

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**FACULDADE DE NUTRIÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**  
**THAYSA GHIARONE DE ARAÚJO SILVA**

**IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO AGUDA DE NITRATO SOBRE A CINÉTICA  
DO CONSUMO DE OXIGÊNIO NOS DOMÍNIOS MODERADO, PESADO,  
MUITO PESADO E SEVERO DO ESFORÇO FÍSICO: UM ESTUDO  
RANDOMIZADO, CROSSOVER E DUPLO CEGO**

**THAYSA GHIARONE DE ARAÚJO SILVA**

**IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO AGUDA DE NITRATO SOBRE A CINÉTICA  
DO CONSUMO DE OXIGÊNIO NOS DOMÍNIOS MODERADO, PESADO,  
MUITO PESADO E SEVERO DO ESFORÇO FÍSICO: UM ESTUDO  
RANDOMIZADO, CROSSOVER E DUPLO CEGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição, sob a orientação do Prof. Dr Adriano Eduardo Lima da Silva.

MACEIÓ-AL 2015

**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário: Maria Helena Mendes Lessa**

S586i Silva, Thaysa Ghiarone de Araújo.

Impacto da suplementação aguda de nitrato sobre a cinética do consumo de oxigênio nos domínios moderado, pesado, muito pesado e severo do esforço físico: um estudo randomizado, crossover e duplo cego / Thaysa Ghiarone de Araújo Silva. – Maceió, 2014.

83 f. : il.

Orientador: Adriano Eduardo Lima da Silva.

Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2015.

Inclui bibliografia.

Anexos: f. 81-83.

1. Óxido nítrico. 2. Nitrato - Suplemento. 3. Suco de Beterraba – Utilização.  
4. Exercícios físicos - Desempenho. I. Título.

CDU: 612.392



MESTRADO EM NUTRIÇÃO  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



Campus A. C. Simões  
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins  
Maceió-AL 57072-970  
Fone/fax: 81 3214-1160

---

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE  
DISSERTAÇÃO

“IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO AGUDA DE NITRATO SOBRE A CINÉTICA  
DO CONSUMO DE OXIGÊNIO NOS DOMÍNIOS MODERADO, PESADO,  
MUITO PESADO E SEVERO DO ESFORÇO FÍSICO: UM ESTUDO  
RANDOMIZADO, CROSSOVER E DUPLO CEGO”

por

Thaysa Ghiarone de Araújo Silva

A Banca Examinadora, reunida aos 26 dias do mês de Fevereiro do ano  
de 2015, considera o(a) candidato(a) **APROVADO(A)**.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Adriano Eduardo Lima da Silva  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal de Alagoas  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rômulo Cássio de Moraes Bertuzzi  
Escola de Educação Física e Esporte  
Universidade de São Paulo  
(Examinador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araujo  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal de Alagoas  
(Examinador)

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus Avôs José Félix Marinho e Severino Tavares da Silva, que foram exemplos de bondade, integridade e sabedoria.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas incertas.

À minha família, meus pais e meus irmãos, obrigada pelo carinho, paciência e incentivo, meu agradecimento especial a vocês que se orgulham de mim e confiam em meu trabalho.

Ao meu orientador por acreditar em meu potencial, e ser exemplo de profissional.

Aos meus amigos do mestrado, especialmente ao GPCE grupo que tenho grande orgulho de fazer parte.

Aos amigos de longa data que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

## RESUMO

O nitrato inorgânico era conhecido como uma molécula indesejada na dieta, com potenciais efeitos nocivos. No entanto, durante a última década, estudos publicados têm demonstrado que o nitrato é fisiologicamente reciclado no sangue e tecidos para agir como substrato alternativo na produção de óxido nítrico. O óxido nítrico, por sua vez, contribui de forma significativa na regulação de muitas funções corporais, tais como contratilidade muscular, metabolismo energético, mensageiro intercelular, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da agregação plaquetária, pressão arterial, fluxo sanguíneo e respiração mitocondrial. Dessa forma, vem crescendo o interesse em investigar os efeitos da suplementação de nitrato na obtenção de óxido nítrico e seus efeitos sobre o exercício físico. Apesar do efeito do nitrato sob o custo de oxigênio em exercício submáximo ser bem conhecido, existem controvérsias quanto à denominação, determinação e padronização das intensidades de esforço. Adicionalmente, nenhum estudo investigou as potenciais propriedades ergogênicas do nitrato em exercício nos domínios muito pesado e severo, este último se encontra a uma intensidade de esforço acima do consumo máximo de oxigênio. Portanto, visando contribuir com o conhecimento acerca da temática, esta dissertação apresenta dois artigos: 1) uma revisão da literatura com os principais efeitos agudos e crônicos da suplementação de nitrato e a sua relação com a formação de óxido nítrico e desempenho físico; 2) um estudo experimental com desenho contrabalançado, randômico e duplo cego, que objetiva investigar os efeitos da suplementação aguda de nitrato sobre a cinética de  $\text{VO}_2$  nos domínios moderado, pesado, muito pesado e severo.

