

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Ingestão aguda de *whey protein* e caseína:
efeito sobre metabolismo proteico após
exercício de força**

Bryan Steve Martínez Galán

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

2019

**Ingestão aguda de *whey protein* e caseína:
efeito sobre metabolismo proteico após
exercício de força**

Bryan Steve Martínez Galán

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

2019

M386i

Martínez Galán, Bryan Steve.

Ingestão aguda de whey protein e caseína: efeito sobre metabolismo proteico após exercício de força / Bryan Steve Martínez Galán . – Araraquara: [S.n.], 2019.
93 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 em Ciências Nutricionais.

Orientadora: Ellen Cristini de Freitas.

1. Glucoamilase. 2. Caseína. 3. *Whey protein*. I. Freitas, Ellen Cristini de, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP Campus de Araraquara

CAPES: 33004030055P6
Esta ficha não pode ser modificada

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Ellen Cristini de Freitas
Orientadora

Prof. Dr. Enrico Fuini Puggina

Profa. Dra. Carla Barbosa Nonino

Prof. Dr. Julio Sergio Marchini

Profa. Dra. Juliana Cristina Bassan

Dedicatória

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, pela oportunidade de experimentar, aprender, errar, mas não desistir. À vida pelos altos e baixos que fazem todo acontecer aos meus irmãos Julian, Laura e Diego, por auxiliarem sempre e apoiarem nas minhas decisões, pelo tempo, paciência e carinho, valeu pela torcida desde longe!

A minha esposa Simone Carvalho pelo apoio incondicional e suporte científico e prático.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Ellen Cristini de Freitas, pela paciência, pela sabedoria transmitida e pela confiança depositada durante este período, parceria incondicional e assegurada.

Aos professores e funcionários da FCFAR-UNESP e EEFERP-USP, pelo auxílio e atenção dispensados.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia do Exercício e Metabolismo (LAFEM-EEFERP) Flavia Giolo, Sara Terrazas, Gabriela Batitucci, Priscila Carvalho, Maicon Chiga, Tales Vieira, Simone Sakagute, Milena carvalho, Monica Meirelles, Gilberto Padovan, pelo conhecimento compartilhado, parceria e boas energias e disposição no trabalho em equipe.

Aos integrantes do Grupo de Estudo em Ciências Fisiológicas e Exercício por compartilhar momentos acadêmicos e lazer como bons amigos.

Aos atletas voluntários, que doaram seu tempo e material biológico, e por sua dedicação em cumprir os protocolos da pesquisa.

Agradeço ICETEX pelo financiamento durante o período de dois anos do doutorado, sem esse apoio teria sido quase impossível concluir com os objetivos planejados.

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.

Aos meus amigos pessoais e familiares pelo apoio ofertado e que foram de grande ajuda em momentos difíceis.

Muchas Gracias!

Epígrafe

“... Pero mi historia es difícil, no voy a hablarles de un hombre comun... es sobre un ser de la nada. Alguien quizás que buscaba la vida o buscaba la muerte, eso nunca se sabe, quizás buscando siluetas o algo semejante que fuera adorable, querible, amable... y soy feliz porque soy gigante...”

Silvio Rodríguez

Resumo

Objetivo: Comparar os efeitos da suplementação de WP e CAS em diferentes proporções sobre o tempo de permanência de aminoácidos e metabólitos finais do metabolismo proteico (nitrogênio urinário, creatinina e ureia). **Metodologia:** Foi realizado no estudo *crossover*, agudo, utilizando-se a suplementação em diferentes proporções de CAS ou WP, no qual todos os participantes utilizaram as diferentes preparações de suplementos proteicos, conforme sorteio aleatório. 1) WP, 2) CAS, 3) WP 80% e CAS 20% (WP+CAS), 4) CAS 80% e WP 20% (CAS+WP), 5) Placebo (PLA) após uma sessão de exercício de musculação. Foram coletadas amostras de sangue para análises de aminoácidos plasmáticos, leucina, isoleucina e valina, assim como os metabólitos finais do metabolismo proteico, creatinina, ureia e nitrogênio urinário. **Resultados:** Observaram-se diferenças significativas quando comparadas as concentrações de creatinina entre CAS – CAS/WP ($p=0,05$); CAS - WP ($p=0,03$) e ureia entre CAS – CAS/WP ($p=0,05$); CAS – WP ($p=0,007$) respectivamente, assim como diferenças significativas nas concentrações de valina, ($p=0,00$); isoleucina, ($p=0,00$) e leucina, ($p=0,00$) entre PLA e os suplementos de proteína assim como quando comparado as concentrações de isoleucina, ($p=0,01$) entre WP/CAS e CAS. Quando aplicado o Teste de 1RM e PSE de cada sessão, observou-se um comportamento diferente entre os diferentes suplementos e dor muscular tardia. **Conclusão:** Conclui-se que a suplementação de proteína, permite alterar as concentrações dos aminoácidos, o que manteve os níveis plasmáticos de aminoácidos após exercício de musculação de alta intensidade, e dependendo da situação o possível reaproveitamento dos aminoácidos como substrato energético. O protocolo de jejum e exercício de alta intensidade provocou estresse metabólico aumentando a excreção de nitrogênio urinário. A suplementação de proteína promoveu o balanço nitrogenado positivo sendo um estimulante da síntese proteica muscular atuando como um estímulo efetivo na diminuição da percepção de dor muscular. Plasmáticos após exercício de musculação de alta intensidade

Palavras-chave: Suplementação; caseína; *whey protein*.

Abstract

Objective: To compare the effects of WP and CAS supplementation in different proportions on the residence time of amino acids and final metabolites of protein metabolism (urinary nitrogen, creatinine and urea).

Methodology: It was performed in the acute crossover study, using supplementation in different proportions of CAS or WP, in which all participants used the different preparations of protein supplements, as randomized. 1) WP, 2) CAS, 3) WP 80% and CAS 20% (WP + CAS), 4) CAS 80% and WP 20% (CAS + WP), 5) Placebo (PLA) after an exercise session. bodybuilding. Blood samples were collected for plasma amino acid, leucine, isoleucine and valine analyzes, as well as the final metabolites of protein metabolism, creatinine, urea and urinary nitrogen. **Results:** Significant differences were observed when creatinine concentrations were compared between CAS - CAS / WP ($p = 0.05$); CAS - WP ($p = 0.03$) and urea between CAS - CAS / WP ($p = 0.05$); CAS - WP ($p = 0.007$) respectively, as well as significant differences in valine concentrations, ($p = 0.00$); isoleucine, ($p = 0.00$) and leucine, ($p = 0.00$) between PLA and protein supplements as compared to isoleucine concentrations ($p = 0.01$) between WP / CAS and CAS. When applying the 1RM and PSE Test of each session, a different behavior was observed between the different supplements and late muscle pain. **Conclusion:** It was concluded that protein supplementation allows altering amino acid concentrations, which maintained plasma amino acid levels after high intensity exercise, and depending on the situation the possible reuse of amino acids as energy substrate. The fasting and high intensity exercise protocol caused metabolic stress increasing urinary nitrogen excretion. Protein supplementation promoted positive nitrogen balance and was a stimulant of muscle protein synthesis acting as an effective stimulus in decreasing Delayed Onset Muscle Soreness (DOMS).

Keywords: Supplementation; casein; whey protein.

Lista de abreviaturas

AACR	Aminoácidos de cadeia Ramificada
WP	Whey Protein
CAS	Caseína
WP+CAS	Whey Protein + Caseína
CAS+WP	Caseína + Whey Protein
1RM	1 Repetição Máxima
PSE	Percepção subjetiva ao Esforço
PRÉ	Antes da suplementação
PÓS	Após suplementação
mL	Mililitros
µL	Micro-litros
mM	Mili-molar
SPM	Síntese Proteica Muscular
PDMT	Percepção de dor muscular tardia
BN	Balanco Nitrogenado

Lista de Figuras

Figura 1 . Taxa de síntese proteica com diferentes quantidades de proteína ingerida

Figura 1 (Capítulo I). BCAA on plasma concentrations using venous and capillary sampling by HPLC.

Figura 2 (Capítulo I) Bland-Altman plot between capillary sampling versus venous sampling.

Figura 1 (Capítulo II) Protocolo usado durante o período de experimento, 1RM: 1 repetição máxima.

Figura 2 (Capítulo II) Percepção de Dor Muscular Tardia (PDMT) após 24h, 48h e 72h após o protocolo de exercício

Figura 3 Concentração no plasma dos aminoácidos de cadeia ramificada (Valina, Isoleucina e Leucina).

Lista de Tabelas

Tabela 1 Nutrientes presentes no Leite materno, formula para bebês e leite de vaca (a cada 100ml)

Tabela 1 (Capítulo II) Registro Alimentar de 24 horas PRÉ e PÓS suplementação e Marcadores do Metabolismo proteico.

Tabela 2 (Capítulo II) Desempenho durante cada sessão de exercício.

Sumario

Resumo	7
Abstract	8
Introdução.....	13
Objetivos.....	22
Capítulo 1	23
Venous versus capillary sampling for BCAA assay for fasting condition	23
Introduction.....	25
Methods.....	27
Results.....	30
Discussion	30
Aknowledgments	32
Author Contributions	32
Figures.....	33
.....	34
References	35
Capítulo 2	38
Uso De Whey Protein E Caseína: Efeito Sobre Metabolismo Proteico Após Exercício De Força.....	38
Abstract	41
1. Introdução	43
2. Metodologia	47
2.1 Voluntários.....	47
2.2 Delineamento experimental	47
2.3 Aspectos éticos	49
2.4 Protocolo de suplementação	50
2.5 Protocolo de exercício.....	50
2.6 Percepção de Dor Muscular Tardia.....	51
2.7 Avaliação Nutricional.....	51
3. Análises Bioquímicas.....	52
3.1.1 Dosagem de aminoácidos	52
3.1.2 Coleta de urina de 24 H	54
3.2 Dosagem de Marcadores de Metabolismo Proteico	54
3.2.1 Nitrogênio Urinário	54

3.2.2 Creatinina e Uréia	55
4. Análise Estatística	55
5. Resultados	55
6. Discussão.....	58
7. Conclusão	62
Tabelas e Figuras	70
Considerações Finais	74
Referências	75
Anexo 1. Cópia da aprovação do trabalho no Comitê de Ética em Pesquisa	84
Apêndice 1- Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	87
Apêndice 2- Modelo da Escala Visual de Percepção de dor.	90
Apêndice 3- Modelo de Diário Alimentar	91

Introdução

Atletas, exercício resistido e o consumo de proteínas.

Nos processos de anabolismo e catabolismo, os tecidos do corpo, incluindo o músculo esquelético, são constantemente remodelados através dos processos contínuos e simultâneos de síntese e quebra de proteínas denominadas rotatividade “*turnover*”. Essa rotatividade constante funciona para renovação das proteínas antigas e / ou danificadas e síntese de novas proteínas para ajudar a manter a massa e a qualidade das proteínas(1). É importante ressaltar que a diferença entre síntese e degradação determina o balanço proteico de um tecido, por exemplo, o músculo e, finalmente, se está ganhando ou perdendo massa. Para esse fim, existem evidências que o exercício resistido aumenta a rotatividade de proteínas musculares por até 48h em jejum(2). O treinamento de resistido produz uma série de benefícios para a saúde, bem como o potencial de promover adaptações musculares de força, tamanho, potência e resistência(3). Têm se observado que o consumo de proteínas seguido da realização de séries de exercício de força aumenta o potencial de hipertrofia muscular, gerando um grau maior de força, bem como um aumento pronunciado da massa muscular(4) e o processo de síntese e degradação proteica acontece de maneira constante em resposta a associação alimentar e exercício de força(5).

Estudos demonstraram que devido à maior estimulação da síntese de proteínas musculares em comparação à quebra, o balanço líquido muscular é melhorado, mas, na ausência de aminoácidos exógenos, permanece um

balanço líquido negativo(2, 6). Unicamente com uma fonte exógena de aminoácidos o balanço líquido muscular se torna positivo devido principalmente a melhora da síntese proteica muscular(7). Sabendo isso, é importante destacar que, o comportamento sinérgico entre o exercício resistido e a ingesta de aminoácidos permite o ambiente necessário para o anabolismo muscular (hipertrofia muscular) o qual é característico do treinamento resistido(1).

O consumo de proteínas é capaz de estimular a síntese proteica, constituindo-se como um excelente estímulo anabólico, mas essa capacidade de síntese depende de fatores como composição dos aminoácidos, quantidade de proteína ingerida e fatores metabólicos(8).

Têm se observado que o consumo de proteínas seguido da realização de séries de exercício de força aumenta o potencial de hipertrofia muscular, gerando um grau maior de força, bem como um aumento pronunciado da massa muscular(4). O processo de síntese e degradação proteica acontece de maneira constante em resposta a associação alimentar e exercício de força(5).

Quanto ao consumo proteico, faz-se necessário que haja um consumo adequado, para adultos saudáveis são de 0,8 g/kg/dia(9), para exercícios de resistência deve-se ingerir de 1,4 – 1,7 g/kg/dia dependendo da intensidade e duração do exercício(10), e as recomendações para exercícios de força e potência são de 1,6 a 2,0 g/kg/dia, considerando-se que as necessidades proteicas de atletas profissionais são duas ou três vezes maiores que um indivíduo não atleta(11) pois, existem evidências na

literatura que mesmo com a presença do exercício o consumo de proteínas alimentares em excesso não irá ocasionar um efeito aditivo referente ao ganho da massa muscular(12, 13). Em contrapartida, quando ocorre o consumo insuficiente de proteínas o corpo poderá apresentar níveis insuficientes de aminoácidos circulantes, consequentemente alterando o processo anabólico, podendo apresentar efeitos secundários negativos como perda de massa muscular, assim como alteração do processo de recuperação tardia após o exercício(6, 13, 14). Portanto, havendo o intuito de incremento muscular é fundamental que o consumo alimentar proteico seja o suficiente para resultar num balanço nitrogenado positivo e consequente hipertrofia muscular(13).

De acordo com Morton et al.(15) o índice de síntese de proteínas musculares tem um limite e o consumo elevado de proteínas não garante uma síntese proteica com o excedente, apresentando uma saturação com relação dose – resposta. Como observado na Figura 1, dada a capacidade de induzir um platô na síntese de proteínas musculares, 20 g de proteína de alta qualidade e de alto valor biológico por conter os aminoácidos essenciais (AE)(16), presentes (por exemplo, na proteína de ovo ou soro de leite) representa uma "ideal" ou absoluta ingesta para melhorar eficientemente a remodelação muscular após exercícios resistidos em adultos jovens e ser precursores imediatos da Síntese de Proteína Muscular (SPM)(1).

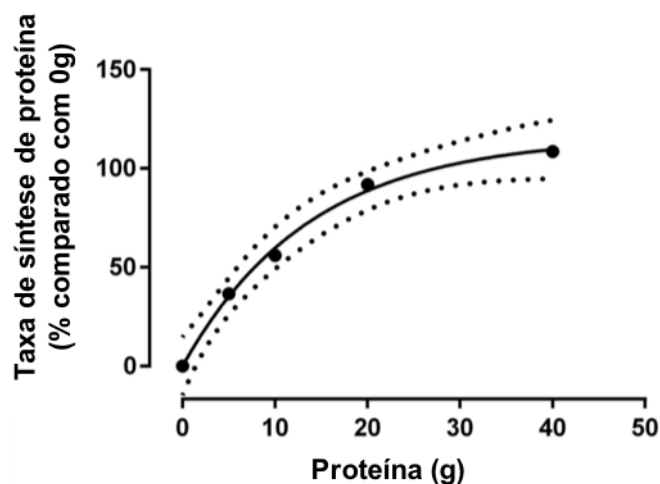


Figura 1. Taxa de síntese proteica com diferentes quantidades de proteína ingerida (Adaptado de Moore 2019).

O anabolismo proteico corporal pode ser influenciado de maneiras diferentes; relacionado ao consumo de proteínas, fatores como velocidade de absorção, respostas hormonais, efeitos antioxidantes entre outros, podem ser alterados dependendo do tipo de proteína consumida(11, 17, 18). Observam-se na literatura diversas fontes alimentares de proteína como soro do leite, caseína, ovo e soja, cada uma com características diferentes como mencionado anteriormente. No esporte, as proteínas mais usadas pelos atletas são o soro do leite e a caseína(19).

