saudáveis e não saudáveis, não observamos tal efeito nos participantes deste estudo, possivelmente devido a elevada variabilidade dos dados e o tamanho amostral reduzido. Deste modo, estudos adicionais são necessários para examinar os potenciais benefícios do consumo regular de polpa de açaí sobre marcadores inflamatórios em atletas.

Com relação ao desempenho físico, um estudo conduzido com indivíduos não treinados suplementados com suco de cereja, que é fonte de antocianinas, apoia o conceito de que uma maior disponibilidade antioxidante pode retardar o tempo de fadiga e promover a recuperação muscular, o que pode refletir na melhora do desempenho (22). Em outro estudo, o VO_2Máx e o tempo de fadiga aumentaram após sete dias de suplementação com polifenol quercetina em comparação ao placebo, porém novamente em indivíduos não treinados (24). No presente estudo, uma

diminuição das concentrações de lactato durante o teste incremental foi observada a partir dos 300 watts, e esteve associada à suplementação com açaí (Figura 3). Em termos práticos, após atingir o limiar anaeróbio, os participantes suplementados com polpa de açaí foram capazes de realizar a mesma carga de trabalho produzindo menos lactato (f^2=1.03). Um aumento da ILAn (p=0.006) também foi associado ao consumo de açaí. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem um aprimoramento da capacidade aeróbia. Isso pode ser explicado, em parte, por um mecanismo descrito com o polifenol resveratrol, em que esta molécula de polifenol atua ativando a Sirt1 por interação alostérica, que por sua vez ativa a PGC1-α, estimulando o aumento da biogênese e função mitocondrial e consequentemente da função respiratória, além de induzir a transcrição do gene gliconeogênico no fígado, que pode favorecer a remoção do lactato por meio do ciclo de Cori (59,60). Neste mesmo sentido, evidências em estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que antocianinas e compostos semelhantes produzem efeitos equivalentes aos do mecanismo descrito acima (23,61,62).

Não houve alteração da ingestão calórica dos atletas após a suplementação, provavelmente porque os participantes substituíram outros alimentos fonte de energia pelo consumo da polpa de açaí, e no caso do placebo, era frequentemente consumido como sobremesa ou como parte de uma refeição com outros alimentos. Essa diferença na forma de consumo dos suplementos pode estar relacionada ao fato de o açaí possuir alto teor de fibras e gorduras, o que pode resultar no aumento da saciedade (13). Esta substituição de uma refeição pela polpa de açaí não resultou em alteração na ingestão diária de carboidratos e proteínas em gramas, possivelmente em decorrência do consumo de suplementos esportivos, fonte destes macronutrientes.

A suplementação com açaí aumentou a ingestão de fibras (P=0.005) e gorduras (P=0.002) dos voluntários (Tabela 3), auxiliando-os a alcançar a RDA (Recommended Dietary Allowances) de 38 g/dia de fibras (45). Em concordância com nossos resultados, um estudo conduzido com mulheres

saudáveis suplementadas com 200g de polpa de açaí por quatro semanas, também mostrou elevação da ingestão de fibras e gorduras em gramas/dia (13), enquanto que outros estudos com as mesmas características de suplementação mostraram aumento apenas na ingestão de fibras (63,11). No entanto, nenhum destes estudos foi placebo controlado e/ou conduzido com atletas.

Para atletas, um sistema de defesa antioxidante bem equilibrado é de grande importância para prevenir danos oxidativos induzidos pelo exercício exaustivo (64,65). Mesmo havendo evidências de que o treinamento de resistência praticado regularmente por si só induz adaptações biológicas, melhorando a eficiência do sistema de defesa antioxidante enzimático e aumentando a biogênese mitocondrial (66,67), e que doses elevadas de antioxidantes isolados podem comprometer essas adaptações (68), acreditamos que a suplementação com pequenas doses de múltiplos nutrientes antioxidantes presentes nos alimentos ofertados pela dieta, apresenta mais benefícios e menos riscos em comparação com altas doses de antioxidantes isolados (69).

Conclusão

Em resumo, os resultados obtidos revelaram a eficácia da suplementação com polpa de açaí em reduzir a peroxidação lipídica em atletas de resistência e elevar a capacidade antioxidante do soro, modulando a concentração de lactato sanguíneo e elevando a intensidade de limiar anaeróbio, sugerindo assim um aprimoramento da capacidade aeróbia, mesmo com a presença de adaptações fisiológicas inerentes ao treinamento físico. Diante do exposto, uma dieta rica em antioxidantes naturais, incluindo quantidades generosas de polpa de açaí, parece ser uma boa estratégia para de minimizar os efeitos do estresse oxidativo induzido pelo treino intenso.

Referências

1. Menezes FS, Falcão DQ, Mendonça Filho RF, Silveira CS, Rennó MN, Rodrigues VP, et al. Chemical and pharmacological survey on Brazilian medicinal plants using ethnopharmacological information as a tool. Acta Horticulturae. 2005; 675: 89–95.
2. Brondizio ES, Safar CAM, Siqueira AD. The urban market of Acai fruit (Euterpe oleracea Mart.) and rural land use change: ethnographic insights into the role of price and land tenure constraining agricultural choices in the Amazon estuary. Urban Ecosyst. 2002; 6: 67-97.
3. Sabbe S, Verbeke W, Deliza R, Matta VM, Van Damme P. Consumer liking of fruit juices with different açaí (Euterpe oleracea Mart.) concentrations. J Food Sci. 2009; 74: S171–6.
4. Schreckinger ME, Lotton J, Lila MA, de Mejia EG. Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. J Med Food. 2010; 13: 233–46.
5. Schauss A G, Wu X, Prior RL, Ou B, Patel D, Huang D, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, Euterpe oleraceae Mart. (acai). J Agric Food Chem. 2006; 54: 8598–8603.
6. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of acai (Euterpe oleracea Mart.). J Agric Food Chem. 2004; 52: 1539–1545.
7. Pacheco-Palencia LA, Duncan CE, Talcott ST. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, Euterpe oleracea and Euterpe precatoria. Food Chem. 2009; 115: 1199-1205.
8. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. Food Chem. 2010; 121: 996-1002.
9. Hassimotto NM, Genovese MI, Lajolo FM. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. J Agric Food Chem. 2005; 53: 2928–2935.