**Palavras-chave:** óxido nítrico, suco de beterraba e desempenho.

## ABSTRACT

The inorganic nitrate was known as an undesired molecule in the diet with potential harmful effects. However, during the last decade, studies have shown that the nitrate is physiologically recycled in the blood and tissues to act as an alternative substrate in the production of nitric oxide. In turn, nitric oxide contributes significantly regulating many body functions such as muscle contractility, energy metabolism, intercellular messenger, macrophage-mediated cytotoxicity, inhibition of platelet aggregation, blood pressure, blood flow and mitochondrial respiration. Therefore, there is an increasing interest to investigate the effects of nitrate supplementation on nitric oxide production and its effects on exercise. Despite the effect of nitrate on oxygen cost during submaximal exercise is well known, there is controversies over the designation, determination and standardization of exercise intensities. Additionally, no study has investigated the potential ergogenic properties of nitrate to exercise during the exercise in the severe domain, which is an exercise intensity above the maximum oxygen uptake. Thus, in order to contribute to acknowledge with this thematic, this dissertation presents two articles: 1) a literature review with the main acute and chronic effects of nitrate supplementation and its relation to nitric oxide formation an exercise performance; 2) An experimental study using a counterbalanced , randomized and double blind design to investigate the effects of acute nitrate supplementation on  $\text{VO}_2$  kinetics in moderate, heavy, very heavy and severe domains.

**Key-words:** nitric oxide, beet juice and performance.

## LISTA DE FIGURAS

### 1º artigo: artigo de revisão

Figura 1	Reações de formação de NOS a partir da L-Arginina .....	18
Figura 2	Reciclagem da L-Arginina. ....	20
Figura 3	Vias de obtenção do NO, destacando a via do nitrato ingerido.....	21
Figura 4	Possíveis efeitos do óxido nítrico no músculo esquelético.....	25

### 2º artigo: artigo original

Figura 1	Resumo do desenho experimental.....	53
Figura 2	Consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) em função do tempo durante o exercício nos quatro domínios de intensidade (moderado, pesado, muito pesado e severo) nas condições nitrato e placebo de um sujeito representativo da amostra.....	58
Figura 3	A: Tempo até exaustão representados em média e desvio padrão no domínio muito pesado. B: Tempo até exaustão representados em média e desvio padrão no domínio severo. Não houve diferença significativa entre nitrato e placebo em ambos os domínios.....	62

## LISTA DE TABELAS

### **1º artigo: artigo de revisão**

Tabela 1	Resumo dos estudos que investigaram o efeito da suplementação de NO <sub>3</sub> sobre o exercício físico.....	28
----------	--	----

### **2º artigo: artigo original**

Tabela 1	Parâmetros cinéticos e concentração de lactato, obtidos no domínio moderado e severo nas condições nitrato e placebo.....	59
----------	---	----

Tabela 2	Parâmetros cinéticos obtidos e concentração de lactato, obtidos no domínio pesado e muito pesado nas condições nitrato e placebo.....	60
----------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP**-Adenosina difosfato  
**ASS**-Arginino succinato sintase  
**ASL**-Arginino succinato liase  
**ATP**-Adenosina trifosfato  
**BH<sub>4</sub>**-Tetrahidrobiopterina  
**CVM**-Contração voluntária máxima  
**FC**-Frequência cardíaca  
**FMN**-Flavina mononucleotídeo  
**FAD**-Flavina adenina dinucleotídeo  
**LL**-Limiar de lactato  
**NADPH**-Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato  
**NO**-Óxido nítrico  
**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>**-Nitrito  
**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**-Nitrato  
**NOS**-Óxido nítrico sintase  
**eNOS**-Óxido nítrico sintase endotelial  
**iNOS**-Óxido nítrico sintase induzível  
**nNOS**- Óxido nítrico sintase neuronal  
**Pcr**-Fosfocreatina  
**PL**-Placebo  
**pO<sub>3</sub>** -Pressão parcial de oxigênio  
**rpm**-Rotação por minuto  
**TT**-*Time-trial*  
**VO<sub>2máx</sub>**-Consumo máximo de oxigênio  
**VE**-Volume minuto  
**VE/VO<sub>2</sub>**-Razão Volume minuto/ Consumo de oxigênio  
**VE/VCO<sub>2</sub>**-Razão Volume minuto/ Produção de gás carbônico  
**VO<sub>2</sub>**-Consumo de oxigênio  
**VCO<sub>2</sub>**-Produção de gás carbônico  
**W**-Potência  
**θ<sub>L</sub>**-Primeiro limiar ventilatório