Esses dois substratos derivados do leite apresentam características químicas distintas, maior biodisponibilidade de aminoácidos e tempo de absorção dos nutrientes é diferente(10), melhorando a capacidade de recuperação do organismo e aumento da massa magra em comparação com as demais fontes de proteína usadas pelos atletas(20, 21). O *Whey Protein*

(WP) é uma proteína do soro do leite, é solúvel em água, obtendo o nome de *fast protein*. Composta por uma mistura de proteínas (como beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbumina, imunoglobulinas, albumina do soro bovino), oferece diferentes funções como protetoras, digestivas e de rápida absorção, liberação de aminoácidos, antimicrobiana, entre outras(22); se caracterizando como uma proteína de alto valor biológico e alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada(11, 23).

A caseína (CAS) é classificada em quatro subgrupos (caseína A, B, K e Y) que constituem uma família de proteínas com funções diferentes, especificamente a absorção lenta e prolongada, criando algumas capas de caseína no estômago, sendo conhecida como *slow protein*. É apresentada principalmente no estado de partículas coloidais (micelas) a qual é constituída por 92% de proteínas e 8% de sais inorgânicos representando entorno do 70-80% das proteínas presentes no leite bovino(24-26).

Com isso, tem se observado na literatura que essa diferença entre proteínas do soro do leite e caseína pode interferir na resposta final ao ganho de massa muscular(11, 19, 27, 28). Quando se compara caseína intacta (que é liberada lentamente do estômago) e WP (que é esvaziado rapidamente do estômago), o WP produz um aumento mais rápido e transitório na concentração de aminoácidos no plasma, enquanto a caseína resulta em um aumento mais lento, porém mais prolongado, nas concentrações plasmáticas de aminoácidos(29). As diferentes respostas dos aminoácidos após consumir caseína ou whey protein, individuais ou combinados altera a síntese proteica e a quebra de proteínas, sabendose

que a síntese proteica é estimulada entorno de 68% a mais após o consumo de whey protein e quando consumida caseína a quebra de proteínas é entorno de -30% a menos comparada quando consumido whey protein(30, 31).

Exercício Resistido ou Musculação

O exercício resistido é qualquer forma de exercício executado em contra de uma resistência, fazendo que os músculos se contraíam, além é considerado a principal forma de exercício que promove o ganho de força, hipertrofia muscular e densidade óssea(32). A prática ou execução de exercícios resistidos de alta intensidade provoca microlesões a nível miofibrilar o que dará como resultado o aumento da seção transversa do musculo esquelético, o que pode comprometer temporariamente o desempenho do praticante(33). Sabendo que o exercício resistido provoca estresse metabólico, capaz de danificar o musculo exercitado, células satélite são estimuladas a recompor as microlesões teciduais dando origem a um processo de síntese de proteínas(34, 35). Além das microlesões, ocorridas a um nível miofibrilar, acontecem eventos mais notórios como a dor muscular; a qual pode atingir o pico de dor entre 24 a 48 horas após o exercício e o inchaço tornar-se pronunciado vários dias após o estímulo, a avaliação da percepção de dor muscular tardia (*Delayed Onset Muscle Soreness* - DOMS) pode se associar e atribuir ao processo de regeneração muscular(27, 36-38). Alguns estudos descrevem a importância do uso de substâncias ergogênicas nutricionais com o intuito de aperfeiçoar os

resultados obtidos por meio do treinamento de força (28, 39), assim como melhora na recuperação, estímulo da síntese de proteínas e diminuição da degradação muscular após exercício resistido quando consumidas fontes de proteína proveniente do; soro do leite, caseína, soja, ovo e aminoácidos de cadeia ramificada(40-42), de forma similar observa-se redução dos processos de inflamação e estresse oxidativo pós-exercício(43). Na revisão sistemática de Morton et al.(15) mostraram o efeito positivo do consumo de proteínas sobre o exercício de musculação e ganho de massa muscular, sendo estimulada em maior proporção em indivíduos treinados mantendo-se balanceada com o consumo de ~1,6g proteína/kg/dia mostrando ser suficiente e necessária para otimizar as adaptações do exercício de musculação, sabendo que o exercício resistido pode ser considerado como precursor do processo de anabolismo muscular e ressíntese de proteínas.

Leite materno e seu valor biológico

O leite materno é uma proteína de alto valor biológico, e é projetado pela natureza para estimular e apoiar o crescimento de humanos ou animais (44), pois contém milhares de moléculas bioativas distintas que protegem o ser humano no início da vida contra a infecção, inflamação e contribuem para a maturação imunológica, desenvolvimento de órgãos, e microbiota intestinal saudável (45).

Os principais componentes presentes no leite são; água, proteínas, carboidratos, gorduras, minerais e vitaminas assim como hormônios, enzimas entre outros (46). Do ponto de vista nutricional, a infância é um

período muito vulnerável, pois é o único período em que um único alimento é a única fonte de nutrição para maturação e desenvolvimento de seus órgãos, dependendo das necessidades e fases de crescimento, as características físico-químicas dos diferentes tipos de leite variam por exemplo em relação a proporção de soro de leite e caseínas(47)

Os diferentes tipos de leite são usados normalmente na decorrência de não existir a possibilidade ao leite materno, pois sabe-se que o leite materno apresenta nutrientes ideais, assim como outros fatores que favorecem ao desenvolvimento, fórmulas infantis foram criadas de acordo com os fatores nutricionais próximos do leite materno e assim auxiliar na ausência dos mesmos (48). O leite de Vaca e fórmulas infantis apresentam características similares porém não idênticas ao leite materno que podem estar associadas com o mecanismo do metabolismo proteico, algumas das características do leite materno, fórmula para bebês e o leite de vaca estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Nutrientes presentes no Leite materno, fórmula para bebês e leite de vaca (a cada 100ml)

	Leite Materno	Fórmula para bebês	Leite de vaca
Água(%)	88	-	88
Energia (Kcal)	65 - 70	67	65
Proteína (g)	0,9	1,2 - 1,8	3,4
Carboidratos (g)	6,7	7 - 8	4,4
Oligosacarídeos (g)	1,3	0	0
Gorduras (g)	3,5	4	3,5
Cálcio (mg)	20 - 25	42	116
Fósforo (mg)	12 - 14	21	93
Sódio (mg)	12 - 25	16	45
Potássio	40 - 55	55	144
Ferro (mg)	0,03 - 0,09	0,4 - 0,7	0,09
Zinco (mg)	0,1 - 0,3	0,4	0,42
Vitamina A (µg)	30 - 60	50	29
Vitamina C (µg)	10	7 - 9	1,2
Vitamina D (µg)	0,03	1	0,1
Vitamina K (µg)	0,2 - 0,5	2,8	1,6
Ácido Fólico (µg)	80 - 140	6,5	11

Adaptado de Michaelsen et al. (46).

Além do descrito anteriormente, a relação entre as proteínas de soro de leite e caseína são diferentes, apresentando uma proporção de ~20% de soro e ~80% de caseína no leite de vaca e umas proporções entre 60 – 70% de soro de leite e 30 – 40% de caseína no leite materno, isso proporciona um aumento na biodisponibilidade e um esvaziamento gástrico mais rápido o que poderia resultar em maior aproveitamento dos aminoácidos essenciais estimulando a SPM pelo conteúdo de soro de leite e diminuição do processo de degradação proteica muscular DPM sendo estimulada pelas caseínas(45). Além da proteína de alta qualidade que contém todos os aminoácidos essenciais, muitos outros nutrientes do leite podem estar

relacionados ao crescimento (tabela 1) (46, 49) como cálcio, magnésio e fósforo, vitaminas ou combinações destas (50).

Tendo em vista a interação direta entre exercício resistido, ingestão proteica, incidência no anabolismo muscular e considerando os efeitos positivos da suplementação proteica, acredita-se que estudar um suplemento alimentar com uma proporção proteica similar ao leite materno poderá ocasionar benefícios referentes ao metabolismo proteico e recuperação muscular em indivíduos fisicamente ativos.

Objetivos Geral

O presente estudo visa avaliar os efeitos da suplementação com misturas de proteína do soro de leite e caseína sobre o tempo de permanência dos aminoácidos e metabólitos finais do metabolismo proteico em indivíduos fisicamente ativos.

Objetivos Específicos

- Avaliar níveis plasmáticos de leucina, isoleucina e valina pré e após diferentes suplementações contendo diferentes proporções de proteína de soro de leite e caseína;
- Quantificar os metabólitos finais do metabolismo proteico: creatinina, ureia e nitrogênio urinário.

Capítulo 1

Venous versus capillary sampling for BCAA assay for fasting condition

Bryan S. M. Galan¹

Gilberto J. Padovan²

Monica Silva de Souza Meirelles⁴

Peter Watt³

Ellen C de Freitas^{1,4}

¹ Department of Food and Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, State University of Sao Paulo– FCFAR/UNESP, Brazil.

² Mass Spectrometry Laboratory, Medical and Clinical Department of Medicine School, University of Sao Paulo- USP.

³ Environmental Extremes Laboratory, University of Brighton, Eastbourne, UK.

⁴ School of Physical Education and Sports of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo (EEFERP-USP), Sao Paulo, Brazil

Background: Blood sampling during an experiment for research purposes are common, invasive processes where needles are used for punctures. Collection of blood allows for measurement and interpretation of metabolites, hormones and physiological events going on at rest, during exercise, starvation, feeding or during pathologies. The use of capillary sampling seems to be less invasive, rapid and effective, serving as an alternative strategy for analysis of different biochemical compounds present in the blood plasma. For plasma amino acids determination, the use of capillary puncture has been little explored. **Objective:** The aim in this study was to determine whether capillary blood samples represent or not significant differences in the concentration of branched-chain plasma amino acids compared to blood samples taken by venous puncture. **Methods:** Eighteen men and women between 20 and 30 years old participated. Samples of capillary blood were collected from, earlobe and arm venous puncture in the morning after completing 10h of fasting. **Results:** The results of our study demonstrate that capillary sampling and venous puncture to determine the plasma concentration of BCAA do not show significant differences between the sampling method between valine ($p = 0.989$), isoleucine ($p = 0.220$) and leucine ($p = 0.170$). **Conclusions:** Our results demonstrated that capillary sampling for the branched-chain amino acid assay could be considered an alternative to determine changes in plasma amino acid concentration using HPLC and a less invasive way to collect, analyze and discuss the association with protein metabolism.

Key words: Amino acids; fasting; plasma sampling; capillary; venous; HPLC.

Introduction

Biochemical and hematological parameters are fundamental and of great support in the evaluation of thresholds of physical stress, bioavailability of individual nutrients in athletes (51), such evaluations require frequent and successive blood samples that are usually performed by venous puncture resulting in stress for some people (52).

It is known that capillary blood samples collected from the lobe of the ear are commonly used to determine different compounds such as (e.g., glucose, potassium, phosphorus, sodium, bilirubin, lactate) in the health area (53-55).

The compound of the fluid obtained by skin puncture is a mixture of blood from, capillaries, arterioles, venular and probably intracellular fluid (56, 57).

Capillary puncture instead of venous puncture can demonstrate a simpler and less invasive method when it comes to collecting blood samples, which requires low cost materials, potentially increasing the number of samples and a minimum training in the collection technique (52, 53).

The effectiveness of the capillary puncture technique is validated with parameters similar to venous puncture, it is necessary that the blood variables of interest are not affected by the sampling technique used (57). Some studies validated capillary puncture versus venous puncture on biochemical markers (eg, creatine kinase, creatinine, uric acid) and hematological parameters (eg, total count of leukocytes and erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, hemoglobin, corpuscular volume) in athletes (52,

53), glucose (58), growth hormone in cyclists (59) and clinical-chemical substances in healthy adult volunteers of both sexes (eg, potassium, lactate dehydrogenase, bilirubin (57, 58).

Because their participation is related to protein synthesis, plasma concentrations of BCAA has been studied the bioavailability of these amino acids as signaling molecules after protein supplementation and resistance exercise (60, 61).

Specifically, protein from different dietary supplements including whey, casein, soy, egg and branched-chain amino acids (BCAA) demonstrate improved post-exercise recovery, additional muscle protein synthesis, and decreased muscle degradation (40-42). In a similar way, a reduction of the post-exercise oxidative stress and inflammation processes was observed (43).

However, small capillary blood samples can be an alternative as a simple and reliable tool for measuring the concentration of plasma amino acids compared to venous puncture in response to high intensity resistance exercise and protein supplementation is poorly understood. The capillary puncture is proposed as a useful strategy for the quantification of plasma amino acids, knowing that the capillary blood extraction is easier with a slight disturbance of the participant. Therefore, our objective was to determine the plasma BCAA concentration by collecting capillary blood against venous blood.

Methods

Eighteen healthy men and women between 20 and 30 years old were invited to participate in this investigation. The study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Physical Education and Sport of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, CAAE number 64743116.5.0000.5659 and was according to the Helsinki Declaration. All volunteers gave written informed consent and agreed to voluntarily participate in the study. None of the participants smoked or were taking any type of medication. An acute study was performed testing venous blood samples and capillary blood samples.

For all blood collections volunteers were informed to attend fasting in the Laboratory of Exercise Physiology and Metabolism - LAFEM of the School of Physical Education and Sports of Ribeirao Preto of the University of Sao Paulo (EEFERP-USP).

Venous blood sampling was collected using 4mL heparinized vacutainer® tubes at antecubital vein puncture. Capillary blood was collected from ear lobe after it was cleaned with ethyl alcohol 70%. A lancet device, the Accu-check Softclix Pro, was used to the proper depth of penetration for blood collection, and the first drop was discarded. The puncture area was gently pressured without repetitive movements to allow free blood flow into the collecting tube. A total of 200µl of blood was collected using Microvette Sarstedt 200®. Venous and capillary blood sampling was performed at the same time for two different people and were kept refrigerated at 4°C until the end of each trial and later centrifugated at 3200rpm (1620 g for venous and

970 g for capillary) for 7 minutes at 4°C. Plasma was separated in Eppendorf tubes and stored at -80°C for later analysis.

Plasma amino acid analysis were performed by the qualitative and quantitative methodology using Shimadzu® high pressure liquid chromatography (HPLC) model LC 10AD, consisting of 2 continuous flow pumps for the elution gradient of the mobile phases. Phase A was a 40 mmol / L sodium phosphate solution, pH 6.93 containing 20ml / L methanol (MEOH), 20ml / L acetonitrile (ACN), 20ml / L tetrahydrofuran (THF), and phase B, a solution of 70% methanol, with 10 mL of phase A, all of them with a degree for chromatography. The equipment has a module (model CBM 10A) responsible for the proportion (%) between the solvents or phases according to the pre-established schedule. The flow used was 0.75 ml / minute, at temperature of $38\pm 1^{\circ}\text{C}$. The ODS column used to separate the amino acids was the ACE EXL V17-1586, from Scotland, 150mm length x 4.6mm internal diameter and 5 μm size particle.

Blood samples were collected, centrifuged and the supernatants were removed. Samples of 20 μL of plasma were added with 200 μL of methanol and placed in 1.5 mL tubes, which were vortexed for 30 seconds and then centrifuged at the Jouan Refrigerated Centrifuge Model MR1812 USA, for 10 minutes, at 1800g. The supernatant was transferred to another 1,5mL tube and the methanol evaporated in the Savant Speed-Vac (model AES 2010, USA) for 25 minutes. After the total evaporation of the methanol, the dry plasma was dissolved with 200 μL of phase A solution and vortexed for 30 seconds and was filtered through a 0.45 μm membrane. So 40 μL of each

sample as well as the standard solution were taken, and were placed in tubes suitable for analysis and then these tubes were placed in the sampler unit (Sil 10A) with capacity for 79 tubes for the analysis. In the sampler there was a tube with the internal standard (carboxymethyl cysteine) and an amber bottle with the orthophthaldialdehyde reagent solution, with a low helium flow (OPA; Sigma Company USA). This reagent was prepared with 10mg of orthophthaldialdehyde, 250mL of pure methanol, 2.25mL of pure water pH 10.4(62). The autosampler got 10 μ L of the internal standard and added to each tube containing the standard or samples for analysis, and in sequence 40 μ L of the OPA reagent for each tube. The mixtures of these solutions were performed by the equipment, which was programmed to wait 1 minute for the reaction to take place, a process known as pre-column derivatization. Then 40 μ L of the reaction product were injected into the C18 silica column and the amino acids separated according to molecular weight and polarity and detected by the Shimadzu fluorescence detector model RF20A in 365 nm excitation and 450 nm emission(62, 63).