10. Yamaguchi KK, Pereira, LF, Lamarao CV, Lima ES, Da Veiga-Junior VF. Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. Food Chem. 2015; 179: 137-151.
11. Barbosa PO, Pala D, Silva CT, Souza MO, Amaral JF, Vieira RAL, Folly GAF, Volp ACP, Freitas RN. Açai (Euterpe oleracea Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. Nutrition. 2016; 32: 674–680.
12. Mertens-Talcott S, Rios J, Jilma-Stohlawetz R, Pacheco-Palencia LA, Meibohm B, Talcott ST, Derendorf H. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioantioxidantects after the consumption of anthocyanin-rich açai juice and pulp (Euterpe oleracea Mart.) in human healthy volunteers. J Agric Food Chem. 2008; 56(17): 7796-7802.
13. Pala D, Barbosa PO, Silva CT, de Souza MO, Freitas FR, Volp AC, Maranhão RC, Freitas RN. Açai (Euterpe oleracea Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women. Clin Nutr. 2017; S0261-5614(17): 30051-1.
14. Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira RP, Pedrosa ML. Diet supplementation with acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. Nutrition. 2010; 26: 804–810.
15. Guerra JF, Magalhaes CL, Costa DC, Silva ME, Pedrosa ML. Dietary acai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidante enzymes in rats. J Clin Biochem Nutr. 2011; 49(3): 188-194.
16. Ribeiro JC, Antunes LM, Aissa AF, Darin JD, De Rosso VV, Mercadante AZ, et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (Euterpe oleracea Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. Mutat Res. 2010; 695 (1-2): 22-28.
17. Kang J, Li Z, Wu T, Jensen GS, Schauss AG, Wu X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (Euterpe oleracea Mart.). Food Chem. 2010; 122: 610–617.

18. Kang J, Xie C, Li Z, Nagarajan S, Schauss AG, Wu T, et al. Flavonoids from acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. Food Chem. 2011; 128(1): 152-157.
19. Elkington LJ, Gleeson M, Pyne DB, Callister R, Wood LG. Inflammation and Immune Function: Can Antioxidants Help the Endurance Athlete? In: Lamprecht M, editor. Antioxidants in Sport Nutrition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis: 2015. Chapter 11. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books.
20. Slattery K, Bentley D, Coutts AJ. The Role of Oxidative, Inflammatory and Neuroendocrinological Systems During Exercise Stress in Athletes: Implications of Antioxidant Supplementation on Physiological Adaptation During Intensified Physical Training. Sports Med. 2014.
21. Tomasello B, Grasso S, Malfa G, Stella, S, Favetta M, Renis M. Double-Face Activity of Resveratrol in Voluntary Runners: Assessment of DNA Damage by Comet Assay. J Med Food. 2012; 15(5): 441–447.
22. Bowtell JL, Sumners DP, Dyer A, Fox P, Mileva KN. Montmorency cherry juice reduces muscle damage caused by intensive strength exercise. Med Sci Sports Exerc. 2010; 43(8): 1544–1551.
23. Davis JM, Carlstedt CJ, Chen S, Carmichael MD, Murphy EA. The dietary flavanoid quercetin increases VO_2max and endurance capapcity. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2010; 20: 56–62.
24. Nieman DC, Williams AS, Shanely RA, Jin F, McAnulty SR, Triplett NT, Austin MD, Henson DA. Quercetin's influence on exercise performance and muscle mitochondrial biogenesis. Med Sci Sports Exerc. 2010; 42(2): 338–345.
25. Sadowska-Krępa E, Kłapcińska B, Podgórski T, Szade B, Tyl K, Hadzik A. Effects of supplementation with acai (Euterpe oleracea Mart.) berry-based juice blend on the blood antioxidant defence capacity and lipid profile in junior hurdlers. A pilot study. Biol Sport. 2015; 32: 161-168.
26. Carvalho-Peixoto J, Moura MR, Cunha FA, Lollo PC, Monteiro WD, Carvalho LM, Farinatti P de T. Consumption of açai (Euterpe oleracea Mart.) functional beverage reduces muscle stress and improves effort

tolerance in elite athletes: a randomized controlled intervention study. Appl Physiol Nutr Metab. 2015; 40(7): 725-33.

27. Del Bo′ C, Riso P, Campolob J, Møller P, Loft S, Klimis-Zacas D, Brambillae A, Rizzolo A, Porrini M. A single portion of blueberry (Vaccinium corymbosum L) improves protection against DNA damage but not vascular function in healthy male volunteers. Nutr Res. 2013; 33: 220-227.
28. Pontes J, Pfrimer K, Tremeschin MH, Molina MC, Chiarello PG. Nutrição e Metabolismo. CONSUMO ALIMENTAR. Visualizando Porções. Editor da Série Helio Vannucchi. – [Reimpr.] – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
29. Universidade Estadual De Campinas. Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: UNICAMP/NEPA, 2011. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela.
30. Waterhouse AL. Polyphenolics. Determination of total phenolics. In R. E. Wrolstad (Ed.), Current protocols in food analytical chemistry. 2000; (pp. 111–118). New York: John Wiley & Sons.
31. Borges PR, Tavares EG, Guimarães IC, Rocha RP, Araujo ABS, Nunes EE, et al. Obtaining a protocol for extraction of phenolics from açaí fruit pulp through Plackett–Burman design and response surface methodology. Food Chem. 2016; 210: 189–199.
32. Giusti MM. Characterization and measurement of anthocyanins by UVvisible spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), Current protocols in food analytical chemistry. 2001; (F1.2.1-13.) John Wiley & Sons.
33. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Çelik SE. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. Microchim Acta. 2008; 160: 413–419.
34. Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. Methods Mol Biol. 1998; 108: 101–106.
35. Nasser ALM, Dourado GKZS, Manjate DA, Carlos IZ, Cesar, TB. Oxidative stress evaluation on the blood of regular consumers of orange juice. Rev Ciênc Farm Basica Apl. 2011; 32: 275–279.

36. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. Scand J Clin Lab Invest. 2002; 62(3): 231-6.
37. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988; 175(1): 184–191.
38. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen. 2000; 35(3): 206–221.
39. Foster C. A new approach to monitoring exercise training. Journal of Strength and Conditioning Research, Champaign. 2001; 15(1): 109-115.
40. Foster C. Athletic performance in relation to training load. Wisconsin Medical Journal, Madison. 1996; 95(6): 370-374.
41. Czuba M. Lactate Threshold (D-Max Method) and Maximal Lactate Steady State in Cyclists. J Hum Kinet. 2009; 21: 49-56.
42. Campos EZ, Milioni F, Zanuto EAC, Almeida PB, Gobbi RB, de Andrade LV, et al. Efeito das cargas de treinamento sobre parâmetros fisiológicos de futebolistas. Motriz. 2013; 19(2): 487-493.
43. Kuipers H, Verstappen, Keizer, Geurten, & van Kranenburg. Variability of aerobic performance in the laboratory and its physiologic correlates. Int J Sports Med. 1985; 6(4): 197-201.
44. Cohen B. Explaining psychological statistics. 2008; (3rd ed.). New York: John Wiley & Sons.
45. Institute of Medicine (IOM). Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements [Internet]. 2006. Disponível em: http://www.nap.edu/catalog/11537.html/.
46. Garzón GA, Narváez-Cuenca CE, Vincken JP, Gruppen H. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (Euterpe oleracea Mart.) from Colombia. Food Chem. 2017; 217: 364–372.
47. Spormann TM, Albert FW, Rath T, Dietrich H, Will F, Stockis JP, at al. Anthocyanin/Polyphenolic–Rich Fruit Juice Reduces Oxidative Cell

Damage in an Intervention Study with Patients on Hemodialysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008; 17(12): 3372–3380.