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>COLETÂNEA DE ARTIGOS.....</b>	<b>13</b>
	<b>2.1. 1º artigo: artigo de revisão</b>	
	Suplementação de nitrato e sua relação com a formação de óxido nítrico e exercício físico.....	14
	<b>2.2. 2º artigo: artigo de resultados</b>	
	Impacto da suplementação aguda de nitrato sobre a cinética do consumo de oxigênio nos domínios moderado, pesado, muito pesado e severo do esforço físico: um estudo randomizado, crossover e duplo cego.....	46
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>82</b>

**1 INTRODUÇÃO GERAL**

O Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) inorgânico, abundante em vegetais de folhas verdes, era conhecido como uma molécula indesejada na dieta (GOVONI, JANSSON *et al.*, 2008). No entanto, durante a última década, estudos publicados na literatura têm demonstrado que o nitrato é fisiologicamente reciclado no sangue e tecidos para agir como substrato alternativo na produção de óxido nítrico (NO) (LUNDBERG e GOVONI, 2004).

Sabe-se que o óxido nítrico (NO), denominado inicialmente como um fator de relaxamento derivado do endotélio (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980), regula sua atividade dependendo da sua concentração, reatividade química, proximidade das células alvo e a forma como as células alvos são programadas para responder (SUREDA, TAULER *et al.*, 2006). O NO atua como uma molécula sinalizadora na regulação de muitas funções corporais tais como: contratilidade muscular, metabolismo energético, respiração mitocondrial, inibição da agregação plaquetária, pressão e fluxo sanguíneo (COOPER e GIULIVI, 2007).

Dessa forma, tem crescido nos últimos anos o interesse em investigar os efeitos da suplementação de nitrato sobre a formação de NO e conseqüentemente sobre o exercício físico. Apesar do efeito do nitrato sob o custo de oxigênio em exercício submáximo ser bem conhecido, há uma confusão quanto a denominação, determinação e padronização das intensidades de esforço, mesmo quando determinadas por domínios de intensidade do esforço (BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; BAILEY, FULFORD *et al.*, 2010; BESCOS, RODRIGUEZ *et al.*, 2011; LANSLEY, WINYARD, BAILEY *et al.*, 2011; LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011; LARSEN, SCHIFFER *et al.*, 2011). Além disso, nenhum estudo investigou as potenciais propriedades ergogênicas do nitrato em exercício nos domínios muito pesado e severo, esse último se encontra a uma intensidade de esforço acima do consumo máximo de oxigênio (supra  $\text{VO}_{2\text{max}}$ ) (OZYENER, ROSSITER *et al.*, 2001).

Portanto, visando contribuir com o entendimento da temática, esta dissertação apresenta dois artigos: 1) uma revisão da literatura com os principais efeitos agudos e crônicos da suplementação de nitrato e a sua relação com a formação de óxido nítrico e desempenho físico; 2) um estudo experimental com desenho contrabalançado, randômico e duplo cego, que objetiva investigar os efeitos da suplementação aguda de nitrato sobre a cinética de  $\text{VO}_2$  nos domínios moderado, pesado, muito pesado e severo.



**1º artigo: artigo de revisão**

GHIARONE, T; ATAIDE-SILVA, T; BERTUZZI, R; LIMA-SILVA, AE. Suplementação de nitrato e sua relação com a formação de óxido nítrico e exercício físico

Foi publicado em: Acta Brasileira do Movimento Humano.