Statistics Analysis

Data are reported as mean $\pm$ SD. Student's T test was used to determine possible differences between branched-chain amino acid concentration using venous versus capillary sampling. For the statistical significant difference the level of 5% of significance was considered acceptable.

Results

Fig 1. Plasma BCAA concentrations determined after 10h fasting using the two different sampling techniques.

Fig. 2 Bland-Altman plot between capillary sampling versus venous sampling. MD: Mean Diff; UL: Upper Limit; LL: Lower Limit. N=18

Discussion

The results of our study demonstrate that capillary sampling may be considered an alternative to venipuncture to determine BCAA plasma concentration for fasting condition. The Bland Altman plot quantifies the bias and range of agreement and indicate no differences between the mean differences of capillary vs venous sampling (fig. 2). For valine ($p=0.989$); isoleucine (0.220) and leucine ($p=0.170$). These data indicate variability among individuals, which we can confirm as a heterogeneous group. It is important to clarify that the acceptable limits for the bland altman data must be defined a priori, depending on the clinical need, biological considerations or other objectives (64). Similar studies observed similar concentrations, showing variations in some amino acids such as taurine, analyzed using venous and capillary sampling, where it is presumed that these variations in concentrations could be caused by feeding formulas for infants enriched with taurine (65). That confirms the influence of food on the plasma concentrations of amino acids. The amino acids concentration has been used by sports and nutrition scientists as a method to monitor the bioavailability of

amino acids in plasma and associated with protein degradation (10). When evaluating blood sampling methods between venous and capillary blood, it is important to highlight that capillary blood sampling to determine the concentration of BCAA in blood plasma may present some advantages over traditional venous blood sampling. Some research as De Oliveira et al. (3) Abdulrazzaq and Ibrahim (66) characterized capillary sampling as a less invasive and simple technique, which allows a greater number of samples without disturbing the participants' routine, being a practical method and with cost reduction.

Therefore, these results represent importance when investigating populations with certain concerns about the use of invasive techniques in venous sampling during exercise, in children, pregnant women, disabled people and elite athletes (59).

Additionally, capillary sampling reduces certain concerns associated with ethical aspects related to infection, bruises that could limit the participant in the daily execution of activities, training, when it comes to high performance athletes (9), as well as ethical concerns associated with specific training in venous blood sampling technique and its difficult access to that sampling training.

Therefore, we believe that comparing venous sites against capillaries with concordance and reliability measurements is important, novel and it may hold a less invasive and more acceptable way to get samples that are more utility for understanding what's going on easier and faster. More studies are needed controlling factors that can influence the concentration of amino

acids, such as food, nitrogen balance, physical activity level, sex; to confirm this hypothesis and validate that data.

Aknowledgments

The authors acknowledge the participants for the collaboration.

The authors report no conflicts of interest associated with this manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Bryan Steve Martinez Galan

Data curation: Bryan Steve Martinez Galan

Investigation: Bryan Steve Martinez Galan

Methodology: Bryan Steve Martinez Galan, Gilberto Padovan, Monica Silva de Souza Meirelles.

Project administration: Peter Watt, Ellen Cristini de Freitas.

Supervision: Peter Watt, Ellen Cristini de Freitas.

Writing - original draft: Bryan Steve Martinez Galan, Gilberto Padovan, Peter Watt, Ellen Cristini de Freitas

Writing - review & editing: Peter Watt, Ellen Cristini de Freitas

Funding acquisition: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001); Processo FAPESP N°2017/ 10080-2 e 2018/19107-3, ICETEX.

Figures

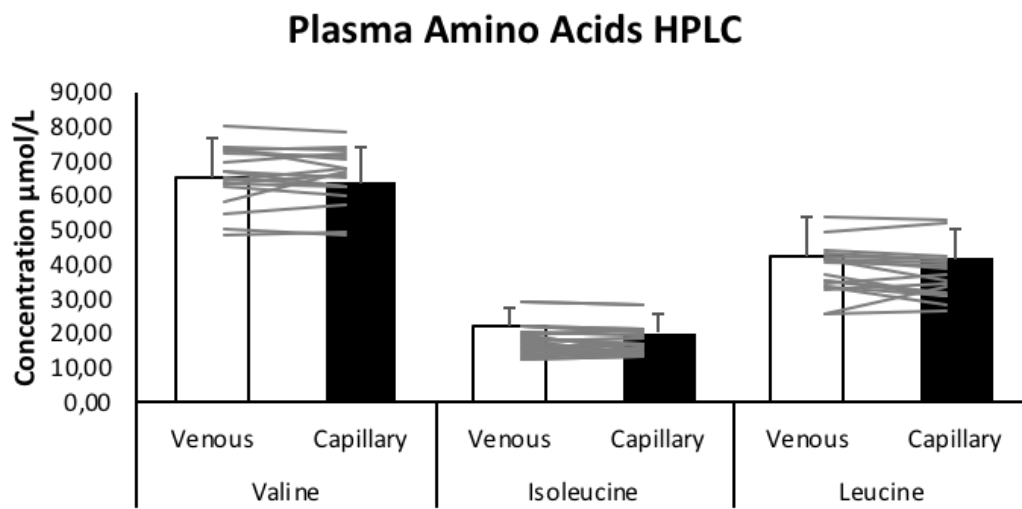


Fig. 1 B. BCAA on plasma concentrations using venous and capillary sampling by HPLC. Indicates no difference between venous vs capillary sampling; $P > 0.05$ by Student's T test. $N=18$

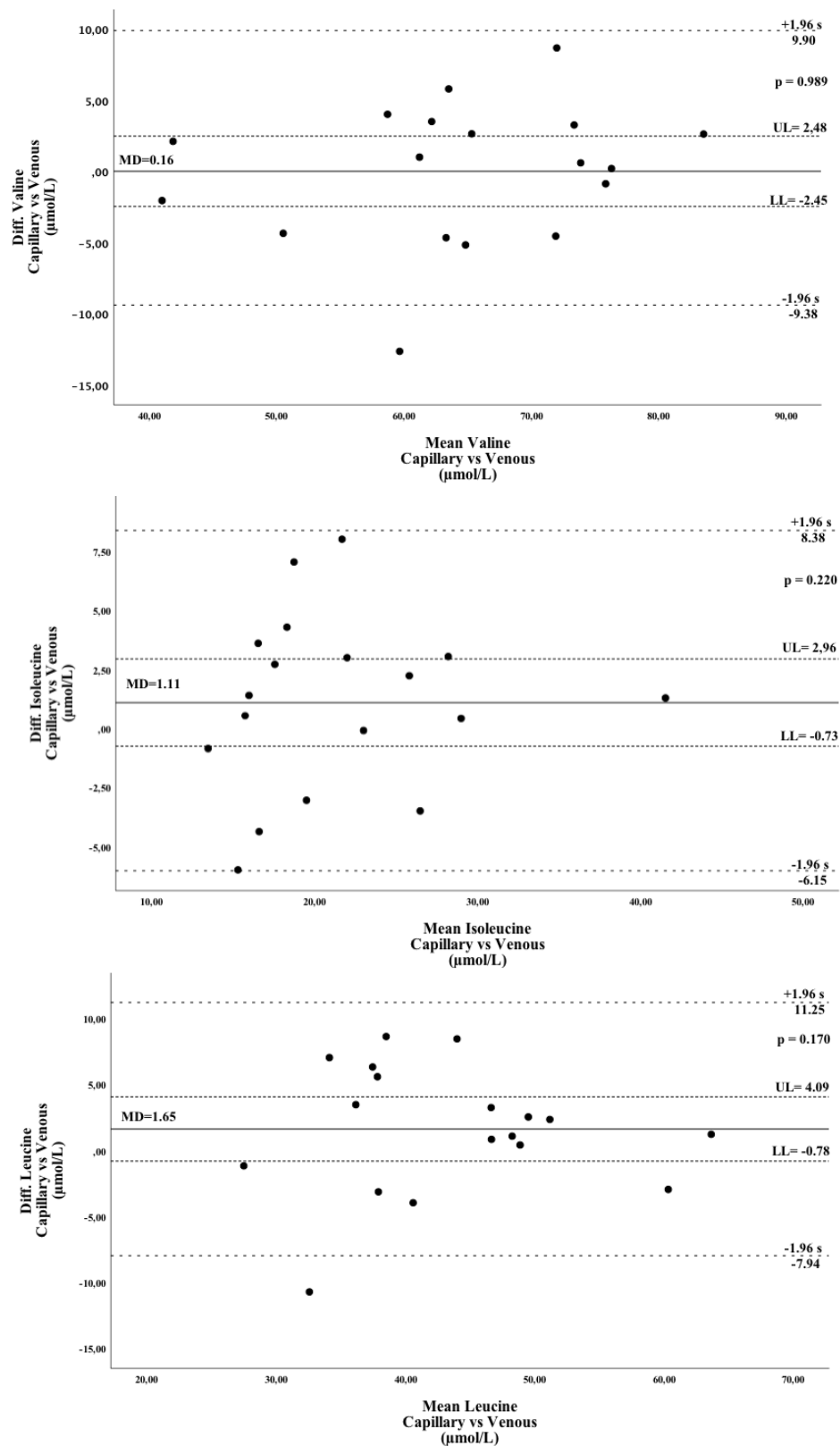


Figure 2. Bland-Altman plot between capillary sampling versus venous sampling.

MD: Mean Diff; UL: Upper Limit; LL: Lower Limit. N=18

References

1. Lac G, Maso F. Biological markers for the follow-up of athletes throughout the training season. *Pathol Biol (Paris)*. 2004;52(1):43-9.
2. Nunes LA, Gandra PG, Alves AA, Kubota LT, de Macedo DV. Adequacies of skin puncture for evaluating biochemical and hematological blood parameters in athletes. *Clin J Sport Med*. 2006;16(5):418-21.
3. de Oliveira DCX, Frisselli A, de Souza EG, Stanganelli LCR, Deminice R. Venous versus capillary sampling for total creatine kinase assay: Effects of a simulated football match. *PLoS One*. 2018;13(9):e0204238.
4. Chavan P, Bhat V, Tiwari M, Gavhane U, Pal SK. Comparison of Complete Blood Count Parameters between Venous and Capillary Blood in Oncology Patients. *J Lab Physicians*. 2016;8(1):65-6.
5. Kayiran SM, Ozbek N, Turan M, Gürakan B. Significant differences between capillary and venous complete blood counts in the neonatal period. *Clin Lab Haematol*. 2003;25(1):9-16.
6. Blumenfeld TA, Hertelendy WG, Ford SH. Simultaneously obtained skin-puncture serum, skin-puncture plasma, and venous serum compared, and effects of warming the skin before puncture. *Clin Chem*. 1977;23(9):1705-10.
7. Falch DK. Clinical chemical analyses of serum obtained from capillary versus venous blood, using Microtainers and Vacutainers. *Scand J Clin Lab Invest*. 1981;41(1):59-62.
8. Kupke IR, Kather B, Zeugner S. On the composition of capillary and venous blood serum. *Clin Chim Acta*. 1981;112(2):177-85.
9. Godfrey RJ, Whyte G, McCarthy J, Nevill A, Head A. The validity of capillary blood sampling in the determination of human growth hormone concentration during exercise in men. *Br J Sports Med*. 2004;38(5):E27.
10. Fouré A, Nosaka K, Gastaldi M, Mattei JP, Boudinet H, Guye M, et al. Effects of branched-chain amino acids supplementation on both

plasma amino acids concentration and muscle energetics changes resulting from muscle damage: A randomized placebo controlled trial. *Clin Nutr.* 2016;35(1):83-94.

11. Jackman SR, Witard OC, Philp A, Wallis GA, Baar K, Tipton KD. Branched-Chain Amino Acid Ingestion Stimulates Muscle Myofibrillar Protein Synthesis following Resistance Exercise in Humans. *Front Physiol.* 2017;8:390.
12. Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *J Nutr Biochem.* 2003;14(5):251-8.
13. Tang JE, Moore DR, Kujbida GW, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol* (1985). 2009;107(3):987-92.
14. Hulmi JJ, Lockwood CM, Stout JR. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:51.
15. Nicastro H, da Luz CR, Chaves DF, Bechara LR, Voltarelli VA, Rogero MM, et al. Does Branched-Chain Amino Acids Supplementation Modulate Skeletal Muscle Remodeling through Inflammation Modulation? Possible Mechanisms of Action. *J Nutr Metab.* 2012;2012:136937.
16. Padovan GJ, Arruda Leme I, Giacomo Fassini P, Lucif Junior N, Marchini JS. A New O-phthaldialdehyde (OPA) Solution for Fluorescence HPLC Amine Group Detection without Boric Acid Preparation. *J. Chromatography Separation and Techniques*; 2014. p. 3-5.
17. Deyl Z, Hyanek J, Horakova M. Profiling of amino acids in body fluids and tissues by means of liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1986;379:177-250.

18. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25(2):141-51.
19. Jones MR, Cheek JM, Tamaki J, Edmond J, Wu PY. Plasma amino acid concentrations in premature infants: effect of sampling site. *Am J Clin Nutr*. 1989;50(6):1389-94.
20. Abdulrazzaq YM, Ibrahim A. Determination of amino acids by ion-exchange chromatography on filter paper spotted blood samples stored at different temperatures and for different periods: comparison with capillary and venous blood. *Clin Biochem*. 2001;34(5):399-406.

Capítulo 2

Ingestão aguda de *Whey Protein* e Caseína: Efeito sobre Metabolismo

Proteico após Exercício de Força

**Whey Protein And Casein: Effect On Protein Metabolism After Strenght
Exercise**

Bryan Steve Martínez Galán¹

Julio Sergio Marchini²

Adelino Sanches Ramos³

Juan Carlos Aristizabal⁴

Ellen Cristini de Freitas^{1,3}

¹ Departamento de Alimentos e Nutrição, Escola de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista - FCFAR/UNESP, Brasil.

² Departamento de Clinica Medica da Escola de Medicina, Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, Brasil.

³ Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (EEFERP - USP), Brasil.

⁴ Escola de Nutrição e Dietética da Universidade de Antioquia – Medellín, Colômbia.