48. Riso P, Klimis-Zacas D, Del Bo' C, Martini D, Campolo J, Vendrame S. et al. Effect of a wild blueberry (Vaccinium angustifolium) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. Eur J Nutr. 2013; 52: 949–961.
49. Dotan D, Lichtenberg I, Pinchuk. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress, Prog. Lipid Res. 2004; 43: 200–227.
50. Staruchova M, Collins AR, Volkovova K, Mislanova C, Kovacikova Z, Tulinska J, et al. Occupational exposure to mineral fibres., Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defence and associations with DNA damage and repair, Mutagenesis. 2008; 23: 249–260.
51. Hoelzl C, Knasmuller S, Misik M, Collins A, Dusinska M, Nersesyan A. Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: Recent results and trends. Mutat Res Rev Mutat Res. 2009; 681(1): 68–79.
52. Xiao D, Wang H, Han D. Single and combined genotoxicity effects of six pollutants on THP-1cells. Food Chem Toxicol. 2016; 95: 96–102.
53. Soares BM, Araújo TMT, Ramos JAB, Pinto LC, Khayat BM, Bahia MO, et al. Effects on dna repair in human lymphocytes exposed to the food dye tartrazine yellow. Anticancer Res. 2015; 35: 1465-1474.
54. Chequer FMD, Venâncio VPV, Bianchi MLP, Antunes LMG. Genotoxic and mutagenic effects of erythrosine B, a xanthene food dye, on HepG2 cells. Food Chem Toxicol. 2012; 50: 3447–3451.
55. Edirisinghe I, Banaszewski K, Cappozzo J, Sandhya K, Ellis CL, Tadapaneni R, et al. Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin. Br J Nutr. 2011; 106(6): 913-22.
56. Rankin JW, Andreae MC, Oliver Chen CY, O'Keefe SF. Effect of raisin consumption on oxidative stress and inflammation in obesity. Diabetes Obes Metab. 2008; 10(11): 1086-96.
57. Weseler AR, Ruijters EJ, Drittij-Reijnders MJ, Reesink KD, Haenen GR, Bast A. Pleiotropic benefit of monomeric and oligomeric flavanols on

vascular health--a randomized controlled clinical pilot study. PLoS One. 2011; 6(12): e28460.

58. Puglisi MJ, Vaishnav U, Shrestha S, Torres-Gonzalez M, Wood RJ, Volek JS, et al. Raisins and additional walking have distinct effects on plasma lipids and inflammatory cytokines. Lipidis Healhty Dis. 2008; 7(14): 1-9.
59. Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of Human SIRT1 Activation by Resveratrol. J Biol Chem. 2005; 280(17): 17187–17195.
60. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1α. Cell. 2006; 127(6): 1109–1122.
61. You Y, Yuan X, Lee HJ, Huang W, Jin W, Zhan J. Mulberry and mulberry wine extract increase the number of mitochondria during brown adipogenesis. Food Funct. 2015; 6(2): 401-8.
62. Rasbach KA, Schnellmann RG. Isoflavones promote mitochondrial biogenesis. J Pharmacol Exp Ther. 2008; 325(2): 536-43.
63. Pereira IS, Pontes TCMCM, Vieira RAL, Folly GAF, Silva FC, de Oliveira FLP, et al. The consumption of acai pulp changes the concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and epidermal growth factor (EGF) in apparently healthy women. Nutr Hosp. 2015; 32(2): 931-945.
64. Mankowski RT, Anton SD, Buford TW, Leeuwenburgh C. Dietary Antioxidants as Modifiers of Physiologic Adaptations to Exercise. Med Sci Sports Exerc. 2015; 47(9): 1857–1868.
65. Pingitore A, Lima GPP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. Nutrition. 2015; 31(7-8): 916-922.
66. Abruzzo PM, Esposito F, Marchionni C, et al. Moderate exercise training induces ROS-related adaptations to skeletal muscles. Int J Sports Med. 2013; 34(8): 676–87.
67. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and

ROS-dependent adaptive signaling. Antioxid Redox Signal. 2013; 18(10): 1208–46.

68. Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty LS, Morrow JD, Ahmed A, Heward CB. Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship. Med Sci Sports Exerc. 2004; 36(8): 1328–1335.
69. Atalay M, Lappalainen J, Sen CK. Dietary anti-oxidants for the athlete. Med Sci Sports Exerc. 2006; 5: 182–186.

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Características da amostra.

Parâmetros Antropométricos	Grupo A	Grupo B	P valor
Idade (Anos)	35.4±4.4	32.52±1.9	0.277
Peso (kg)	78±9.4	78.4±4.4	0.463
Altura (m)	1.81±0.04	1.80±0.08	0.785
IMC (kg/m^2)	23.6±1.8	24.3±0.9	0.231
Gordura corporal (Kg)	10.1±2.1	9.8±2.3	0.398
Gordura corporal (%)	13.3±3.7	12.6±3.4	0.382
Massa livre de gordura (kg)	67.9±10.8	68.7±6.2	0.445
Massa livre de gordura (%)	86.7±3.7	87.4±3.4	0.383
Massa muscular (kg)	64.3±10.6	65±5.9	0.453
Parâmetros de treino	**Açaí**	**Placebo**	**P valor**
Carga Total (UA)	1868.78±238.75	1881.23±251.78	0.455
Monotonia (UA)	0.82±0.18	0.83±0.18	0.412
Densidade (UA)	1507.48±349.44	1568.82±332	0.346

Valores expressos em média ± DP. Teste *t* de Student. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney aplicado para dados não paramétricos. P ≤ 0.05. Parâmetros antropométricos avaliados no momento basal. Parâmetros de treino avaliados durante os períodos de intervenção.

Tabela 2. Fenólicos totais, antocianinas totais e capacidade antioxidante em 100g de polpa de açaí.

Variáveis	Média	DP	CV%
Fenólicos Totais (mg/100g)	770.1	3.4	0.4
Antocianinas Totais (mg/100g)	71.1	0.07	0.1
CUPRAC (µmol de Trolox/g)	48.7	1.5	3.1

CUPRAC: copper reducing antioxidant capacity; DP: Desvio padrão; CV%: coeficiente de variação.