## **RESUMO**

A ingestão de nitrato vem crescendo em popularidade no meio esportivo. Esta revisão objetiva esclarecer os mecanismos responsáveis pelo efeito da suplementação de nitrato relacionadas ao óxido nítrico, bem como descrever os efeitos agudos e crônicos da suplementação com nitrato sobre o desempenho no exercício. O óxido nítrico é um radical livre endógeno de meia vida curta e contribui de forma significativa na regulação de muitas funções corporais tais como: contratilidade muscular, metabolismo energético, mensageiro intercelular, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da agregação plaquetária, pressão arterial, fluxo sanguíneo e respiração mitocondrial. A suplementação com nitrato aumenta a disponibilidade de óxido nítrico no organismo, este por sua vez age sobre a mitocôndria promovendo efeitos importantes no consumo de oxigênio durante o exercício. Tem sido demonstrado que a suplementação dietética com nitrato acarreta aumento no tempo de exaustão durante exercícios de alta intensidade, melhora no desempenho em exercícios contrarrelógio e promove redução significativa no consumo de oxigênio pulmonar em intensidades submáximas. Por outro lado, apesar de haver tendência ao uso de suco de beterraba, não existe consenso em relação à forma de administração de nitrato, tampouco conformidade quanto a melhor dose resposta.

**Palavras-chave:** beterraba, nitrito e desempenho.

## **ABSTRACT**

The intake of nitrate has been growing in popularity in sports. This review aims to clarify the mechanisms responsible for the effect of nitrate supplementation related to nitric oxide, and to describe the acute and chronic effects of nitrate supplementation on exercise performance. Nitric oxide is an endogenous free radical short half- life and significantly contributes in regulating many body functions such as muscle contractility, energy metabolism, intercellular messenger, macrophage-mediated cytotoxicity, inhibition of platelet aggregation, blood pressure, blood flow and mitochondrial respiration. Nitrate supplementation increases the availability of nitric oxide in the body which acts on the mitochondria promoting important effects on oxygen uptake during exercise. It has been shown that nitrate supplementation causes an increase in time to exhaustion during high-intensity exercise, improving performance in time trials and promotes significant reduction in pulmonary oxygen uptake at submaximal intensities. Moreover, although there is a trend to the use of beet juice, there is no consensus on the mode of administration of nitrate, nor compliance as the best dose response.

**Key-words:** beetroot, nitrite and performance

## INTRODUÇÃO

Sabe-se que o óxido nítrico (NO), denominado inicialmente como um fator de relaxamento derivado do endotélio (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980), não necessita de receptor específico para agir sobre uma determinada célula. Sua atividade depende de sua concentração, reatividade química, proximidade das células alvo e a forma como as células alvo são programadas para responder (SUREDA, TAULER *et al.*, 2006). Dessa forma, ele age como uma molécula sinalizadora na regulação de muitas funções corporais tais como: contratilidade muscular, metabolismo energético, respiração mitocondrial, inibição da agregação plaquetária, pressão e fluxo sanguíneo (COOPER e GIULIVI, 2007).

De acordo com os efeitos supracitados, sugere-se que o NO seja capaz de interferir nas respostas fisiológicas durante o exercício, direta ou indiretamente, promovendo alterações importantes responsáveis pela melhora do desempenho esportivo. Acredita-se que os seus níveis nos tecidos são regulados pelo balanço entre a produção e o consumo, de maneira que atualmente existem evidências de duas vias de produção endógena de NO no organismo humano, sendo elas: 1) a via principal, onde o NO é produto da oxidação da L-arginina, numa reação catalisada pela classe de enzimas óxido nítrico sintases (NOS); 2) a via alternativa, em que parte do nitrato ingerido é absorvido na circulação, o qual é posteriormente secretado na saliva pelas glândulas salivares e reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) na cavidade oral. Esse nitrito salivar é deglutido e posteriormente convertido a NO por uma variedade de enzimas no sangue e tecidos. O NO produzido a partir da suplementação de nitrato age sobre a mitocôndria promovendo efeitos importantes no consumo de oxigênio durante o exercício físico (LARSEN, SCHIFFER *et al.*, 2011). Tem sido demonstrado que a suplementação dietética com nitrato acarreta aumento no tempo de exaustão durante exercícios de alta intensidade (KELLY, VANHATALO *et al.*, 2013), melhora no desempenho em exercícios contrarrelógios (LANSLEY, WINYARD, BAILEY *et al.*, 2011; CERMAK, GIBALA *et al.*, 2012) e produz uma redução significativa no consumo de oxigênio pulmonar em intensidades submáximas (LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011).