Resumo

Introdução: Atualmente, os suplementos esportivos são comumente usados por indivíduos que se exercitam. Estudos demonstraram uma associação entre o uso de proteínas e o aumento da massa muscular. Entre os suplementos alimentares, foi demonstrado que a proteína do soro exerce um efeito positivo no mecanismo de síntese de proteínas. Por outro lado, a caseína, outro suplemento proteico, também apresentou resultados eficientes sob o mecanismo de síntese e degradação de proteínas. Portanto, acredita-se que a associação de proteína de soro de leite e caseína na proporção de 80 a 20% será ideal para estimular o pico e o tempo de permanência dos aminoácidos de cadeia ramificada na circulação sanguínea, além de proporcionar maior retenção dos metabólitos finais do metabolismo de proteínas. **Objetivo:** Comparar os efeitos da suplementação com proteínas de soro e caseína em diferentes proporções no tempo de permanência dos aminoácidos e nos metabólitos finais do metabolismo das proteínas (nitrogênio urinário, creatinina e ureia). **Métodos:** Um estudo duplo cego, cruzado e agudo foi realizado com suplementação em diferentes proporções de caseína ou proteína de soro de leite, todos os participantes utilizaram as diferentes preparações de suplementos de proteína, de acordo com amostragem aleatória. 1) Proteína de soro de leite (WP), 2) Caseína (CAS), 3) Proteína de soro de leite 80% e caseína 20% (WP / CAS), 4) 80% de caseína e proteína de soro de leite 20% (CAS / WP) e Placebo (PLA) após uma sessão de exercício resistido de alta intensidade. Amostras de sangue foram coletadas para análise dos aminoácidos plasmáticos, leucina, isoleucina e valina, além dos metabólitos finais do metabolismo das proteínas, creatinina, ureia e nitrogênio urinário. **Resultados:** Os participantes consumiram 1,49 e 1,70 g / proteína / kg / dia antes e após o protocolo de exercício físico, respectivamente. Em relação ao exercício físico, observou-se que altas intensidades foram realizadas de acordo com o protocolo ao avaliar o teste de 1RM e PSE de cada sessão, um comportamento diferente foi observado entre os diferentes suplementos e dor muscular tardia. Observaram-se diferenças significativas quando comparadas as concentrações de creatinina entre CAS – CAS/WP ($p=0,05$);

CAS - WP ($p=0,03$) e ureia entre CAS – CAS/WP ($p=0,05$); CAS – WP ($p=0,007$) respectivamente, assim como diferenças significativas nas concentrações de valina, ($p=0,00$); isoleucina, ($p=0,00$) e leucina, ($p=0,00$) entre PLA e os suplementos de proteína assim como quando comparado as concentrações de isoleucina, ($p=0,01$) entre WP/CAS e CAS. Quando aplicado o Teste de 1RM e PSE de cada sessão, observou-se um comportamento diferente entre os diferentes suplementos e dor muscular tardia. **Conclusão:** conclui-se que a suplementação de proteína, permite alterar as concentrações dos aminoácidos, o que manteve os níveis plasmáticos de aminoácidos após exercício de musculação de alta intensidade, e dependendo da situação o possível reaproveitamento dos aminoácidos como substrato energético. O protocolo de jejum e exercício de alta intensidade provocou estresse metabólico aumentando a excreção de nitrogênio urinário. A suplementação de proteína promoveu o balanço nitrogenado positivo sendo um estimulante da síntese proteica muscular atuando como um estímulo efetivo na diminuição da percepção de dor muscular.

Palavras-chave: suplementação, caseína, proteína de soro de leite.

Abstract

Introduction: Currently, sports supplements are commonly used by individuals who exercise. Studies have shown an association between protein use and increased muscle mass. Among dietary supplements, whey protein has been shown to have a positive effect on protein synthesis mechanism. On the other hand, casein, another protein supplement, also showed efficient results under the mechanism of protein synthesis and degradation. Therefore, it is believed that the combination of 80% to 20% whey protein and casein will be ideal for stimulating the peak and residence time of branched chain amino acids in the bloodstream, as well as providing greater retention of metabolites. end of protein metabolism. **Objective:** To compare the effects of whey and casein protein supplementation in different proportions on amino acid residence time and final metabolites of protein metabolism (urinary nitrogen, creatinine and urea). **Methods:** A double blind, crossover and acute study was performed with supplementation in different proportions of casein or whey protein, all participants used the different protein supplement preparations according to random sampling. 1) Whey Protein (WP), 2) Casein (CAS), 3) Whey Protein 80% and Casein 20% (WP / CAS), 4) 80% Casein and Whey Protein 20 % (CAS / WP) and Placebo (PLA) after a high intensity resistance exercise session. Blood samples were collected for analysis of plasma amino acids, leucine, isoleucine and valine, as well as the final metabolites of protein metabolism, creatinine, urea and urinary nitrogen. **Results:** Participants consumed 1.49 and 1.70 g / protein / kg / day before and after the exercise protocol, respectively. Regarding physical exercise, it was observed that high intensities were performed according to the protocol when evaluating the 1RM and PSE test of each session, a different behavior was observed between the different supplements and late muscle pain. Significant differences were observed when creatinine concentrations were compared between CAS - CAS / WP ($p = 0.05$); CAS - WP ($p = 0.03$) and urea between CAS - CAS / WP ($p = 0.05$); CAS - WP ($p = 0.007$) respectively, as well as significant differences in valine concentrations, ($p = 0.00$); isoleucine, ($p = 0.00$) and leucine, ($p = 0.00$)

between PLA and protein supplements as compared to isoleucine concentrations ($p = 0.01$) between WP / CAS and CAS. When applying the 1RM and PSE Test of each session, a different behavior was observed between the different supplements and late muscle pain. **Conclusion:** It was concluded that protein supplementation, independent of amino acid concentration, maintained adequate plasma amino acid levels after high intensity exercise and decrease the DOMS.

Keywords: supplementation, casein, whey protein.

1. Introdução

O treinamento de resistência produz uma série de benefícios para a saúde, bem como o potencial de promover adaptações musculares de força, tamanho, potência e resistência (3). Têm se observado que o consumo de proteínas seguido da realização de séries de exercício de força aumenta o potencial de hipertrofia muscular, gerando um grau maior de força, bem como um aumento pronunciado da massa muscular (4). O processo de síntese e degradação proteica acontece de maneira constante em resposta a associação alimentar e exercício de força (5).

Quanto ao consumo proteico, faz-se necessário que haja um consumo adequado, pois, existem evidências na literatura que mesmo com a presença do exercício o consumo de proteínas alimentares em excesso não irá ocasionar um efeito aditivo referente ao ganho da massa muscular. De acordo com Phillips (67) o índice de síntese de proteínas musculares tem um limite e o consumo elevado de proteínas não garante uma síntese proteica excedente.

Em contrapartida, quando ocorre o consumo insuficiente proteico o corpo poderá apresentar níveis insuficientes de aminoácidos circulantes, tanto no período antecedendo como após o exercício físico, o resultado será níveis baixos de proteína, tendo efeitos secundários negativos como perda de massa muscular, recuperação tardia após o exercício (6, 12, 68). Sendo assim, é fundamental que os atletas consumam quantidades suficientes de proteínas e o tempo apropriado de consumo com a finalidade de

experimental um positivo balanço nitrogenado e consequente hipertrofia muscular (13)

Porém, a quantidade de proteína necessária para maximizar a síntese proteica não é totalmente elucidada, sendo que as recomendações diárias de consumo de proteína para adultos saudáveis são de 0.8 g/kg/dia (9). Segundo a *International Society of Sports Nutrition* (ISSN) (10), a ingestão de proteína para indivíduos atletas deve ser maior, recomendando o consumo em média de 1.4 a 2.0 g/kg/dia, de acordo com o exercício físico praticado. Para exercícios de resistência deve-se ingerir de 1,4 – 1,7 g/kg/dia dependendo da intensidade e duração do exercício, e as recomendações para exercícios de força e potência são de 1,6 a 2,0 g/kg/dia, considerando-se que as necessidades proteicas de atletas profissionais são duas ou três vezes maiores que um indivíduo não atleta (10, 11).

O tipo de proteína consumida pode afetar de maneira diferente o anabolismo proteico corporal. Isso ocorre devido as diferentes características da proteína, como; alto valor biológico, velocidade de absorção, composição de aminoácidos, respostas hormonais ou os efeitos antioxidantes (10, 11, 17, 18). As proteínas de alto valor biológico provem de fontes alimentares como o soro de leite, caseína, ovo, soja entre outros os quais contem aminoácidos essenciais que o próprio corpo não é capaz de produzir. No meio esportivo a proteína de soro de leite e a caseína são as mais usadas pelos atletas (19), pois estas proteínas contém concentrações mais elevadas de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) os quais estão associados à

melhora da capacidade de recuperação do organismo e promover o aumento da massa magra (20, 21).

De acordo com ISSN as proteínas do soro do leite e a caseína contém a maior biodisponibilidade de aminoácidos em comparação com as demais fontes de proteínas (10). Essas duas formas são substratos proteicos derivados do leite, contudo, apresentam características químicas diferentes pode interferir na resposta final ao ganho de massa muscular(11, 19, 27, 28). Já que a caseína intacta (é liberada lentamente do estômago) e o soro de leite ou *whey prtoein* (WP) (que é esvaziado rapidamente do estômago). o WP produz um aumento mais rápido e transitório na concentração de aminacidos no plasma, enquanto a caseína resulta em um aumento mais lento, porém mais prolongado, nas concentracoes plasmaticas de aminacidos(29). As diferentes respostas dos aminoacidos após consumir caseína o whey protein, individuais ou combinados altera a síntese proteica e a quebra de proteínas, sabendose que a síntese proteica é estimulada entorno de 68% a mais após o consumo de whey protein e quando consumida caseína a quebra de proteínas é entorno de -30% a menos comparada quando consumido whey protein(30, 31).

O exercício de força de alta intensidade provoca danos musculares que podem comprometer o desempenho físico (27, 36-38). Nesse contexto, tem sido evidenciado na literatura que o uso de substâncias ergogênicas nutricionais podem otimizar os resultados obtidos por meio do treinamento de força (28, 39). Especificamente, a proteína proveniente de diferentes suplementos alimentares entre eles soro de leite, caseína, soja, ovo e

aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) demonstram uma melhora na recuperação pós-exercício, estímulo adicional a síntese de proteína muscular e diminuição da degradação muscular(40-42) de forma similar observa-se redução dos processos de inflamação e estresse oxidativo pós-exercício (43).

Apesar da literatura científica apresentar inúmeros estudos com uso de diferentes tipos de proteínas e sua relação com a melhora do mecanismo de síntese proteica, existe uma proteína alimentar que é considerada padrão ouro; o leite materno. O leite materno é uma proteína de alto valor biológico, pois contém os aminoácidos essenciais e milhares de moléculas bioativas distintas que protegem o ser humano no início da vida contra a infecção, inflamação e contribuem para a maturação imunológica, desenvolvimento de órgãos, e colonização microbiana saudável (45).

O leite materno apresenta uma relação das proteínas do soro do leite de 60-70% e em caseína de 30-40%, isso proporciona uma biodisponibilidade aumentada e um esvaziamento gástrico mais rápido, enquanto o leite de vaca apresenta proporções contrárias as descritas ao leite materno contendo maior proporção de proteínas de absorção lenta(45).

Baseado na descrição acima, acredita-se que estudar um suplemento alimentar com uma proporção proteica similar ao leite materno contendo maior proporção de proteínas de absorção rápida e estimulante da síntese proteica em conjunto com proteínas de absorção lenta que permitem a diminuição da degradação de proteínas poderá ocasionar benefícios

referentes ao metabolismo proteico e recuperação muscular em indivíduos fisicamente ativos.

2. Metodologia

2.1 Voluntários

Participaram do estudo 10 indivíduos do sexo masculino, saudáveis, com idade variando de 18 e 45 anos. Os sujeitos participaram de entrevista prévia, onde verificou-se o enquadramento dos participantes nos critérios de inclusão e exclusão, explicando-se o delineamento experimental com posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os participantes não deviam ser fumantes, apresentar lesões, fazer uso de medicamentos relacionados a doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e tireoide e também não deviam apresentar intolerância a lactose. Os participantes realizavam treinos de musculação de duas a três vezes por semana e duas ou três vezes por semana treinamento específico de modalidades relatadas como natação, corrida, escalada. Os participantes treinavam por conta própria de acordo com os próprios objetivos, sendo então participantes amadores com experiência em exercícios de musculação.

2.2 Delineamento experimental

Foi realizado um estudo *crossover*, agudo utilizando-se a suplementação de caseína e/ou *whey protein*. Visto que o estudo é duplo-cego e *crossover*, todos os participantes utilizaram os dois tipos de

proteínas, sendo caseína e/ou *whey protein* nas diferentes proporções por período de suplementação, conforme sorteio aleatório.

Os voluntários foram submetidos a sessões de familiarização ao exercício de *leg press* e determinação de força máxima (1RM) para realização do protocolo de treinamento.

Os participantes foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: 1) *whey protein* (WP), 2) caseína (CAS), 3) *whey protein* 80% e caseína 20% (WP+CAS), 4) caseína 80% e *whey protein* 20% (CAS+WP), 5) placebo (PLA). Após a randomização, os voluntários foram submetidos a 1 sessão de exercício de força e ao protocolo de suplementação. Foi realizado o *wash out* de uma semana entre cada suplemento.

Os participantes foram informados a comparecer em jejum de 10 horas no laboratório de Atividade Física e Metabolismo - LAFEM da Escola de Educação Física e Esportes de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EEFERP USP), onde foram coletadas amostras de sangue no período basal (pré), imediatamente após a sessão de exercício e suplementação e cada 60 minutos durante um período de cinco horas após a sessão do exercício físico. Além disso, foi solicitado aos voluntários a preencher diários alimentares no período anterior (pré) e nas 24 horas seguintes ao protocolo de treino (pós), assim como coleta de urina durante as 24 horas após o protocolo de suplementação. Para completar o protocolo do estudo, os participantes deviam concluir 5 protocolos com suplementos diferentes onde avaliava-se: 5 sessões de 1RM, 5 sessões de protocolo de exercício físico, 5 horas de coleta de sangue por cada sessão, dois registros

alimentares (PRÉ e PÓS) em cada protocolo, 3 dias de registro da PDMT (24h, 48h, 72h) após cada protocolo como apresentado na figura 1.

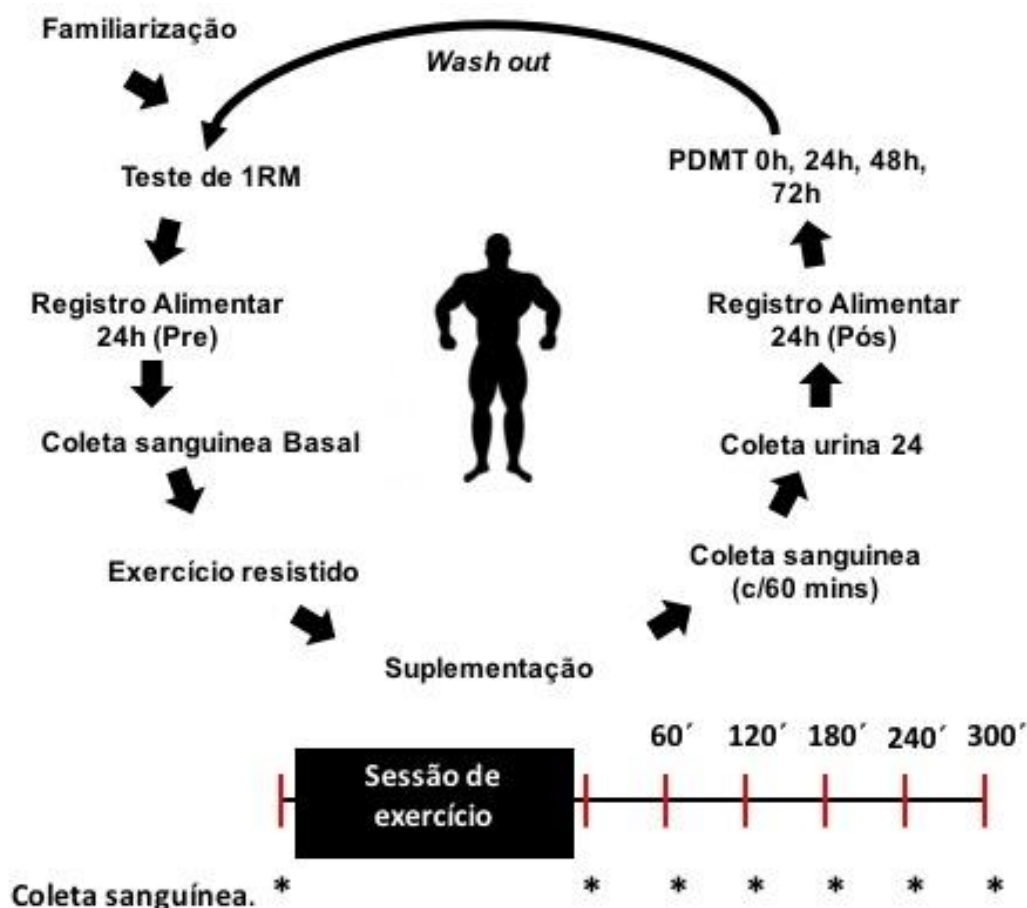


Figura 1 - Protocolo usado durante o período de experimento, 1RM: Uma (1) repetição máxima; PDMT: percepção da dor muscular tardia

2.3 Aspectos éticos

Todos os participantes foram esclarecidos quanto ao desenvolvimento do projeto e assinaram um termo de consentimento livre esclarecido, de acordo com a Resolução CNS 466, de 12 de outubro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde, em duas cópias, uma em posse dos pesquisadores e outra dos participantes. O voluntário podia desistir de sua participação em qualquer momento do estudo, sem qualquer consequência.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola De Educação Física e Esporte De Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, número do CAAE 64743116.5.0000.5659 (Anexo 1).