Tabela 3. Consumo alimentar antes e depois da suplementação.

Variáveis	AÇ		PL		Resultados Modelo Misto
	Pré	Pós	Pré	Pós	
Energia (Kcal)	2905.6±471.2 [93.56 (16.2)]	3093.6±256.9 [99.32 (6.7)]	2878.1±510.4 [92.49 (16)]	2934.8±471.08 [94.56 (16.6)]	ET:P=0.345, f^2=0.000 EE:P=0.774, f^2=0.000 INT:P=0.639,f^2=0.008
CHO (g/dia)	323.7±104 [248.9 (80)]	331.7±74 [255 (56.8)]	329.6±84.5 [253.5 (65)]	316.9±92 [243.8 (70.7)]	ET:P=0.876, f^2=0.000 EE:P=0.936, f^2=0.001 INT:P=0.716,f^2=0.020
PTN (g/dia)	177.6±61.7 [317.2 (110.2)]	169.7±51.4 [303.3 (91.8)]	163.7±35.8 [292.4 (64)]	171.1±65.2 [305.5 (116.5)]	ET:P=0.659, f^2=0.001 EE:P=0.984, f^2=0.000 INT:P=0.590, f^2=0.027
LIP (g/dia)	80±11.7 [ND]	111.5±26.8* [ND]	86.8±15.6 [ND]	94.2±25.4 [ND]	ET:P=0.002, f^2=0.012 EE:P=0.424, f^2=0.008 INT:P=0.067, f^2=0.109
Fibras (g/dia)[§]	22.4±7.9 [59 (21)]	34.9±11.5* [91.8 (30.4)]	20.9±10.3 [55.2 (27.2)]	26.8±8.4 [70.5 (22.2)]	ET:P=0.005, f^2=0.04 EE:P=0.164, f^2=0.031 INT:P=0.255, f^2=0.138
Vit. A (µg/dia)	1282.8±581.7 [142.5 (64.6)]	1200.2±731.2 [133.3 (81.2)]	1034.3±416.6 [115 (46.3)]	1478.7±559.9 [164.3 (62.2)]	ET:P=0.743, f^2=0.000 EE:P=0.086, f^2=0.000 INT:P=0.147, f^2=0.002
Ferro (mg/dia)	18.1±5.8 [226.3 (72)]	21±5.9 [263.1 (74.7)]	17.9±3.5 [223.2 (43.7)]	18.5±6.0 [231.5 (75)]	ET:P=0.09, f^2=0.013 EE:P=0.695, f^2=0.036 INT:P=0.344, f^2=0.251
Cálcio (mg/dia)	840.7±359.4 [84 (36)]	1044.8±397.2 [104.5 (39.7)]	742.5±305 [75.2 (30.5)]	948.6±327.3 [94.8 (32.7)]	ET:P=0.172, f^2=0.001 EE:P=0.168, f^2=0.000 INT:P=0.992, f^2=0.004

Valores expressos em média ± DP e [Porcentagem de adequação comparada as RDAs ou AI[§] (desvio padrão)]. ND: Valor de referência não determinado pelas RDAs (44). Modelo de regressão linear com efeitos mistos. * P ≤ 0,05 vs. pré-açaí. CHO: Carboidratos; PTN: Proteína; LIP: Lipídeos; Vit. A: Vitamina A. ET: Efeito do tratamento; EE: Efeito de exercício; INT: Interação; f^2: teste de Cohen (f^2) effect size.

Tabela 4. Quantificação sérica de malondialdeído e capacidade antioxidante total.

Variáveis	Referência	AÇ		PL		Resultados Modelo Misto
		Pré	Pós	Pré	Pós	
MDA (µM)	1.86-3.94	6.70±0.47	6.13±0.33*,[a]	6.36±0.34	6.52±0.54	ET:P=0.045,f^2=0.50 EE:P=0.133,f^2=0.28 INT:P=0.010,f^2=0.94
CAET (µM)	0.5-2.0	1.71±0.028	1.73±0.019*,[b]	1.71±0.024	1.71±0.022	ET:P=0.011,f^2=1.03 EE:P=0.204,f^2=1.16 INT:P=0.006,f^2=1.00

Valores expressos em média ± DP. Modelo de regressão linear com efeitos mistos. Diferenças significativas: * P ≤ 0,05 vs. respectivos pré-intervenção; [a] P <0,05, [b] P <0,01 vs. pós-intervenção entre tratamentos. AÇ: Suplementação com açaí. PL: Suplementação com placebo. MDA: Malondialdeído; CAET: Capacidade antioxidante equivalente a trolox. ET: Efeito do tratamento; EE: Efeito do exercício; INT: Interação; f^2: Teste Cohen (f^2) effect size.

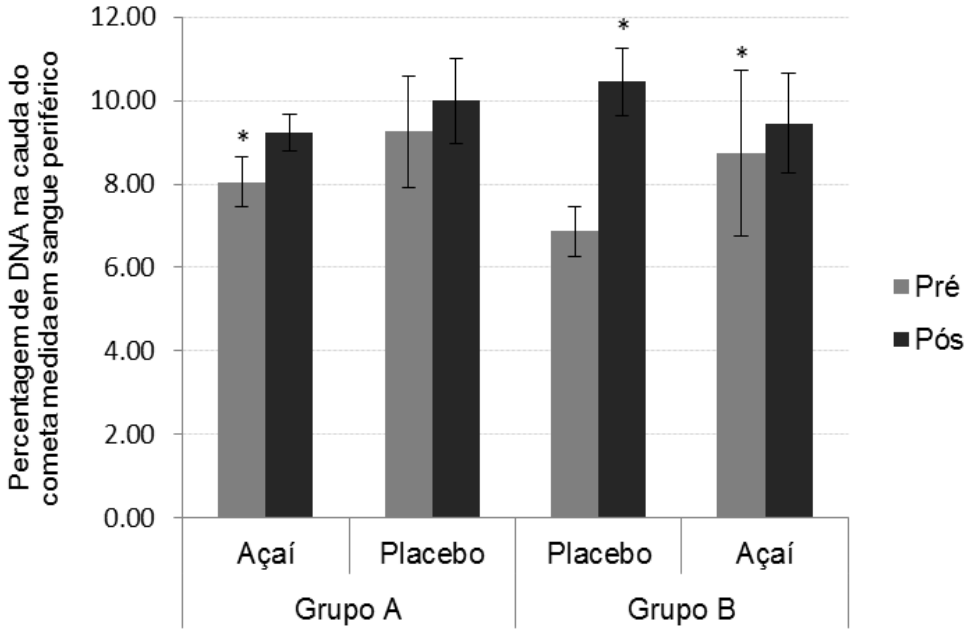

Figura 2. Porcentagem de DNA do sangue periférico antes e depois da intervenção com açaí e placebo. * Diferença estatística vs. pré-placebo Grupo B (P<0.05).