Assim, este trabalho tem por objetivo revisar as principais vias de obtenção do NO, seus efeitos fisiológicos e o uso da suplementação de nitrato, enquanto precursor do NO, sobre o desempenho nas diferentes modalidades esportivas e protocolos de exercício.

## VIAS DE OBTENÇÃO DO NO

Como supracitado, os níveis de NO nos tecidos são regulados por duas vias de produção endógena: a via principal, a partir da L-arginina, e a via alternativa que utiliza nitrato como precursor.

### 1) A partir da L-Arginina:

O NO é produto da oxidação da L-arginina, numa reação catalisada pela classe de enzimas óxido nítrico sintases (NOS). Essa reação é dividida em dois estágios, onde no primeiro há conversão de L-arginina em N-Hidroxi-L-arginina e no segundo há formação de L-Citrulina e NO. Ambas as reações são de oxidação e necessitam de O<sub>2</sub> e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para captar os elétrons, sendo dois elétrons na primeira reação e três na segunda (Fig. 1).

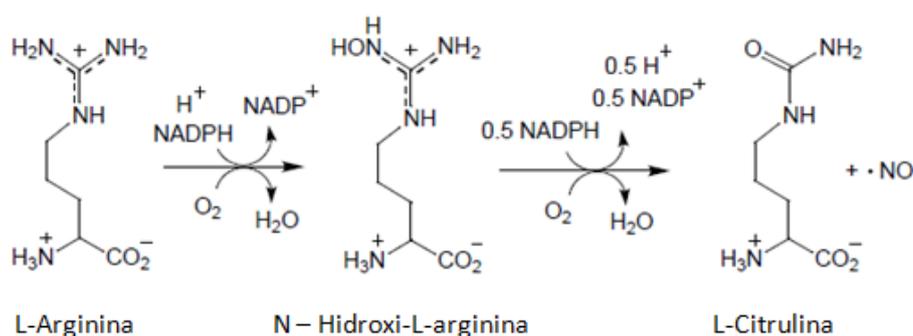


Figura 1. Reações de formação de NOS a partir da L-Arginina.

Em todo o corpo, diferentes tipos de células são capazes de sintetizar o NO por meio de hemoproteínas da família citocromo P450, as NOS (FARRELL e BLAKE, 1996). Atualmente foram identificadas três isoformas de NOS, todas utilizando L-arginina como substrato e O<sub>2</sub> como co-substrato, sendo duas constitutivas e uma induzível: 1) tipo I, NOS neuronal (nNOS); 2) tipo II, NOS induzível (iNOS) e; 3) Tipo III, NOS endotelial (eNOS). Os tipos nNOS e eNOS são enzimas constitutivas normalmente presentes na célula e são controladas por Ca<sup>2+</sup>/calmodulina intracelular, enquanto a iNOS é independente de Ca<sup>2+</sup> e está presente em muitas células envolvidas na imunidade e inflamação, além de produzir altos níveis de NO quando ativadas, em comparação com as isoformas constitutivas.

As NOS produzem NO e L-citrulina por catalisar a oxidação de cinco elétrons da L-arginina numa série de reações na presença de O<sub>2</sub> e NADPH, tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e heme como cofatores (SCHMIDT, KLEIN *et al.*, 1988; FARRELL e BLAKE, 1996; VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010). A L-citrulina por sua vez pode ser reciclada em arginina por meio da ação combinada da arginino succinato sintase (ASS) e arginino succinato liase (ASL) em quase todos os tipos de células e em diferentes graus (Figura 2). Portanto, arginina e citrulina auxiliam a síntese de NO em uma variedade de tecidos (WU e MORRIS, 1998; MORI e GOTOH, 2000).

A nNOS, presente principalmente em células neuronais, regula a transmissão sináptica no sistema nervoso central (SNC) e atua na regulação central da pressão sanguínea, no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação via nervos periféricos (FORSTERMANN, CLOSS *et al.*, 1994). Já a produção de NO pelo eNOS é essencial para a manutenção da homeostase do sistema cardiovascular e tônus vasodilatador basal (KELM e SCHRADER, 1990; QUYYUMI, DAKAK *et al.*, 1995; SCHULZ, ANTER *et al.*, 2004) e sua expressão aumenta com o exercício regular (GREEN, MAIORANA *et al.*, 2004). Este NO por sua vez inibe a agregação de plaquetas, aderência de leucócitos às células endoteliais, proliferação do músculo liso, modula a respiração, e exerce efeito antioxidante e atividade anti-inflamatória (LIAUDET, SORIANO *et al.*, 2000; ALONSO e RADOMSKI, 2003; GUZIK, KORBUT *et al.*, 2003; LANDMESSER, HORNIG *et al.*, 2004).