2.4 Protocolo de suplementação

Foi realizada a suplementação de caseína ou *whey protein*, conforme modelo duplo-cego e *crossover*, considerando a dose de 20 g nas diferentes proporções descritas a seguir: 1) 100% *whey protein*; 2) 100% caseína; 3) 80% *whey protein* + 20% caseína; 4) 80% caseína + 20% *Whey protein*; 5) placebo. Os suplementos foram embalados em sachês individuais, os quais eram diluídos em 250mL de água e consumidos imediatamente após a sessão de exercício.

Após um período mínimo de uma semana de *wash out* foi iniciado um novo protocolo de suplementação com um suplemento diferente, o qual foi determinado aleatoriamente, e o protocolo foi repetido até os participantes passar pelos cinco diferentes tipos de suplementos.

2.5 Protocolo de exercício

Os voluntários participaram de três sessões de familiarização ao exercício de *leg press* até que a medida de força máxima (1RM) seja estável, com intervalo de 48 horas entre as sessões. No início das sessões de familiarização os voluntários fizeram aquecimento de cinco minutos na bicicleta ergométrica (69), posteriormente realizaram aquecimento específico de 5 a 10 repetições com carga leve (40% a 60% da percepção de 1RM).

Após 1 minuto de intervalo, foi realizada uma nova série de 3 a 5 repetições com uma carga moderada (60% a 80% da percepção de 1RM).

O protocolo de exercício consistiu em 10 séries de 8-10 repetições com 2 minutos de intervalo entre cada série, considerando-se a carga de 85% de 1RM (70). O procedimento descrito foi realizado no laboratório de Cineantropometria e Desempenho Humano - LaCiDH da Escola de Educação Física e Esportes de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EEFERP USP).

2.6 Percepção de Dor Muscular Tardia

A percepção de dor muscular tardia (PDMT) nos movimentos de sentar e descer escada foi avaliada por meio de uma escala visual, a qual consiste numa linha de 100mm onde no primeiro extremo representa “sem dor” e no segundo extremo “muita dor”(71). Os valores da escala visual foram mensurados nos momentos 0, 24h, 48h e 72h após o protocolo de exercício e suplementação.

2.7 Avaliação Nutricional

Os voluntários foram orientados a manter a alimentação habitual durante a participação do estudo. Foram solicitados o preenchimento de diários alimentares no período anterior (pré) e nas 24 horas seguintes ao protocolo de treino (pós). Os participantes foram treinados para realizarem o preenchimento adequado do diário alimentar segundo protocolo (72). Para o cálculo nutricional foi utilizado o software Dietpro 5.5i Profissional® e foram

considerados o consumo de calorias totais e macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios).

3. Análises Bioquímicas

Foram coletadas amostras sanguíneas dos voluntários, os quais compareceram no laboratório de manhã, em jejum noturno de 10 horas. Foram coletados 4 mL de sangue da veia ante cubital e 200 μ L do lóbulo da orelha o qual foi utilizado para quantificar os aminoácidos leucina, isoleucina e valina. As amostras foram centrifugadas a *1800g* durante 10 minutos a 4°C, o plasma foi pipetado e posteriormente congelado a -80°C para realização das análises posteriores.

As análises foram realizadas no Laboratório de Atividade Física e Metabolismo LAFEM da Escola de Educação Física e Esportes de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EEFERP USP).

3.1.1 Dosagem de aminoácidos

Foi realizada a análise dos aminoácidos plasmáticos por meio do teste quantitativo e qualitativo, utilizando-se cromatografia líquida de alta pressão (CLAP) Shimatizu®, modelo LC 10AD, constando de 2 bombas de fluxo contínuo para o gradiente de eluição das fases móveis. A fase A será uma solução de fosfato de sódio 40mmol/L, pH 6,9 contendo 20ml/L de metanol (MEOH), 20 ml/L de acetonitrila (ACN), 20 ml/L de tetrahidrofurano (THF), e a fase B, uma solução de metanol a 65% para grau cromatográfico. O equipamento possui módulo (modelo CBM 10A) responsável pela

proporção (%) entre os solventes ou fases de acordo com a programação pré-estabelecida. O fluxo utilizado será de 0,75ml/ minuto, a temperatura ambiente de $38 \pm 1^\circ\text{C}$. A coluna utilizada na separação dos aminoácidos foi Adsorbosphere OPA-HS, de 150mm comprimento por 4,6 mm diâmetro interno e partícula 5 μm (Alltech Associates, Inc. – USA).

Amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas e os plasmas removidos. Amostras de 20 μL de plasma foram adicionadas de 200 μL de metanol e colocadas em tubos de 1,5 mL, os quais foram agitados em vortex, por 30 segundos e centrifugados (Centrifuga Refrigerada Jouan modelo MR1812 USA), por 10 minutos, a 1800g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5mL e o metanol evaporado no “Speed-Vac” (Savant, modelo AES 2010, USA), por 25 minutos. Após a evaporação total do metanol, o plasma seco foi dissolvido com 100 μL da solução fase A e agitado em vortex por 30 segundos. Foram retirados 40 μL de cada amostra bem como a solução padrão, os quais serão colocados em tubos próprios para análise e em seguida, estes tubos foram colocados no amostrador (Sil 10A) com capacidade para 79 tubos, para realização das análises. Neste amostrador teve ainda um tubo com o padrão interno (carboxi-metil-cisteína) e um frasco com o reagente ortofitaldialdeído (OPA; Sigma Company USA).

Este reagente foi preparado com 10mg de ortofitaldialdeído, 250mL de metanol puro, 2,25 mL de tampão borato pH 9,5, 10 μL do padrão interno e adicionar a cada tubo contendo a amostra para análise, e a seguir aspirar 50 μL do reagente OPA. As misturas destas soluções foram realizadas pelo

equipamento, que será programado para esperar 1 minuto para que a reação ocorra, processo conhecido como derivatização pré-coluna.

Foram injetados 40 μ L do produto da reação, na coluna de sílica C18, e os aminoácidos separados de acordo com peso molecular e polaridade e detectados através do detectador de fluorescência Shimadzu modelo RF535, em 335nm de excitação e 455nm de emissão (63).

3.1.2 Coleta de urina de 24h

Os voluntários realizaram a coleta de urina durante as 24 horas após a suplementação e da sessão aguda do exercício físico para posterior avaliação do metabolismo proteico. Cada voluntário recebeu frascos plásticos com capacidade de 2 litros, e foram devidamente orientados em relação ao procedimento de coleta e ao correto armazenamento da amostra até que a mesma foi entregue ao pesquisador para análise. Após a coleta, foram preparadas alíquotas de 14 mL em tubos falcon e as mesmas armazenadas em freezer a -80 °C até o momento da análise.

3.2 Dosagem de Marcadores de Metabolismo Proteico

3.2.1 Nitrogênio Urinário

Amostras de 20 μ L de urina de 24 horas, em duplicata, foram diluídas em 1000 μ L de água destilada e utilizadas para determinação do nitrogênio urinário total pelo método de piroquimioluminescência, método que permite medir na urina metabólitos relacionados à produção de óxido de nitrogênio, utilizando-se uma curva padrão (73).

A dosagem de nitrogênio urinário associado aos resultados da ingestão de proteínas permitirá a realização do cálculo de balanço nitrogenado (BN) utilizando-se a seguinte equação (74):

$$BN = \left(\frac{Proteína\ 24h(g)}{6,25} \right) - Nitrogênio\ urinário\ 24h(g) + 4(g)$$

3.2.2 Creatinina e Uréia

A dosagem de creatinina e ureia foi realizada posteriormente utilizando-se os kits específicos de creatinina e ureia CE, da Labtest diagnóstica®, com reação colorimétrica em espectrofotômetro de absorbância.

4. Análise Estatística

Para comparações entre os momentos e os diferentes suplementos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e quando detectada a diferença, será aplicado o teste *Tukey* para determinar a magnitude das diferenças. Para as conclusões estatísticas foi considerado o nível de 5% de significância.

5. Resultados

Participaram 10 indivíduos do sexo masculino com idade variando entre 29±8 anos; peso 77±12 kg; altura 1.74±0,09 m; IMC 25,43±2,91 K(g/m², todos com escolaridade superior, residentes em Ribeirão Preto. Somente 8 dos 10 participantes conseguiram completar o protocolo do estudo de forma adequada,

Os resultados sobre o consumo alimentar registrados 24 horas antes (PRÉ) e 24 horas após o protocolo de exercício e coleta de sangue (PÓS) estão apresentados na tabela 2. Especificamente quanto ao consumo de proteínas, pode-se observar que, em média, os participantes consumiam 1,49 g/kg/dia no momento PRÉ e 1,70 g/kg/dia no momento PÓS. É importante destacar que estes valores representam o consumo alimentar dos participantes, independentemente do tipo de suplemento utilizado, e que estes estão de acordo à ISSN (10).

Com relação ao teste de 1RM constatou-se que a carga de treino se manteve semelhante em termos da carga quando analisadas as medias, o que está diretamente associado com o peso (kg) durante o protocolo de exercício o qual não apresentou diferenças entre os demais protocolos de exercício.

É importante ressaltar que a aleatorização dos suplementos teve a finalidade de garantir que os participantes consumissem suplementos diferentes a cada sessão de treino, assim o suplemento consumido não interferiu no desempenho no teste de RM.

A tabela 2 apresenta os resultados de monitoramento do desempenho a cada sessão de treino de acordo com o tipo de suplemento consumido. Pode-se observar que a carga do teste de 1RM variou de $306,9 \pm 52,07$ kg a $322,7 \pm 50,44$ kg, sem apresentar diferenças significativas, o carga do protocolo de exercício foi entre 80-85% do RM e a PSE relatada poderia confirmar a intensidade do esforço realizado (~85% de 1 RM), mesmo sendo uma percepção segundo a escala de *Borg* modificada por Foster et al.(75)

os valores representam um esforço entre Muito difícil a Máximo. Resultados associados ao impulso do treinamento (TRIMP) foi calculado multiplicando o escore da PSE da sessão (intensidade) pela duração total da sessão em minutos (volume), incluindo o aquecimento, a volta a calma e as pausas ativas entre os esforços (76). De acordo com os resultados, se observou que com relação ao exercício os participantes apresentaram valores maiores no dia em que se realizou o protocolo usando PLA, importante destacar que esses valores não foram alterados pelo suplemento pois o protocolo se realizou antes da suplementação.

Tabela 1. Registro Alimentar de 24 horas Pré e Pós-suplementação e marcadores do metabolismo proteico.

Tabela 2. Caracterização dos participantes e desempenho físico durante cada protocolo de exercício.

Os dados sobre a Percepção de Dor Muscular Tardia após 24h, 48h e 72h após o protocolo de exercício apresentam-se na figura 2. Pode-se observar que, no teste sentado, os participantes apresentaram maior PDMT utilizando o suplemento de PLA após 24h quando comparado com WP, ($p=0,01$), apresentando um aumento significativo entre 0h e 24h quando realizado o protocolo de exercício na condição PLA, ($p=0,00$); também se observaram diferenças significativas quando comparada a PDMT na condição WP/CAS entre 48h e 72h apresentando uma diminuição diferenciada comparada aos demais protocolos, ($p=0,00$). Quanto ao momento de descer escada foram observadas diferenças significativas

quando comparada PLA e WP após 24h da realização do protocolo de exercício e suplementação, ($p=0,00$) e quando comparado os momentos entre 48h e 72h quando realizado o protocolo de exercício e suplementação com WP/CAS, ($p=0,00$) e CAS, ($p=0,03$), como observado na figura 2.

De acordo aos dados obtidos nas concentrações plasmáticas de aminoácidos, diferenças significativas se encontraram quando comparadas as medias entre os suplementos de proteína e o placebo para os aminoácidos de cadeia ramificada após 60 minutos (Valina; $p=0,00$, Isoleucina; $p=0,00$ e Leucina; $p=0,00$) e após 120 minutos (Valina; $p=0,03$, Isoleucina; $p=0,00$ e Leucina; $p=0,00$) respectivamente, assim como se observaram diferenças significativas quando comparadas as medias entre (WP/CAS e CAS; $p=0,01$) após 60 minutos como apresentado na figura 3.

Figura 2. Percepção de Dor Muscular Tardia (PDMT) após 24h, 48h e 72h após o protocolo de exercício.

Figura 3. Concentração no plasma dos aminoácidos de cadeia ramificada (Valina, Isoleucina e Leucina).

6. Discussão

O objetivo do estudo foi comparar os efeitos da suplementação de proteína do soro de leite e caseína sobre o tempo de permanência dos aminoácidos no plasma e metabólitos finais do metabolismo proteico em indivíduos fisicamente ativos. Inicialmente foram analisados os registros alimentares nas duas situações, Pre e Pós protocolos de exercício e suplementação. Quando à ingesta alimentar, não se observaram diferenças

significativas como mostrado na tabela 2. Com o intuito de verificar se o índice de Creatinina e Ureia está associado com o Nitrogenio urinario e o balanço nitrogenado após os protocolos de exercício e suplementação de proteína observou-se diferenças significativas quando comparadas as concentrações de creatinina entre CAS - CAS/WP ($p=0,05$); CAS – WP ($p=0,03$) e e ureia entre CAS - CAS/WP ($p=0,05$); CAS – WP; ($p=0,007$) (77) relatam que a uréia representa cerca de 80 – 90% do nitrogenio urinario; e foi observado em nosso estudo que essas concentrações de ureia estão acima dos valores esperados para indivíduos em condições normais (5g/24h), o que evidencia uma resposta que poderia estar associada a fatores influenciados pelo protocolo de jejum, exercício ou suplementação.

Mensurar os níveis de nitrogênio urinário constitui uma ferramenta indispensável no entendimento do estado metabólico dos participantes por ser um indicador de catabolismo celular e tecidual (78, 79). Eventos como traumas, queimaduras e cirurgias comumente apresentam um balanço nitrogenado negativo. De forma contrária, situações de anabolismo onde é necessária a retenção de nitrogênio, como na gravidez e outros procesos de anabolismo muscular como exercício físico de alta intensidade, apresentam um balanço nitrogenado positivo, que ajustado com variaveis como IMC podem constituir fatores que irão influenciar na síntese proteica (79). Em nosso estudo foi observado que o balanço nitrogenado após o protocolo de exercício e suplementação de CAS, foi significativamente menor comparado com WP/CAS.

Em nosso estudo foi observado que o nitrogênio úrinario avaliado após o protocolo de suplementação e exercício apresentou valores significativamente menores comparado entre CAS - WP/CAS. Apesar de todas as condições apresentarem balanço nitrogenado positivo, quando suplementado com WP/CAS, este apresenta valores de ~17g/24h valores associados a estresse metabólico elevado (79). Todos os valores relativos ao metabolismo proteico foram elevados em nosso estudo, e estavam associados a ingestão proteica.

O aumento de consumo de proteínas nos momentos Pós foram acompanhados de retenção na excreção de creatinina e ureia, que possivelmente são melhor reaproveitados dando resultado a um balanço nitrogenado elevado em comparação à suplementação com CAS/WP, que teve menos consumo de proteínas Pós em comparação a WP/CAS, que mesmo não sendo significativa, foi acompanhada de um aumento na excreção de ureia e creatinina resultando num balanço nitrogenado 10% menor no grupo CAS/WP. Os dados referentes às características de desempenho durante cada protocolo de exercício são apresentados na tabela 3, em que pode ser observado que os resultados foram homogêneos quanto às intensidades usadas durante os protocolos de exercício, que foram em torno de 85% do 1RM, constituindo um protocolo de alta intensidade e de geração de dano muscular (70).