Tabela 5. Quantificação sérica de IL-6 e TNF-α, antes e depois da intervenção.

Variáveis	AÇ		PL		Resultados Modelo Misto
	Pré	Pós	Pré	Pós	
IL-6 (pg/mL)	30.55±13.62	27.39±18.96	34.79±14.15	31.85±21.34	ET:P=0.578, f^2=0.005 EE:P=0.696, f^2=0.004 INT:P=0.988, f^2=0.05
TNF-α (pg/mL)	17.93±7.02	20.43±9.85	16.93±12.29	13.73±10.18	ET: P=0.403, f^2=0.033 EE:P=0.939, f^2=0.012 INT:P=0.534,f^2=0.082

Valores expressos em média ± DP. Modelo de regressão linear com efeitos mistos. Diferenças significativas: P≤0,05 AÇ: Suplementação com açaí. PL: Suplementação com placebo. ET: Efeito do tratamento; EE: Efeito do exercício; INT: Interação; f^2: Teste Cohen (f^2) effect size.

Tabela 6. Resultados das avaliações de desempenho físico antes e depois da intervenção.

Variáveis	AÇ		PL		Resultados
	Pré	Pós	Pré	Pós	Modelo Misto
ILAn (W)	223.85±17.11	244.29±12.61*	220.05±23.84	230.71±13.93	ET:P=0.006,f^2=0.03 EE:P=0.133,f^2=0.01 INT:P=0.323,f^2=0.38
Wmáx (W)	300.14±20.45	307.62±26.45	300.21±26.37	305.20±19.70	ET:P=0.765,f^2=0.002 EE:P=0.120,f^2=0.005 INT:P=0.752,f^2=0.22
PSELAn (UA)	5.80±1.55	6.50±1.35	5.74±1.57	6.20±1.75	ET:P=0.701,f^2=0.07 EE:P=0.223,f^2=0.08 INT:P=0.798,f^2=0.56
FCLAn (bpm)	157±12	160±15	157±18	155±9	ET:P=0.532,f^2=0.018 EE:P=0.942,f^2=0.005 INT:P=0.545,f^2=0.296

Valores expressos em média ± DP. Modelo de regressão linear com efeitos mistos. Diferenças significativas: * P ≤ 0,05 vs. pré-açaí. ILAn: Intensidade de limiar anaeróbio; Wmáx: Máxima carga de trabalho atingida; PSELAn: Percepção subjetiva do esforço no limiar anaeróbio; FCLAn: freqüência cardíaca de limiar anaeróbio. ET: Efeito do tratamento; EE: Efeito de exercício; INT: Interação; f^2: teste de Cohen (f^2) effect size.

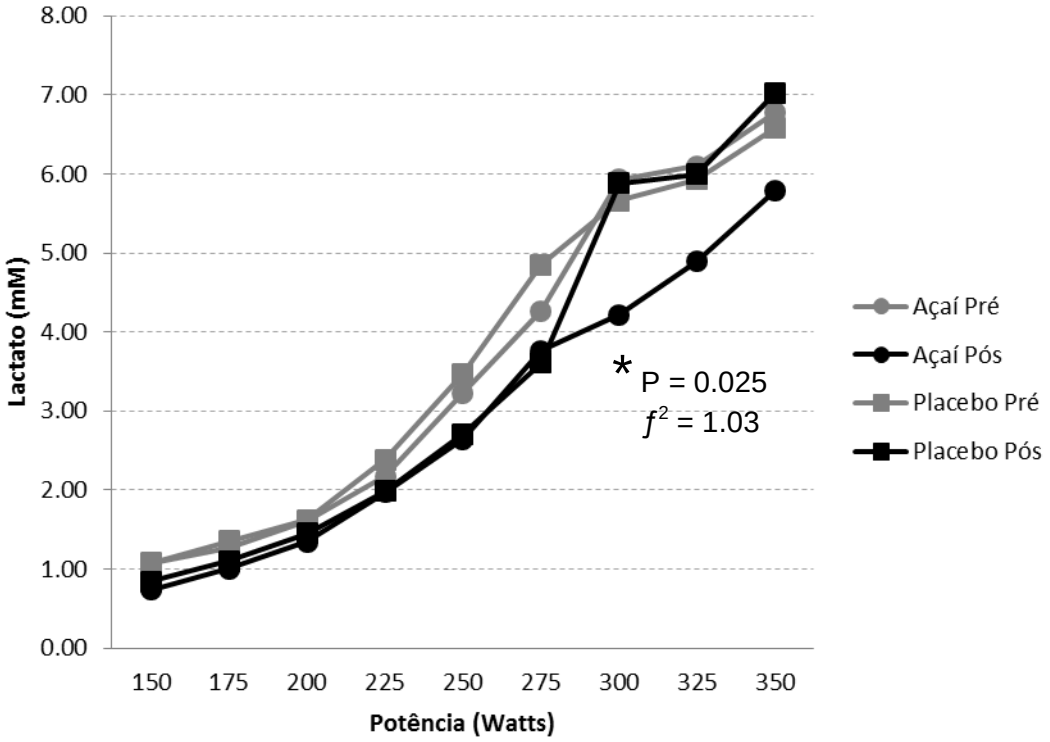

Figura 3. Concentrações de lactato durante o teste incremental em ciclo-ergômetro antes e depois da intervenção. * Diferença estatística pós-açaí vs. pré-açaí e pós-açaí vs. pós-placebo a 300W. f^2: Teste Cohen f^2 effect size da diferença pós-açaí vs. pós-placebo.

Considerações Finais

Ainda existem controvérsias a respeito do uso de suplementos antioxidantes no exercício, pois não está esclarecido se eles aumentam ou atenuam as respostas adaptativas ao treinamento e os possíveis mecanismos subjacentes a essa questão. Porém, nossas observações sustentam a hipótese de que a suplementação com pequenas doses de múltiplos antioxidantes oriundos de alimentos, a exemplo das antocianinas e outros polifenóis presentes na polpa de açaí, é capaz de modular o estado antioxidante e a capacidade aeróbia em atletas ciclistas, em razão das demandas antioxidantes elevadas relativas ao treinamento de resistência.