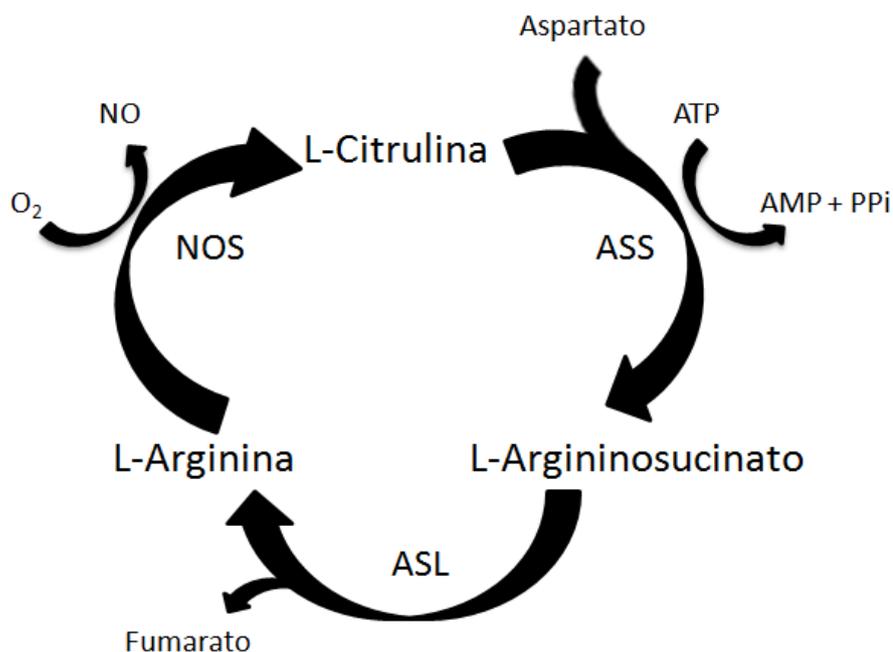


Figura 2. Reciclagem da L-Arginina. NOS: Óxido nítrico sintase; ASS: Arginino succinato sintase e ASL arginino succinato liase.

## 2) A partir do nitrato:

A via alternativa para obtenção de NO utiliza parte do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), em particular do exógeno, que após a ingestão é completamente absorvido para a corrente sanguínea pelo trato gastrointestinal superior, onde se mistura com nitrato sintetizado endogenamente. Cerca de 25% do nitrato presente no plasma é secretado na saliva pelas glândulas salivares (LUNDBERG e GOVONI, 2004). Após a ingestão, o nitrato salivar atinge concentração de 10-20 vezes maior que seus níveis plasmáticos basais (TANNENBAUM, WEISMAN *et al.*, 1976). O pico de concentração de  $\text{NO}_3^-$  é atingido por volta de 120min após sua ingestão, e sua meia-vida no plasma é de ~8h (WEBB, PATEL *et al.*, 2008). Em seguida, esse nitrato é reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) por bactérias anaeróbias facultativas presentes na cavidade oral que utilizam nitrato como aceptor final de elétrons para gerar ATP em condições de baixa oxigenação (DUNCAN, DOUGALL *et al.*, 1995). Esta redução é muito eficaz e aproximadamente 100% do nitrato é convertido em nitrito. Por sua vez, o pico de nitrito é atingido por volta de 150 minutos após ingestão do nitrato. Esse nitrito salivar é deglutido e posteriormente convertido a NO por uma variedade de enzimas no sangue e

tecidos. Estas incluem desoxihemoglobina presente no sangue, neuroglobina, xantina-oxidorreductase, aldeído-oxidase e NOS também nas proteínas tissulares (COOPER e GIULIVI, 2007). Por último, os componentes da cadeia respiratória nas mitocôndrias também são capazes de converter nitrito em NO, atuando como carreadores de elétrons quando o nitrito é reduzido (REUTOV e SOROKINA, 1998; KOZLOV, STANIEK *et al.*, 1999; NOHL, STANIEK *et al.*, 2000).