Baseados em estudos prévios, (80-82) era esperado que a suplementação de proteínas poderia melhorar parâmetros relacionados a percepção da dor muscular tardia (DOMS). No estudo de Ra (71), é

caracterizado que a DOMS em resposta a estímulos musculares é influenciada pelo fato dos participantes estarem em jejum, provando que quando os participantes suplementam aminoácidos, realizam exercício físico e posteriormente consumo de alimentos, a percepção subjetiva de dor é menor quando comparada com a condição placebo. No entanto, em nosso estudo foram observadas diferenças significativas na DOMS quando comparados WP e PLA APÓS 24h quando sentado e descendo escada após exercício de alta intensidade e suplementação de proteínas, assim como diminuição da DOMS quando comparado com relação ao tempo entre 48h e 72h após o protocolo de exercício nas condições WP/CAS e CAS. Acredita-se que os dados do nosso estudo podem corroborar a diminuição da percepção de dor em cada avaliação, associando o consumo de nutrientes durante as 24h após, como apresentado na tabela 2.

De acordo aos resultados obtidos sobre a concentração plasmática de aminoácidos, foi observada diferença significativa quando comparados os diferentes suplementos utilizados, como apresentado na figura 3. Não podemos descartar que o suplemento utilizado pode estar relacionado à alteração do metabolismo proteico, como apresentado na tabela 2. Uma vez que os níveis de nitrogênio urinário excretado constituem um bom indicador de estresse, foi constatado que independente do estímulo/suplementação realizado, o balanço nitrogenado mostrou-se positivo em todas as avaliações.

O suporte nutricional é essencial durante todas as fases do treinamento, uma vez que embora o treinamento resistido aumente a síntese

proteica muscular, também resulta em quebra de proteínas (2, 6), o que faz com que o músculo esquelético permaneça em estado catabólico na ausência de intervenção nutricional adequada (83). Segundo (14), a ingestão oral de aminoácidos essenciais (incluindo o BCAA) resulta em síntese proteica muscular (SPM) e, quando em conjunto com o exercício resistido, pode apresentar um aumento ainda mais significativo da SPM. Assim, a correta disponibilidade de aminoácidos após o exercício parece necessária para maximizar os aumentos na síntese de proteínas do músculo esquelético após um período agudo de exercício resistido, e que o suprimento abundante de aminoácidos pode aumentar o efeito metabólico do exercício sobre as proteínas musculares (7).

7. Conclusão

Diante dos dados abordados, conclui-se que a suplementação de proteína, permite alterar as concentrações dos aminoácidos, o que manteve os níveis plasmáticos de aminoácidos após exercício de musculação de alta intensidade, e dependendo da situação o possível reaproveitamento dos aminoácidos como substrato energético. O protocolo de jejum e exercício de alta intensidade provocou estresse metabólico aumentando a excreção de nitrogênio urinário. A suplementação de proteína promoveu o balanço nitrogenado positivo sendo um estimulante da síntese proteica muscular atuando como um estímulo efetivo na diminuição da percepção de dor muscular.

Referências

1. Fisher J, Steele J, Bruce-Low S, Smith D. EVIDENCE-BASED RESISTANCE TRAINING RECOMMENDATIONS. *Medicina Sportiva*; 2011. p. 147-62.
2. Devries MC, Phillips SM. Supplemental protein in support of muscle mass and health: advantage whey. *J Food Sci.* 2015;80 Suppl 1:A8-a15.
3. Armendariz-Anguiano A, Jiménez-Cruz A, Bacardí-Gascón M, Pérez-Morales M. Efectividad del uso de suplementos de proteína en entrenamientos de fuerza: Revisión sistemática. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*; 2010.
4. Phillips SM. Protein requirements and supplementation in strength sports. *Nutrition.* 2004;20(7-8):689-95.
5. Biolo G, Maggi SP, Williams BD, Tipton KD, Wolfe RR. Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. *Am J Physiol.* 1995;268(3 Pt 1):E514-20.
6. Phillips SM, Tipton KD, Ferrando AA, Wolfe RR. Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover. *Am J Physiol.* 1999;276(1 Pt 1):E118-24.
7. Phillips SM, Parise G, Roy BD, Tipton KD, Wolfe RR, Tamopolsky MA. Resistance-training-induced adaptations in skeletal muscle protein turnover in the fed state. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80(11):1045-53.

8. Kerksick CM, Leutholtz B. Nutrient Administration and Resistance Training. *J Int Soc Sports Nutr.* 22005. p. 50-67.
9. Institute of Medicine Of the National Academies: Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients) [press release]. Washington, DC2005.
10. Jäger R, Kerksick CM, Campbell BI, Cribb PJ, Wells SD, Skwiat TM, et al. International Society of Sports Nutrition Position Stand: protein and exercise. *J Int Soc Sports Nutr.* 2017;14:20.
11. Campbell B, Kreider RB, Ziegenfuss T, La Bounty P, Roberts M, Burke D, et al. International Society of Sports Nutrition position stand: protein and exercise. *J Int Soc Sports Nutr.* 2007;4:8.
12. Kreider RB, Earnest CP, Lundberg J, Rasmussen C, Greenwood M, Cowan P, et al. Effects of ingesting protein with various forms of carbohydrate following resistance-exercise on substrate availability and markers of anabolism, catabolism, and immunity. *J Int Soc Sports Nutr.* 2007;4:18.
13. Hayes A, Cribb PJ. Effect of whey protein isolate on strength, body composition and muscle hypertrophy during resistance training. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008;11(1):40-4.
14. Wilborn CD, Taylor LW, Outlaw J, Williams L, Campbell B, Foster CA, et al. The Effects of Pre- and Post-Exercise Whey vs. Casein Protein Consumption on Body Composition and Performance Measures in Collegiate Female Athletes. *J Sports Sci Med.* 2013;12(1):74-9.

15. Buckley JD, Abbott MJ, Brinkworth GD, Whyte PB. Bovine colostrum supplementation during endurance running training improves recovery, but not performance. *J Sci Med Sport*. 2002;5(2):65-79.
16. Brinkworth GD, Buckley JD, Slavotinek JP, Kurmis AP. Effect of bovine colostrum supplementation on the composition of resistance trained and untrained limbs in healthy young men. *Eur J Appl Physiol*. 2004;91(1):53-60.
17. Wilson J, Wilson GJ. Contemporary issues in protein requirements and consumption for resistance trained athletes. *J Int Soc Sports Nutr*. 2006;3:7-27.
18. Clarkson PM, Nosaka K, Braun B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med Sci Sports Exerc*. 1992;24(5):512-20.
19. Clarkson PM, Hubal MJ. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002;81(11 Suppl):S52-69.
20. Twist C, Eston R. The effects of exercise-induced muscle damage on maximal intensity intermittent exercise performance. *Eur J Appl Physiol*. 2005;94(5-6):652-8.
21. Heavens KR, Szivak TK, Hooper DR, Dunn-Lewis C, Comstock BA, Flanagan SD, et al. The effects of high intensity short rest resistance exercise on muscle damage markers in men and women. *J Strength Cond Res*. 2014;28(4):1041-9.
22. Maughan RJ. Nutritional ergogenic aids and exercise performance. *Nutr Res Rev*. 1999;12(2):255-80.

23. Juhn M. Popular sports supplements and ergogenic aids. *Sports Med.* 2003;33(12):921-39.
24. Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *J Nutr Biochem.* 2003;14(5):251-8.
25. Tang JE, Moore DR, Kujbida GW, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol* (1985). 2009;107(3):987-92.
26. Hulmi JJ, Lockwood CM, Stout JR. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:51.
27. Nicastro H, da Luz CR, Chaves DF, Bechara LR, Voltarelli VA, Rogero MM, et al. Does Branched-Chain Amino Acids Supplementation Modulate Skeletal Muscle Remodeling through Inflammation Modulation? Possible Mechanisms of Action. *J Nutr Metab.* 2012;2012:136937.
28. Lawrence RA, Lawrence RM. *Lactancia materna.* 6 ed 2007.
29. Seo DI, Kim E, Fahs CA, Rossow L, Young K, Ferguson SL, et al. Reliability of the one-repetition maximum test based on muscle group and gender. *J Sports Sci Med.* 2012;11(2):221-5.
30. Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Wolf SE, Sanford AP, Wolfe RR. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(12):2073-81.

31. Ra SG, Miyazaki T, Ishikura K, Nagayama H, Komine S, Nakata Y, et al. Combined effect of branched-chain amino acids and taurine supplementation on delayed onset muscle soreness and muscle damage in high-intensity eccentric exercise. *J Int Soc Sports Nutr.* 2013;10(1):51.
32. Scagliusi FB, Ferriolli E, Pfrimer K, Laureano C, Cunha CS, Gualano B, et al. Under-reporting of energy intake is more prevalent in a healthy dietary pattern cluster. *Br J Nutr.* 2008;100(5):1060-8.
33. Deyl Z, Hyanek J, Horakova M. Profiling of amino acids in body fluids and tissues by means of liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1986;379:177-250.
34. Grimble GK, West MF, Acuti AB, Rees RG, Hunjan MK, Webster JD, et al. Assessment of an automated chemiluminescence nitrogen analyzer for routine use in clinical nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1988;12(1):100-6.
35. MOTTA V. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. São Paulo 2003.
36. Foster C, Florhaug JA, Franklin J, Gottschall L, Hrovatin LA, Parker S, et al. A new approach to monitoring exercise training. *J Strength Cond Res.* 2001;15(1):109-15.
37. Banister EW. Modeling elite athletic performance, *Physiological Testing of Elite Athletes.* Human Kinetics ed1991.
38. García Arévalo L, Santana Porbén S. Nitrógeno ureico urinario estimado del índice de excreción urea-creatinina construido para una

muestra única de orina. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición; 2015. p. 314-26.

39. Blackburn GL, Bistrian BR, Maini BS, Schlamm HT, Smith MF. Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 1977;1(1):11-22.
40. Konstantinides FN. Nitrogen balance studies in clinical nutrition. Nutr Clin Pract. 1992;7(5):231-8.
41. Coombes JS, McNaughton LR. Effects of branched-chain amino acid supplementation on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase after prolonged exercise. J Sports Med Phys Fitness. 2000;40(3):240-6.
42. Lewis PB, Ruby D, Bush-Joseph CA. Muscle soreness and delayed-onset muscle soreness. Clin Sports Med. 2012;31(2):255-62.
43. Kraemer WJ, Ratamess NA, Volek JS, Häkkinen K, Rubin MR, French DN, et al. The effects of amino acid supplementation on hormonal responses to resistance training overreaching. Metabolism. 2006;55(3):282-91.
44. Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, Wolfe RR. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. Am J Physiol. 1997;273(1 Pt 1):E99-107.
45. Bird SP, Tarpenning KM, Marino FE. Effects of liquid carbohydrate/essential amino acid ingestion on acute hormonal response during a single bout of resistance exercise in untrained men. Nutrition. 2006;22(4):367-75.

46. Tipton KD, Ferrando AA, Phillips SM, Doyle D, Wolfe RR. Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *Am J Physiol.* 1999;276(4):E628-34.
47. Biolo G, Tipton KD, Klein S, Wolfe RR. An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *Am J Physiol.* 1997;273(1 Pt 1):E122-9.

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Registro Alimentar de 24 horas PRÉ e PÓS suplementação e Marcadores do Metabolismo proteico.

Nutrientes	REGISTRO 1			REGISTRO 2			REGISTRO 3			REGISTRO 4			REGISTRO 5		
	PRE	POS	Δ%	PRE	POS	Δ%	PRE	POS	Δ%	PRE	POS	Δ%	PRE	POS	Δ%
Kcal	1964,50±225,75	2323,91±209,06	15,47	2271,24±415,04	2303,66±270,48	1,41	2185,47±365,83	2360,33±169,75	7,41	2351,41±257,50	1830,18±255,86	-28,48	2567,15±367,07	2181±336,58	-17,69
PTN (g)	96,09±13,46	133,74±14,05	28,15	103,07±22,43	115,63±14,76	10,87	108,27±15,10	166,61±18,56	35,02	115,83±11,33	103,55±13,58	-11,86	150,69±30,23	137,16±31,38	-9,87
LIP (g)	59,25±6,04	89,37±14,92	33,70	98,49±34,57	77,13±13,16	-27,70	90,79±26,53	85,43±7,78	-6,27	77,76±9,05	68,23±8,97	-13,97	89,2±19,41	70,87±14,20	-25,86
CHO (g)	261,70±42,08	251,38±30,38	-4,11	243,08±40,77	436,95±161,15	44,37	231,09±41,13	256,91±23,73	10,05	267,23±35,34	224,16±35,50	-19,22	290,27±33,09	274,62±39,34	-5,70
Marcadores de metabolismo proteico	CAS/WP			CHO			WP/CAS			CAS			WP		
Creatinina (mg/kg/24h)	25,31±3,86			23,81±13,45			22,28±2,74			17,19±2,50			25,62±2,76		
Ureia (g/24h)	26,07±2,89			22,44±3,20			24,92±3,27			21,32±2,98^a			27,32±2,85		
Nitrogenio Urinario	14,96±2,11			10,12±1,76			12,09±2,08			12,70±1,66			15,33±1,88		
Balanço nitrogenado	15,28±3,52			13,90±5,11			17,97±4,99			5,70±3,37^b			10,18±5,51		

PRE: Registro alimentar 24h antes do protocolo de exercício e suplementação. POS: Registro alimentar 24h após o protocolo de exercício e suplementação. Valores apresentados como media ± EP. N=10. Δ%: Delta de variação entre PRE e POS * Diferença entre PRE e PÓS. ^a Diferença entre CAS-CAS/WP, CAS-WP; ^b Diferença entre CAS-WP/CAS.

Tabela 2. Caracterização dos participantes e desempenho físico durante cada protocolo de exercício.

Idade	Altura		Peso (Kg)		IMC
29±8	1,74±0,09		77,30±12,94		25,43±2,91
Desempenho Fisico	CAS/WP	CHO	WP/CAS	CAS	WP
1 RM (Kg)	309,8±50,62	322,7±50,44	306,6±47,83	306,9±52,07	307,5±44,92
PESO (Kg)	264,28±36,45	266,87±39,88	257,83±44,92	256,48±47,71	255,50±43,25
PSE (u.a)	8.1±1,4	8.3±1,4	7,9±1,2	8.2±0.8	8.1±1,2
F.C (bpm)	123,7±22,04	132,3±18,37	129,6±19,99	131.1±23,06	125.3±29,05
TRIMP (u.a)	2920,2±520,24	3082,8±428,1	3058,8±36,2	3094,6±544,16	2957±685,5
Kcal	345,88±60,04	348,66±62,05	351,43±63,73	347,64±61,77	348,57±60,25

Nota: CAS/WP: 80%caseína/20%whey protein, CHO: Carboidrato, WP/CAS: 80%whey protein/20%caseína, CAS: caseína, WP: Whey protein. PSE: Percepção subjetiva ao esforço. F.C: Frequência cardíaca. TRIMP: Índice global da carga de treino. Kcal: Energia usada na sessão de exercício. N=10