Referências

1. Yamaguchi KKL, Pereira LFR, Lamarão CV, Lima ES, da Veiga-Junior VF. Amazon açai: chemistry and biological activities: a review. Food Chem. 2015; 179: 137-51.
2. Choi WS, Lee SE, Lee HS, Lee YH, Park BS. Antioxidative activities of methanol extracts of tropical and oriental medicinal plants. Han'guk Nonghwa Hakhoechi. 1998; 41: 556–559.
3. Muñiz-Miret N, Vamos R, Hiraoka M, Montagnini F, Mendelsohn RO. The economic value of managing the acai palm (Euterpe oleracea mart.) in the floodplains of the Amazon estuary, Para, Brazil. Forest Ecol Management. 1996; 87: 163–173.
4. Henderson, A. The Palms of the Amazon. New York: Oxford University Press; 1995.
5. Pompeu DR, Silva EM, Rogez H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of Euterpe oleracea using response surfasse methodology. Biores Technol. 2009; 100: 6076–6082.
6. Sabbe S, Verbek W, Deliza R, Matta V, Van Damme P. Effect of a health claim and personal characteristics on consumer acceptance of fruit juices with different concentrations of ac¸ai (Euterpe oleracea Mart.). Appetite. 2009; 53: 84–92.
7. Brasil. Instrução Normativa nº 12, de 7 de janeiro de 2000. Estabelece o regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).
8. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Despolpamento do açaí [Internet]. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/acai.
9. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Contas Regionais do Brasil 2008 [Internet]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br.

10. CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO [Internet]. Política de garantia de preços mínimos. Disponível em: http://www.conab.gov.br.

11. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Boletim PAM 2017. Prod. Agric. Munic., Rio de Janeiro, v. 44, p. 1-8, 2017. ISSN 0101-3963 © IBGE, 2018.

12. Heinrich M, Dhanji T, Casselman I. Açai (Euterpe oleracea Mart.)—A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. Phytochem Letters. 2011; 4(1): 10–21.

13. Pacheco-Palencia LA, Talcott ST. Chemical stability of açai fruit (Euterpe oleracea Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring andexternally added polyphenolic cofactors in model systems. Food Chem. 2010; 118: 17–25.

14. Rosso VV, Hillbrand S, Montilla EC, Bobbio FO, Winterhalter P, Mercadante AZ. Determination of anthocyanins from acerola (Malpighia emarginata DC.) and açaí (Euterpe oleracea Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. J Food Comp Analysis. 2008; 21: 291–299.

15. Yuyama LKO, Aguiar JPL, Filho DFS, Yuyama K, Varejão MJ, Fávaro DIT, et al. Physicochemical characterization of acai juice of Euterpe precatoria Mart. from different Amazonian ecosystems. Acta Amazônica. 2011; 41: 545–552.

16. Okumura F, Soares MHFB, Cavalheiro ETG. Química Nova. 2004; Vol. 25.

17. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of acai (Euterpe oleracea Mart.). J Agric Food Chem. 2004; 52: 1539–1545.

18. Pacheco-Palencia LA, Duncan CE, Talcott ST. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, Euterpe oleracea and Euterpe precatoria. Food Chem. 2009; 115: 1199-1205.

19. Mertens-Talcott SU, Rios J, Jilma-Stohlawetz P, Pacheco-Palencia LA, Meibohm B, Talcott ST, Derendorf H. (2008). Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich

açai juice and pulp (Euterpe oleracea Mart.) in Human Healthy Volunteers. J Agric Food Chem. 2008; 56(17): 7796–7802.

20. Fang J. Bioavailability of anthocyanins. Drug Metab Rev. 2014; 46(4): 508–520.
21. Ichiyanagi T, Shida Y, Mamunur Rahman M, Sekiya M, Hatano Y, Matsumoto H, et al. Effect of both aglycones and sugar moiety towards phase II metabolism of anthocyanins. Food Chem. 2008; 110: 493–500.
22. Steinert RE, Ditscheid B, Netzel M, Jahreis G. Absorption of black currant anthocyanins by monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells mounted in using type chambers. J Agric Food Chem. 2008; 56: 4995–5001.
23. Yi W, Akoh CC, Fischer J, Krewer G. Absorption of anthocyanins from blueberry extract by Caco-2 human intestinal cell monolayers. J Agric Food Chem. 2006; 54: 5651–5658.
24. Czank C, Cassidy A, Zhang Q, Morrison DJ, Preston T, et al. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a 13C-tracer study. Am J Clin Nutr. 2013; 97: 995–1003.
25. de FerrarsRM, Czank C, Zhang Q, Botting NP, Kroon PA, et al. 2014. The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. Br J Pharmacol. 171:3268–82.
26. Fernandes I, de Freitas V, Reis C, Mateus N. A new approach on the gastric absorption of anthocyanins. Food Funct. 2012; 3: 508-516.
27. Felgines C, Texier O, Besson C, Vitaglione P, Lamaison J-L, Fogliano V, et al. Influence of glucose on cyanidin 3-glucoside absorption in rats. Mol. Nutr Food Res. 2008; 52: 959-964.
28. Celli GB, Ghanem A, Brooks MSL. A theoretical physiologically based pharmacokinetic approach for modeling the fate of anthocyanins in vivo. Critical Rev Food Sci Nutr. 2016; 57(15): 3197–3207.
29. Kamiloglu S, Capanoglu E, Grootaert C, Van Camp J. Anthocyanin absorption and metabolism by human Caco-2 cells: a review. Int J Mol Sci. 2015; 16: 21555–74.

30. Oliveria H, Fernandes I, Br´as NF, Faria A, De Freitas V, et al. Experimental and theoretical data on the mechanism by which red wine anthocyanins are transported through a human MKN-28 gastric cell model. J Agric Food Chem. 2015; 63: 7685–92.

31. Passamonti S, Vrhovsek U, Vanjo A, Mattivi F. The stomach as a site for anthocyanin absorption from food. FEBS Lett. 2003; 554: 210–13.

32. Talavéra S, Felgines C, Texier O, Besson C, Lamaison JL, et al. Anthocyanins are efficiently absorbed in the stomach of anesthetized rats. J Nutr. 2003; 133: 4178–82.

33. Rodriguez-Mateos AM, Vauzour D, Kreuger CG, Shanmuganayagam D, Reed JD, et al. Flavonoids and related compounds, bioavailability, bioactivity and impact on human health: an update. Arch Toxicol. 2014; 88: 1803–53.

34. Cardona JA, Mertens-Talcott SU, Talcott ST. Phospholipids and terpenes modulate Caco-2 transport of açaí anthocyanins. Food Chem. 2015; 175: 267–272.

35. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. Adv Drug Delivery Rev. 2004; 56: 603–618.

36. Warner EF, Zhang Q, Raheem KS, O'Hagan, O'Connell MA, et al. Common phenolic metabolites of flavonoids, but not their unmetabolized precursors, reduce the secretion of vascular cellular adhesion molecules by human endothelial cells. J Nutr. 2016; 146: 465–73.