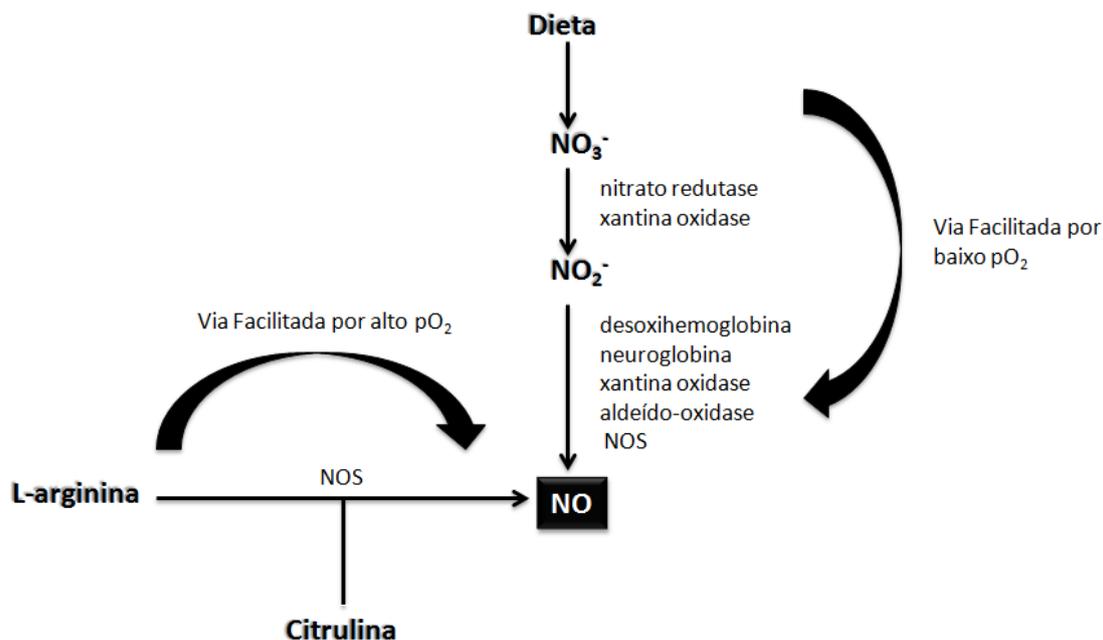


Figura 3: Vias de obtenção do NO, destacando a via do nitrato ingerido. NOS: Óxido nítrico sintetase;  $\text{NO}_3^-$ : Nitrato;  $\text{NO}_2^-$ : Nitrito; pO<sub>2</sub>: Pressão parcial de oxigênio.

A relevância da via alternativa de obtenção do NO consiste no fato de que enzimas eNOS e nNOS expressas no músculo esquelético, apresentam a Km para O<sub>2</sub> de 2.3 e 202 Torr, respectivamente (VANHATALO, FULFORD *et al.*, 2010). Durante o exercício, o músculo esquelético consome rapidamente o O<sub>2</sub> de forma que a pressão parcial de oxigênio (pO<sub>2</sub>) pode atingir 2-5 Torr. Nessas condições a atividade da eNOS é em parte preservada, enquanto a atividade de nNOS pode ser reduzida, fato que limita potencialmente o fornecimento de NO por essa via. A via nitrato-nitrito-NO apresenta um menor número de etapas de limitação comparada à via principal, sendo potencializada em condições de níveis de oxigênio diminuído na microcirculação, de tal modo que é preferível para a produção de NO durante exercício (GILCHRIST, WINYARD *et al.*, 2010).

## EFEITOS FISIOLÓGICOS DO NO

O NO medeia vários fenômenos como: vasorrelaxamento dependente do endotélio, regulação da pressão sanguínea basal (IGNARRO, ADAMS *et al.*, 1986); inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária (MONCADA e HIGGS, 2006); defesa contra organismos infecciosos; atividade funcional, crescimento e morte de muitas células imunológica (COLEMAN, 2001); inibição da respiração mitocondrial (BOLANOS, PEUCHEN *et al.*, 1994; BROWN e COOPER, 1994; CLEETER, COOPER *et al.*, 1994); competição com citocromo c oxidase, redução no custo de ATP na produção de força muscular (GALLER, HILBER *et al.*, 1997).