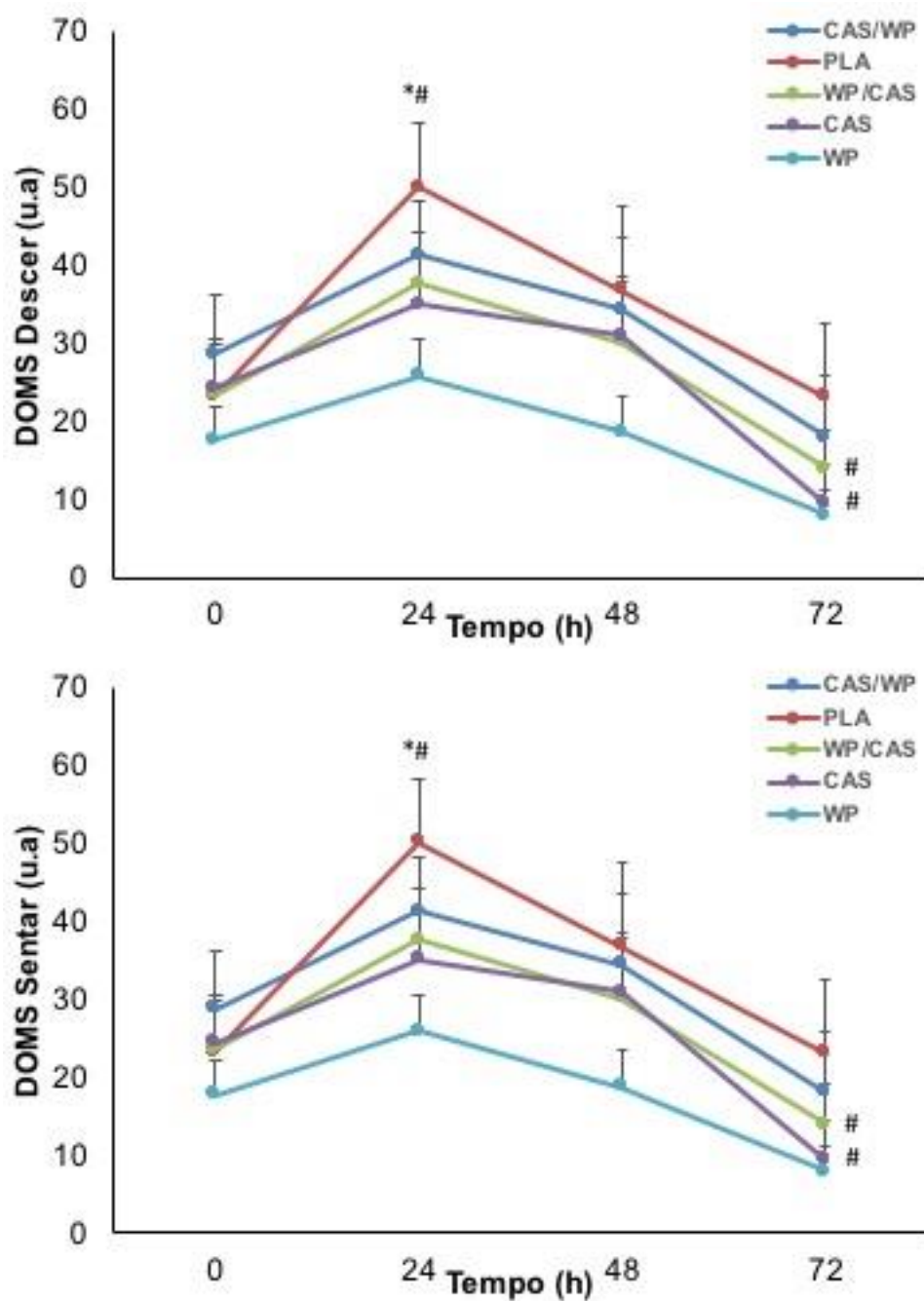


Figura 2. Percepção de Dor Muscular Tardia (PDMT) após 24h, 48h e 72h após o protocolo de exercício. Valores expressos em média $\pm$ EP. *Diferença significativa entre PLA e WP, 24h, # Diferença significativa entre 0h e 24h na condição PLA e entre 48h e 72h nas condições WP/CAS quando sentado e descendo escada assim como entre 48h e 72h na condição CAS quando descer escada. Considerado nível de significância $P < 0,05$.

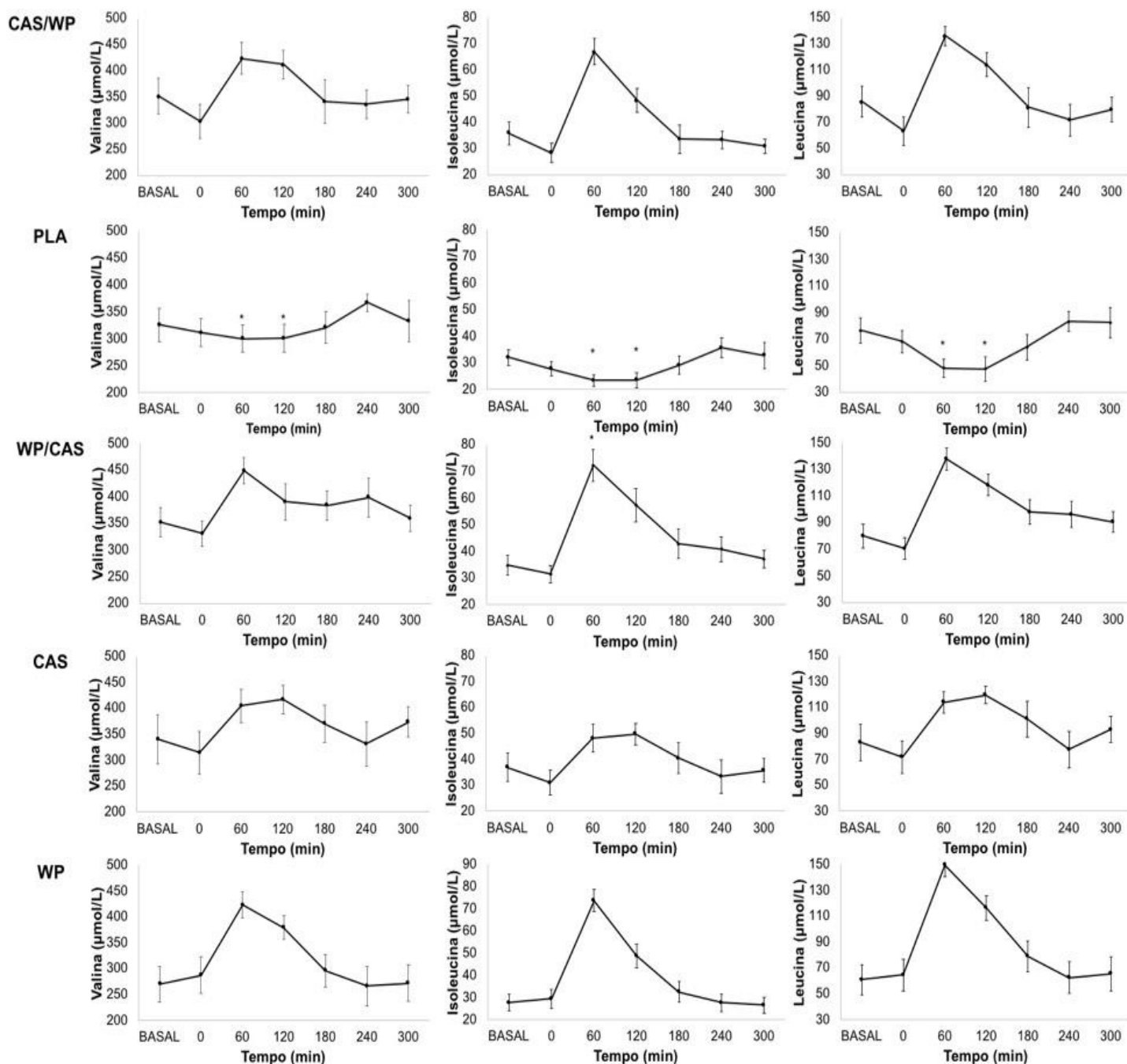


Figura 3. Concentração no plasma dos aminoácidos de cadeia ramificada (Valina, Isoleucina e Leucina). Concentração de aminoácidos plasmáticos nos diferentes momentos antes e após protocolo experimental. CAS/WP: 80% caseína / 20% *whey protein*; CHO: Carboidrato, WP/CAS: 80% *whey protein* / 20% caseína, CAS: caseína, WP: *Whey protein* (Exercício e suplementação). Valores expressos em Média $\pm$ EP. *Diferença significativa entre Placebo e os demais suplementos. #Diferença significativa entre WP/CAS e CAS. Utilizou-se o nível de significância $P < 0,05$

Considerações Finais

Ainda existem controvérsias a respeito do uso das proporções de proteínas, como *whey protein* e caseína, pois não está esclarecido a proporção ideal de uso da associação de diferentes proteínas com intuito de estimular a manutenção de aminoácidos circulantes na busca de evidenciar resposta decorrentes da realização do exercício resistido.

Porém, nossas observações sustentam em partes a hipótese do presente estudo. Não foi observado que o uso de suplemento com associação proteica entre *Whey* e caseína (80-20%) similar às concentrações proteicas do leite materno tenha apresentado níveis de concentrações dos aminoácidos circulantes aumentadas quando comparado aos demais grupos de proteínas. Entretanto, foi observado um melhor nível na recuperação após a sessão do esforço avaliado pela percepção de dor, assim como um aumento do balanço nitrogenado sugerindo maior retenção proteica.

Referências

1. Moore DR. Maximizing Post-exercise Anabolism: The Case for Relative Protein Intakes. *Front Nutr.* 2019;6:147.
2. Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, Wolfe RR. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol.* 1997;273(1 Pt 1):E99-107.
3. Fisher J, Steele J, Bruce-Low S, Smith D. EVIDENCE-BASED RESISTANCE TRAINING RECOMMENDATIONS. *Medicina Sportiva*; 2011. p. 147-62.
4. Devries MC, Phillips SM. Supplemental protein in support of muscle mass and health: advantage whey. *J Food Sci.* 2015;80 Suppl 1:A8-a15.
5. Armendariz-Anguiano A, Jiménez-Cruz A, Bacardí-Gascón M, Pérez-Morales M. Efectividad del uso de suplementos de proteína en entrenamientos de fuerza: Revisión sistemática. *ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION*; 2010.
6. Biolo G, Maggi SP, Williams BD, Tipton KD, Wolfe RR. Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. *Am J Physiol.* 1995;268(3 Pt 1):E514-20.
7. Biolo G, Tipton KD, Klein S, Wolfe RR. An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *Am J Physiol.* 1997;273(1 Pt 1):E122-9.
8. Rennie MJ, Edwards RH, Halliday D, Matthews DE, Wolman SL, Millward DJ. Muscle protein synthesis measured by stable isotope techniques in man: the effects of feeding and fasting. *Clin Sci (Lond).* 1982;63(6):519-23.
9. Institute of Medicine Of the National Academies: Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients) [press release]. Washington, DC2005.

10. Jäger R, Kerksick CM, Campbell BI, Cribb PJ, Wells SD, Skwiat TM, et al. International Society of Sports Nutrition Position Stand: protein and exercise. *J Int Soc Sports Nutr.* 2017;14:20.
11. Campbell B, Kreider RB, Ziegenfuss T, La Bounty P, Roberts M, Burke D, et al. International Society of Sports Nutrition position stand: protein and exercise. *J Int Soc Sports Nutr.* 2007;4:8.
12. Phillips SM, Parise G, Roy BD, Tipton KD, Wolfe RR, Tamopolsky MA. Resistance-training-induced adaptations in skeletal muscle protein turnover in the fed state. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80(11):1045-53.
13. Kerksick CM, Leutholtz B. Nutrient Administration and Resistance Training. *J Int Soc Sports Nutr.* 2005. p. 50-67.
14. Tipton KD, Ferrando AA, Phillips SM, Doyle D, Wolfe RR. Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *Am J Physiol.* 1999;276(4):E628-34.
15. Morton RW, Murphy KT, McKellar SR, Schoenfeld BJ, Henselmans M, Helms E, et al. A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of protein supplementation on resistance training-induced gains in muscle mass and strength in healthy adults. *Br J Sports Med.* 2018;52(6):376-84.
16. Hou Y, Wu G. Nutritionally Essential Amino Acids. *Adv Nutr.* 2018;9(6):849-51.
17. Hayes A, Cribb PJ. Effect of whey protein isolate on strength, body composition and muscle hypertrophy during resistance training. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008;11(1):40-4.
18. Kreider RB, Earnest CP, Lundberg J, Rasmussen C, Greenwood M, Cowan P, et al. Effects of ingesting protein with various forms of carbohydrate following resistance-exercise on substrate availability and markers of anabolism, catabolism, and immunity. *J Int Soc Sports Nutr.* 2007;4:18.
19. Wilborn CD, Taylor LW, Outlaw J, Williams L, Campbell B, Foster CA, et al. The Effects of Pre- and Post-Exercise Whey vs. Casein Protein

Consumption on Body Composition and Performance Measures in Collegiate Female Athletes. *J Sports Sci Med*. 2013;12(1):74-9.

20. Brinkworth GD, Buckley JD, Slavotinek JP, Kurmis AP. Effect of bovine colostrum supplementation on the composition of resistance trained and untrained limbs in healthy young men. *Eur J Appl Physiol*. 2004;91(1):53-60.

21. Buckley JD, Abbott MJ, Brinkworth GD, Whyte PB. Bovine colostrum supplementation during endurance running training improves recovery, but not performance. *J Sci Med Sport*. 2002;5(2):65-79.

22. Kinsella JE, Whitehead DM. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Adv Food Nutr Res*. 1989;33:343-438.

23. Wilson J, Wilson GJ. Contemporary issues in protein requirements and consumption for resistance trained athletes. *J Int Soc Sports Nutr*. 2006;3:7-27.

24. Sindayikengera S, Xia WS. Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006;7(2):90-8.

25. Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrère B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14930-5.

26. Frühbeck G. Protein metabolism. Slow and fast dietary proteins. *Nature*. 1998;391(6670):843, 5.

27. Heavens KR, Szivak TK, Hooper DR, Dunn-Lewis C, Comstock BA, Flanagan SD, et al. The effects of high intensity short rest resistance exercise on muscle damage markers in men and women. *J Strength Cond Res*. 2014;28(4):1041-9.

28. Maughan RJ. Nutritional ergogenic aids and exercise performance. *Nutr Res Rev*. 1999;12(2):255-80.

29. Smith TJ, Montain SJ, Anderson D, Young AJ. Plasma amino acid responses after consumption of beverages with varying protein type. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2009;19(1):1-17.

30. Bos C, Mahé S, Gaudichon C, Benamouzig R, Gausserès N, Luengo C, et al. Assessment of net postprandial protein utilization of ¹⁵N-labelled milk nitrogen in human subjects. *Br J Nutr.* 1999;81(3):221-6.
31. Dangin M, Boirie Y, Guillet C, Beaufrère B. Influence of the protein digestion rate on protein turnover in young and elderly subjects. *J Nutr.* 2002;132(10):3228S-33S.
32. Hashida R, Kawaguchi T, Bekki M, Omoto M, Matsuse H, Nago T, et al. Aerobic vs. resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *J Hepatol.* 2017;66(1):142-52.
33. Teague BN, Schwane JA. Effect of intermittent eccentric contractions on symptoms of muscle microinjury. *Med Sci Sports Exerc.* 1995;27(10):1378-84.
34. Pasiakos SM. Exercise and amino acid anabolic cell signaling and the regulation of skeletal muscle mass. *Nutrients.* 2012;4(7):740-58.
35. Blaauw B, Schiaffino S, Reggiani C. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Compr Physiol.* 2013;3(4):1645-87.
36. Clarkson PM, Hubal MJ. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002;81(11 Suppl):S52-69.
37. Clarkson PM, Nosaka K, Braun B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med Sci Sports Exerc.* 1992;24(5):512-20.
38. Twist C, Eston R. The effects of exercise-induced muscle damage on maximal intensity intermittent exercise performance. *Eur J Appl Physiol.* 2005;94(5-6):652-8.
39. Juhn M. Popular sports supplements and ergogenic aids. *Sports Med.* 2003;33(12):921-39.
40. Hulmi JJ, Lockwood CM, Stout JR. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:51.
41. Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *J Nutr Biochem.* 2003;14(5):251-8.