37. Di Gesso JL, Kerr JS, Zhang Q, Raheem S, Yalamanchili SK, et al. Flavonoid metabolites reduce necrosis factor-αsecretion to a greater extent than their precursor compounds in human monocytes. Mol Nutr Food Res. 2015; 59: 1143–54.

38. Kay CD, Pereira-Caro G, Ludwig IA, Clifford MN, Crozier A. Anthocyanins and Flavanones Are More Bioavailable than Previously Perceived: A Review of Recent Evidence. Ann Rev Food Sci Tech. 2017; 8(1): 155–180.

39. Elkington LJ, Gleeson M, Pyne DB, Callister R, Wood LG. Inflammation and Immune Function: Can Antioxidants Help the Endurance Athlete? In:

Lamprecht M, editor. Antiox Sport Nutr. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis: 2015. Chapter 11. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books.

40. Lucia A, Hoyos J, Chicharro JL. Physiology of Professional Road Cycling. Sports Med. 2001; 31(5): 325–337.
41. Tomasello B, Grasso S, Malfa G, Stella, S, Favetta M, Renis M. Double-Face Activity of Resveratrol in Voluntary Runners: Assessment of DNA Damage by Comet Assay. J Med Food. 2012; 15(5): 441–447.
42. Watson TA, Callister R, Taylor RD, Sibbritt DW, MacDonald-Wilks LK, Garg ML. Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. Med Sci Sports Exerc. 2005; 37(1): 63–71.
43. Knez WL, Jenkins DG, Coombes JK. Oxidative stress in half and full ironman triathletes. Med Sci Sports Exerc. 2007; 39(2): 283–288.
44. Turner JE, Hodges NJ, Bosch JA, Alfred S. Prolonged depletion of antioxidant capacity after ultraendurance exercise. Med Sci Sports Exerc. 2011; 43(9): 1770–1776.
45. Gross M, Baum O, Hoppeler H. Antioxidant supplementation and endurance training: Win or loss? Eur J Sports Sci. 2011; 11(1): 27–32.
46. McAnulty LS, Nieman DC, Dumke CL, Shooter LA, Henson DA, Utter AC, Milne G, McAnulty SR. Effect of blueberry ingestion on natural killer cell counts, oxidative stress, and inflammation prior to and after 2.5 hours of running. Appl Physiol Nutr Metab. 2011; 36: 976–984.
47. Bowtell JL, Sumners DP, Dyer A, Fox P, Mileva KN. Montgomery cherry juice reduces muscle damage caused by intensive strength exercise. Med Sci Sports Exerc. 2011; 43(8): 1544–1551.
48. Sadowska-Krępa E, Kłapcińska B, Podgórski T, Szade B, Tyl K, Hadzik A. Effects of supplementation with acai (Euterpe oleracea Mart.) berry-based juice blend on the blood antioxidant defence capacity and lipid profile in junior hurdlers. A pilot study. Biol. Sport. 2015; 32: 161-168.
49. Riso P, Klimis-Zacas D, Del Bo' C, Martini D, Campolo J, Vendrame S. et al. Effect of a wild blueberry (Vaccinium angustifolium) drink intervention on

markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. Eur J Nutr. 2013; 52: 949–961.

50. Carvalho-Peixoto J, Moura MR, Cunha FA, Lollo PC, Monteiro WD, Carvalho LM, Farinatti P de T. Consumption of açai (Euterpe oleracea Mart.) functional beverage reduces muscle stress and improves effort tolerance in elite athletes: a randomized controlled intervention study. Appl Physiol Nutr Metab. 2015; 40(7): 725-33.
51. Nieman DC, Williams AS, Shanely RA, Jin F, McAnulty SR, Triplett NT, Austin MD, Henson DA. Quercetin's influence on exercise performance and muscle mitochondrial biogenesis. Med Sci Sports Exerc. 2010; 42(2): 338–345.
52. Davis JM, Carlstedt CJ, Chen S, Carmichael MD, Murphy EA. The dietary flavanoid quercetin increases VO_2max and endurance capapcity. Inter J Sports Nutr and Exerc Metab. 2010; 20: 56–62.
53. Ortiz-Franco M, Planells E, Quintero B, Acuña-Castroviejo D, Rusanova I, Escames G, et al. Effect of Melatonin Supplementation on Antioxidant Status and DNA Damage in High Intensity Trained Athletes. Inter J of Sports Med. 2017; 38(14): 1117–1125.
54. Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty LS, Morrow JD, Ahmed A, Heward CB. Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship. Med Sci Sports Exerc. 2004; 36(8): 1328–1335.
55. Mankowski RT, Anton SD, Buford TW, Leeuwenburgh C. Dietary Antioxidants as Modifiers of Physiologic Adaptations to Exercise. Med Sci Sports Exerc. 2015; 47(9): 1857–1868.

Apêndice 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome da pesquisa – "Suplementação de açaí em ciclistas: Efeitos sobre marcadores inflamatórios, oxidativos e capacidade aeróbia".

Profª. Drª. Ellen Cristini de Freitas – Docente responsável; E-mail: ellenfreitas@usp.br

Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre, CEP:14049-907, Ribeirão Preto/SP, Telefone: (16) 3315-0345; telefone pessoal (16) 981560770.

Sara Ivone Barros Morhy Terrazas Souza – Doutoranda responsável pela execução da pesquisa; E-mail: saraterrazas@yahoo.com.br / Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre, CEP:14049-907, Ribeirão Preto/SP, Telefone: (16) 3315-8584; telefone pessoal (16) 996355450.

Leia com bastante atenção as explicações abaixo:

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem o objetivo de analisar os efeitos de 15 dias de suplementação com 400g de polpa de açaí após o treino, sobre os marcadores inflamatórios, oxidativos e capacidade aeróbia em ciclistas. Tem-se observado que o açaí possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, devido seu conteúdo expressivo de flavonoides (antocianinas), e deseja-se verificar se a suplementação com a polpa de açaí é útil para minimizar os processos inflamatórios e oxidativos, maximizar a recuperação após o treino e melhorar a qualidade do treino de ciclistas.

Você não receberá nenhum dinheiro ao participar desta pesquisa. Caso seja necessário, terá o reembolso para eventuais despesas com transporte. Sua participação nesta pesquisa não lhe trará outros gastos. Haverá indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa de acordo com as leis vigentes.

Segue abaixo o detalhamento dos procedimentos a serem realizados com os participantes. Lembramos que sua participação não é obrigatória e sim voluntária. Você participa apenas se tiver interesse e disponibilidade. Durante a pesquisa você poderá desistir a qualquer momento.

Os voluntários serão convidados a submeter-se às seguintes avaliações nas dependências da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto - EEFERP - USP:

1. Será realizada uma avaliação nutricional antes e durante a intervenção e avaliação física por bioimpedância antes do início da intervenção.
2. Serão coletadas amostras de sangue em quatro momentos da pesquisa, para análises dos marcadores inflamatórios, fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), interleucina-6 (IL-6) e Proteína C Reativa (PCR). Além disso, estas amostras de sangue também serão utilizadas para analisar os efeitos da suplementação com açaí sobre a reparação de processos oxidativos no DNA.
3. A coleta de sangue será realizada por uma auxiliar de enfermagem da Unidade de Pesquisa Clinica do Hospital das Clinicas – UPC-HC-FMRP- USP nas dependências da EEFERP - USP.
4. Você será submetido ao teste incremental na bicicleta para avaliar a capacidade aeróbia, que consiste na realização de esforços progressivos até exaustão, iniciando a 150 Watts e aumentando a potência em 25 Watts de 2 em 2 minutos. Ao finalizar cada estágio de 2 minutos haverá intervalos somente para coleta de amostras sanguíneas no lóbulo da orelha. O teste será realizado antes e após os 15 dias de suplementação nas duas diferentes fases da pesquisa. Serão coletadas amostras de 1 ml de sangue do lóbulo da orelha, que equivale a 1/3 da colher de café, para analise da capacidade aeróbia através da análise do lactato.
5. O protocolo terá 2 ciclos de 15 dias de suplementação. Durante o primeiro e o segundo ciclo você fará suplementação com polpa de açaí ou com placebo (bebida controle: produto muito parecido com o alimento em estudo, porém, sem conter os antioxidantes objetos desta pesquisa), de modo que ao final da pesquisa você tenha recebido tanto a suplementação de polpa de açaí como a de placebo (bebida controle). Haverá um intervalo de 30 dias sem suplementação entre o primeiro e o segundo ciclo de 15 dias. Serão coletadas 4 amostras de sangue, a primeira sem suplementação e a segunda após o primeiro ciclo de 15 dias de suplementação. Após a segunda coleta de sangue se seguirão 30 dias de *wash out*. Em seguida será realizada a terceira coleta de sangue antes do segundo ciclo de 15 dias de suplementação. Ao final deste segundo ciclo será realizada a quarta coleta de sangue. Da mesma maneira será

realizado o teste incremental e a coleta de sangue para analises de lactato.

6. Será realizada a suplementação nutricional diária com 400g de açaí ou placebo (bebida controle) após o treino.
7. Recomendamos que você evite uso de outros alimentos à base de açaí durante sua participação nesta pesquisa, a fim de evitar possíveis mascaramentos ou interferências sobre o efeito da polpa de açaí oferecida neste estudo. Recomendamos também não ingerir quaisquer alimentos à base de açaí por um período de sete dias que antecedem as coletas de sangue referentes ao início de cada ciclo de 15 dias de suplementação. Não há risco à saúde associado a esta restrição alimentar, pois não se trata da privação de um nutriente essencial.
8. Como forma de monitorar a utilização do açaí e o consumo do placebo (bebida controle), será realizado contato telefônico aos atletas.
9. Você será informado sobre todos os seus resultados individuais dos testes e exames realizados.
10. O tempo total de sua participação nesta pesquisa será de 75 dias, dos quais 15 correspondem aos períodos de avaliações antes e após os ciclos de suplementação, 30 aos dois ciclos de 15 dias de suplementação com açaí/placebo, e 30 ao intervalo entre os dois ciclos de suplementação (*wash out*). As avaliações nutricional e física durarão cerca de 1 hora. As coletas de sangue venoso durarão cerca de 5 minutos e os testes incrementais cerca de 30 minutos.

Ao participar dessa pesquisa você poderá sentir um pequeno desconforto resultante da coleta de sangue. Para evitar ou reduzir o desconforto, a coleta de sangue será feita por técnicos treinados e habilitados em coleta de sangue.

Os resultados obtidos com a pesquisa serão mostrados em congressos e serão publicados em revistas científicas, mas o seu nome não será divulgado de maneira nenhuma, ninguém vai saber que aqueles resultados são seus, garantindo assim sua privacidade. Seu nome não será divulgado para outras pessoas, de forma que sua identidade será mantida em segredo.

É importante salientar que uma via do presente documento irá ficar com você e uma segunda via será arquivada junto aos documentos do projeto a ser desenvolvido pelos pesquisadores, portanto você deverá efetuar duas assinaturas.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome da pesquisa – "Suplementação de açaí em ciclistas: Efeitos sobre marcadores inflamatórios, oxidativos e capacidade aeróbia".

Você poderá tirar dúvidas e receber esclarecimentos sobre os resultados da pesquisa a qualquer momento com a pesquisadora responsável Profa. Dra. Ellen Cristini de Freitas (16) 3315-0345, (16) 981560770 ou com a doutoranda responsável pela execução da pesquisa, Sara Ivone Barros Morhy Terrazas Souza (16) 3315-8584, (16) 996355450, da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto (EEFERP-USP).

Eu _____, RG _____, Estado Civil_____, Idade _____ anos, Residente na _____, nº _____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____.

Ribeirão Preto, de de 2016.

_____

Participante

Profª Dra Ellen Cristini de Freitas
Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre
CEP: 14049-907 Ribeirão Preto/SP
Telefone: (16) 3315-0345
Email: ellenfreitas@usp.br

Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com:

Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto-USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - EEFERP - USP
Avenida dos Bandeirantes, 3900 – CEP: 14040-907 - Ribeirão Preto - SP
Fones: (16) 3315-0494

e-mail: cep90@usp.br

Homepage: http://www.eeferp.usp.br/

Apêndice 2. Registro Alimentar

Registro Alimentar

Identificação do Voluntário: _____Data: _____

Horário da Refeição	Refeição	Alimentos	Quantidade em Nº	Medida caseira
	Café da Manhã			
	Lanche da manhã			
	Almoço			
	Lanche da Tarde			
	Jantar			
	Ceia			

Apêndice 3. Diário de Treino

DIÁRIO DE TREINO

DATA	HORÁRIO DE INICIO	MODALIDADE	DURAÇÃO	O QUE FOI REALIZADO?	FOSTER

1. Você está sentindo alguma dor? Onde? Especifique

2. Você tem percebido melhora no treinamento?

3. Você está com alguma dificuldade que possa influenciar seu rendimento?

4. Hoje você tomou os 400g de polpa de açaí hoje?

5. Qual suplemento consumiu hoje? Informe a quantidade, dia e horário (pré e pós treino).

Anexo 1. Tabela de Foster

TABELA DE FOSTER

CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
0	REPOUSO
1	MUITO FÁCIL
2	FÁCIL
3	MODERADO
4	POUCO DIFÍCIL
5	DIFÍCIL
6	
7	MUITO DIFÍCIL
8	
9	
10	MÁXIMO