42. Tang JE, Moore DR, Kujbida GW, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol* (1985). 2009;107(3):987-92.
43. Nicastro H, da Luz CR, Chaves DF, Bechara LR, Voltarelli VA, Rogero MM, et al. Does Branched-Chain Amino Acids Supplementation Modulate Skeletal Muscle Remodeling through Inflammation Modulation? Possible Mechanisms of Action. *J Nutr Metab*. 2012;2012:136937.
44. Mølgaard C, Larnkjær A, Arnberg K, Michaelsen KF. Milk and growth in children: effects of whey and casein. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2011;67:67-78.
45. Lawrence RA, Lawrence RM. *Lactancia materna*. 6 ed 2007.
46. Michaelsen KF, Hoppe C, Lauritzen L, Mølgaard C. Whole cow's milk: why, what and when? *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2007;60:201-19.
47. Picciano MF. Nutrient composition of human milk. *Pediatr Clin North Am*. 2001;48(1):53-67.
48. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev*. 2015;91(11):629-35.
49. Hoppe C, Mølgaard C, Michaelsen KF. Cow's milk and linear growth in industrialized and developing countries. *Annu Rev Nutr*. 2006;26:131-73.
50. Prentice A, Ginty F, Stear SJ, Jones SC, Laskey MA, Cole TJ. Calcium supplementation increases stature and bone mineral mass of 16- to 18-year-old boys. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(6):3153-61.
51. Lac G, Maso F. Biological markers for the follow-up of athletes throughout the training season. *Pathol Biol (Paris)*. 2004;52(1):43-9.
52. Nunes LA, Gandra PG, Alves AA, Kubota LT, de Macedo DV. Adequacies of skin puncture for evaluating biochemical and hematological blood parameters in athletes. *Clin J Sport Med*. 2006;16(5):418-21.

53. de Oliveira DCX, Frisselli A, de Souza EG, Stanganelli LCR, Deminice R. Venous versus capillary sampling for total creatine kinase assay: Effects of a simulated football match. *PLoS One*. 2018;13(9):e0204238.
54. Chavan P, Bhat V, Tiwari M, Gavhane U, Pal SK. Comparison of Complete Blood Count Parameters between Venous and Capillary Blood in Oncology Patients. *J Lab Physicians*. 2016;8(1):65-6.
55. Kayiran SM, Ozbek N, Turan M, Gürakan B. Significant differences between capillary and venous complete blood counts in the neonatal period. *Clin Lab Haematol*. 2003;25(1):9-16.
56. Blumenfeld TA, Hertelendy WG, Ford SH. Simultaneously obtained skin-puncture serum, skin-puncture plasma, and venous serum compared, and effects of warming the skin before puncture. *Clin Chem*. 1977;23(9):1705-10.
57. Falch DK. Clinical chemical analyses of serum obtained from capillary versus venous blood, using Microtainers and Vacutainers. *Scand J Clin Lab Invest*. 1981;41(1):59-62.
58. Kupke IR, Kather B, Zeugner S. On the composition of capillary and venous blood serum. *Clin Chim Acta*. 1981;112(2):177-85.
59. Godfrey RJ, Whyte G, McCarthy J, Nevill A, Head A. The validity of capillary blood sampling in the determination of human growth hormone concentration during exercise in men. *Br J Sports Med*. 2004;38(5):E27.
60. Fouré A, Nosaka K, Gastaldi M, Mattei JP, Boudinet H, Guye M, et al. Effects of branched-chain amino acids supplementation on both plasma amino acids concentration and muscle energetics changes resulting from muscle damage: A randomized placebo controlled trial. *Clin Nutr*. 2016;35(1):83-94.
61. Jackman SR, Witard OC, Philp A, Wallis GA, Baar K, Tipton KD. Branched-Chain Amino Acid Ingestion Stimulates Muscle Myofibrillar Protein Synthesis following Resistance Exercise in Humans. *Front Physiol*. 2017;8:390.
62. Padovan GJ, Arruda Leme I, Giacomo Fassini P, Lucif Junior N, Marchini JS. A New O-phthaldialdehyde (OPA) Solution for

Fluorescence HPLC Amine Group Detection without Boric Acid Preparation. *J. Chromatography Separation and Techniques*; 2014. p. 3-5.

63. Deyl Z, Hyanek J, Horakova M. Profiling of amino acids in body fluids and tissues by means of liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1986;379:177-250.

64. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25(2):141-51.

65. Jones MR, Cheek JM, Tamaki J, Edmond J, Wu PY. Plasma amino acid concentrations in premature infants: effect of sampling site. *Am J Clin Nutr.* 1989;50(6):1389-94.

66. Abdulrazzaq YM, Ibrahim A. Determination of amino acids by ion-exchange chromatography on filter paper spotted blood samples stored at different temperatures and for different periods: comparison with capillary and venous blood. *Clin Biochem.* 2001;34(5):399-406.

67. Phillips SM. Protein requirements and supplementation in strength sports. *Nutrition.* 2004;20(7-8):689-95.

68. Phillips SM, Tipton KD, Ferrando AA, Wolfe RR. Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover. *Am J Physiol.* 1999;276(1 Pt 1):E118-24.

69. Seo DI, Kim E, Fahs CA, Rossow L, Young K, Ferguson SL, et al. Reliability of the one-repetition maximum test based on muscle group and gender. *J Sports Sci Med.* 2012;11(2):221-5.

70. Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Wolf SE, Sanford AP, Wolfe RR. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(12):2073-81.

71. Ra SG, Miyazaki T, Ishikura K, Nagayama H, Komine S, Nakata Y, et al. Combined effect of branched-chain amino acids and taurine supplementation on delayed onset muscle soreness and muscle damage in high-intensity eccentric exercise. *J Int Soc Sports Nutr.* 2013;10(1):51.

72. Scagliusi FB, Ferriolli E, Pfrimer K, Laureano C, Cunha CS, Gualano B, et al. Under-reporting of energy intake is more prevalent in a healthy dietary pattern cluster. *Br J Nutr.* 2008;100(5):1060-8.

73. Grimble GK, West MF, Acuti AB, Rees RG, Hunjan MK, Webster JD, et al. Assessment of an automated chemiluminescence nitrogen analyzer for routine use in clinical nutrition. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 1988;12(1):100-6.
74. MOTTA V. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. São Paulo 2003.
75. Foster C, Florhaug JA, Franklin J, Gottschall L, Hrovatin LA, Parker S, et al. A new approach to monitoring exercise training. J Strength Cond Res. 2001;15(1):109-15.
76. Banister EW. Modeling elite athletic performance, Physiological Testing of Elite Athletes. Human Kinetics ed 1991.
77. García Arévalo L, Santana Porbén S. NITRÓGENO UREICO URINARIO ESTIMADO DEL ÍNDICE DE EXCRECIÓN UREA-CREATININA CONSTRUIDO PARA UNA MUESTRA ÚNICA DE ORINA. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición; 2015. p. 314-26.
78. Blackburn GL, Bistrian BR, Maini BS, Schlamm HT, Smith MF. Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 1977;1(1):11-22.
79. Konstantinides FN. Nitrogen balance studies in clinical nutrition. Nutr Clin Pract. 1992;7(5):231-8.
80. Coombes JS, McNaughton LR. Effects of branched-chain amino acid supplementation on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase after prolonged exercise. J Sports Med Phys Fitness. 2000;40(3):240-6.
81. Lewis PB, Ruby D, Bush-Joseph CA. Muscle soreness and delayed-onset muscle soreness. Clin Sports Med. 2012;31(2):255-62.
82. Kraemer WJ, Ratamess NA, Volek JS, Häkkinen K, Rubin MR, French DN, et al. The effects of amino acid supplementation on hormonal responses to resistance training overreaching. Metabolism. 2006;55(3):282-91.
83. Bird SP, Tarpenning KM, Marino FE. Effects of liquid carbohydrate/essential amino acid ingestion on acute hormonal response

during a single bout of resistance exercise in untrained men. *Nutrition*. 2006;22(4):367-75.

Anexo 1. Cópia da aprovação do trabalho no Comitê de Ética em Pesquisa.

 USP EEFERP	USP - ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE DE RIBEIRÃO PRETO DA USP			
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP				
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: USO DE WHEY PROTEIN E CASEÍNA EFEITO SOBRE METABOLISMO PROTEICO APÓS EXERCÍCIO DE FORÇA Pesquisador: Ellen Cristini de Freitas Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País; Novos procedimentos terapêuticos invasivos; Versão: 2 CAAE: 64743116.5.0000.5659 Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO Patrocinador Principal: Financiamento Próprio DADOS DO PARECER Número do Parecer: 1.989.472 Apresentação do Projeto: vide parecer anterior Objetivo da Pesquisa: vide parecer anterior Avaliação dos Riscos e Benefícios: Apresentados de forma correta Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Nada a declarar Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Todos os termos foram apresentados de forma correta Recomendações: Nada a declarar Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Todos os questionamentos, referentes às pendências do parecer anterior, foram respondidos adequadamente.				
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900 Bairro: VILA MONTE ALEGRE UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> CEP: 14.040-907 E-mail: cep20@usp.br </td> </tr> </table>			Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900 Bairro: VILA MONTE ALEGRE UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO	CEP: 14.040-907 E-mail: cep20@usp.br
Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900 Bairro: VILA MONTE ALEGRE UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO	CEP: 14.040-907 E-mail: cep20@usp.br			



USP - ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE DE RIBEIRÃO PRETO DA USP



Continuação do Parecer: 1.989.472

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto encontra-se **APROVADO** para execução. Pedimos atenção aos seguintes itens:

- 1) De acordo com a Resolução CNS n.º 466/2012, o pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais (parciais e final, em função da duração da pesquisa);
- 2) Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada. Neste caso, o pesquisador deve aguardar nova aprovação do CEP para realizar os procedimentos de acordo com as mudanças solicitadas;
- 3) Sobre o TCLE: caso o termo tenha DUAS páginas ou mais, lembramos que no momento da sua assinatura, tanto o participante da pesquisa (ou seu representante legal) quanto o pesquisador responsável deverão RUBRICAR todas as folhas, colocando as assinaturas na última página;
- 4) Caso haja instituição(ões) coparticipante(s) no projeto, atender a solicitação da carta n.º 0212/CONEP/CNS, de 21 de outubro de 2010;
- 5) GARANTIR QUE NOS MOMENTOS DE ATIVIDADE FÍSICA SEMPRE HAJA PELO MENOS UM MEMBRO DA EQUIPE DE PESQUISA APTO A PRESTAR OS SOCORROS DE URGÊNCIA, INCLUSIVE MASSAGEM CARDÍACA E USO DO DEA, CASO NECESSÁRIO.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_805371.pdf	10/03/2017 16:14:56		Aceito
Outros	carta_para_comite_de_etica_2.docx	10/03/2017 16:14:08	Ellen Cristini de Freitas	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo_1.docx	10/03/2017 16:12:29	Ellen Cristini de Freitas	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Escrito_3.docx	10/03/2017 16:11:53	Ellen Cristini de Freitas	Aceito

Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900

Bairro: VILA MONTE ALEGRE

CEP: 14.040-907

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0494

E-mail: cep80@usp.br



**USP - ESCOLA DE EDUCAÇÃO
FÍSICA E ESPORTE DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP**



Continuação do Parecer: 1.989.472

Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esc arecido_3.docx	10/03/2017 16:11:53	Ellen Cristini de Freitas	Aceito
Outros	carta_para_comite_de_etica.docx	07/02/2017 13:33:19	Ellen Cristini de Freitas	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esc arecido_2.docx	07/02/2017 13:30:11	Ellen Cristini de Freitas	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	16/11/2016 13:46:46	Ellen Cristini de Freitas	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esc arecido.docx	08/11/2016 14:42:48	Ellen Cristini de Freitas	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CASEINA_WHEY.docx	08/11/2016 14:42:00	Ellen Cristini de Freitas	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

RIBEIRÃO PRETO, 29 de Março de 2017

Assinado por:
Carlos Roberto Bueno Júnior
(Coordenador)

Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900

Bairro: VILA MONTE ALEGRE

CEP: 14.040-907

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0404

E-mail: cep20@usp.br

Apêndice 1- Modelo do 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 – “Uso de Whey protein e Caseína efeito sobre metabolismo proteico após exercício de força”.

Prof^a. Dr^a. Ellen Cristini de Freitas – Docente responsável/ e-mail:

ellenfreitas@usp.br

Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre, CEP:14049-907, Ribeirão Preto/SP ,

Telefone: (16) 3315-0445; telefone pessoal (16) 981560770.

Leia com bastante atenção as explicações abaixo:

O leite materno apresenta uma relação das proteínas do soro do leite de 60-70% e em caseína de 30-40%, isso proporciona uma biodisponibilidade aumentada e um esvaziamento gástrico mais rápido, enquanto o leite de vaca apresenta proporções contrárias as descritas ao leite materno. Diante disso, acredita-se que estudar um suplemento alimentar com uma proporção proteica similar ao leite materno poderá ocasionar benefícios referentes ao metabolismo proteico e recuperação muscular. Nesse contexto, a pesquisa intitulada “**Uso de Whey protein e Caseína efeito sobre metabolismo proteico após exercício de força**” tem como objetivo comparar os efeitos da suplementação de proteína do soro de leite e caseína em diferentes proporções sobre o tempo de permanência dos aminoácidos, e metabólitos finais do metabolismo proteico (nitrogênio urinário, creatinina e ureia).

Além dos possíveis benefícios citados acima, os atletas terão acesso a todos os resultados referentes as suas avaliações.

Os voluntários serão submetidos às seguintes avaliações nas dependências da Escola de Educação física e Esporte de Ribeirão Preto - EEFERP - USP:

1. Serão coletadas amostras de 10mL de sangue da veia ante cubital dos voluntários nos quatro momentos da pesquisa, no período basal (pré), imediatamente após e cada 30 minutos ate completar 5 horas após sessão de exercício para quantificar (leucina, isoleucina e valina).
2. A coleta de sangue será realizada por uma auxiliar de enfermagem da Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas – UPC-HC-FMRP-USP no Hospital das Clínicas.

3. O protocolo de exercício que será utilizado consiste em 10 series cada uma de 8 repetições no “*leg press*” com 2 minutos de intervalo entre cada serie, iniciara com 85% de 1RM e a cada serie será realizada uma redução de 5% da carga inicial. O procedimento descrito será realizado no laboratório de Cine antropometria e Desempenho Humano da Escola de Educação Física e Esportes de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EEFERP USP).
4. Em casos de intolerância à lactose, o atleta não poderá participar do estudo.
5. Será realizada a suplementação de 20g de Caseína ou Whey protein e 20% de Caseína e 80% de Whey protein combinado, 80% de caseína e 20% de Whey protein imediatamente após sessão de exercício.
6. Você receberá um frasco plástico específico para coleta de urina (capacidade de 2 litros) e deverá iniciar a coleta na primeira urina do dia e continuar coletando todas as vezes que urinar até completar o período de 24 horas (primeira urina do dia seguinte). O frasco deverá ser fechado e armazenado em geladeira durante todo o período da coleta e mantido refrigerado até o momento de entregar para o pesquisador responsável.
7. O protocolo terá 4 momentos, o primeiro com a suplementação de Caseína, o segundo momento com a suplementação de Whey protein, o terceiro momento com a suplementação de 20% de Caseína e 80% de Whey protein combinado e o quarto momento com a suplementação de 80% de caseína e 20% de Whey protein combinado, sendo por sorteio aleatório tendo um intervalo de uma semana entre cada suplemento.

Ao participar dessa pesquisa você poderá sentir um pequeno desconforto resultante da coleta de sangue. Não existem riscos previsíveis.

O exercício de “*leg press*” de alta intensidade pode provocar dores musculares após a sessão de treino podendo permanecer durante 2 a 3 dias.

Não terá nenhuma despesa ao participar desse estudo, mas caso seja necessário terá o reembolso para eventuais despesas, assim como haverá indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa de acordo com as leis vigentes.

Sua participação não é obrigatória. Você participa apenas se tiver interesse e disponibilidade.

Durante a pesquisa você poderá desistir a qualquer momento.

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 – “Uso de Whey protein e Caseína efeito sobre metabolismo proteico após exercício de força”.

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 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 2017.

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 deve-se entrar em contato com a:

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- Modelo da Escala Visual de Percepção de dor.**PERCEPÇÃO SUBJETIVA DE DOR**

|-----|
Sem dor **Muita dor**

|-----|
Sem dor **Muita dor**

|-----|
Sem dor **Muita dor**

|-----|
Sem dor **Muita dor**

Data: _____

Descreva detalhadamente o alimento e também a quantidade consumida deste alimento (conforme o exemplo abaixo). Anotar logo após o consumo.

HORA	ALIMENTO	QUANTIDADE
07:45	Banana nanica	1 unidade (de 1 palma)
	Leite integral	2/3 copo requeijão
	Café	1/3 copo americano
	Bolacha agua e sal	4 unidades
	Margarina com sal light	1 colher de sobremesa rasa

[illegible]