De acordo com os efeitos supracitados, sabe-se que o NO é capaz de interferir nas respostas fisiológicas durante o exercício, direta e indiretamente, promovendo alterações importantes responsáveis por melhorar o desempenho, como: vasodilatação, e consequente aumento de fluxo sanguíneo, aumento da captação da glicose pelo músculo esquelético, redução na razão ATP/força muscular, melhora na fosforilação oxidativa e diminuição do consumo de oxigênio (WONG e MARSDEN, 1996; BAILEY, FULFORD *et al.*, 2010; MERRY, LYNCH *et al.*, 2010; LARSEN, SCHIFFER *et al.*, 2011).

No sistema cardiovascular, após ser liberado pelo endotélio o NO pode se ligar ao grupo heme da guanilato ciclase solúvel (sGC) produzindo Guanosina Monofosfato Cíclico (cGMP) este por sua vez ativa a proteína quinase G dependente de cGMP (cGK). Essa via sGC/cGMP/cGK (IGNARRO, ADAMS *et al.*, 1986) por meio da cGK, diminui a concentração de cálcio intracelular, o que leva a um relaxamento do músculo liso vascular e aumento no fluxo sanguíneo tecidual. Em nível coronário a inibição da produção de NO eleva a resistência vascular coronariana, indicando contribuição no mecanismo de controle basal vasodilatador e fluxo sanguíneo nesta região (LUIKING, ENGELEN *et al.*, 2010). O NO também contribui para regulação do tônus vascular na circulação sistêmica (LAUER, PREIK *et al.*, 2001) demonstrada pelo rápido aumento da pressão arterial e o consumo de oxigênio nos tecidos quando a produção endógena de NO está bloqueada (REES, PALMER *et al.*, 1989; SHEN, TIAN *et al.*, 2001). Esse efeito vasodilatador parece ser mantido por estímulos físicos do fluxo pulsátil e força de cisalhamento nas células endoteliais vasculares (WONG e MARSDEN, 1996). Esse efeito beneficia o processo de contração muscular, através da íntima

relação entre fluxo sanguíneo (MACKIE e TERJUNG, 1983), aumento da frequência de contração e aumento da velocidade de corrida (LAUGHLIN e ARMSTRONG, 1982).

No músculo esquelético o NO pode modular o metabolismo de carboidratos por mediar aumento na captação da glicose via sGC/cGMP/cGK (MARTIN E YOUNG, 1998), permitindo maior disponibilidade desse substrato para formação de ATP e consequente maior tempo de sustentação do exercício (BERGSTROM, HERMANSEN *et al.*, 1967). Durante a contração do músculo esquelético em ratos a concentração de cGMP aumenta, e isso não ocorre após inibição de NOS (LAU, GRANGE *et al.*, 2000) indicando uma relação direta com NO. Dessa forma, um aumento de NO e sGC aumenta a formação de cGMP e captação de glicose, enquanto a inibição de sGC promove a redução na captação de glicose (KINGWELL, FORMOSA *et al.*, 2002).

Por outro lado, o uso de inibidor de sGC não foi efetivo em diminuir a captação de glicose durante a contração (MERRY, LYNCH *et al.*, 2010). Além disso, um inibidor de cGK também não afetou a captação de glicose durante a contração, indicando que o NO pode ativar essa captação por via independente da NO/cGMP/cGK (MERRY, LYNCH *et al.*, 2010). Possivelmente, esses mecanismos estão relacionados com modificações pós-translacionais de proteínas através de S-nitrosilação, S-glutathionylation e nitração de tirosina.

Embora o mecanismo completo da relação entre NO e músculo esquelético não tenha sido totalmente elucidado, um número de diferentes investigadores notaram que o NO pode desempenhar um papel na modulação da função contrátil (KOBZIK, REID *et al.*, 1994; MURRANT, WOODLEY *et al.*, 1994; MORRISON, MILLER *et al.*, 1996). Em relação ao receptor de rianodina (canal de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ ), a atuação do NO é mais complexa, realizando tanto ativação quanto inativação. Dessa forma, os seus efeitos podem estar relacionados com a concentração de NO, o potencial de membrana e o grau de ativação do canal (HART e DULHUNTY, 2000). Existem também evidências que NO diminui a velocidade de desacoplamento das pontes cruzadas (HEUNKS, CODY *et al.*, 2001). Isso reduz o custo de ATP na produção de força muscular durante o exercício (BAILEY, FULFORD *et al.*, 2010), melhorando assim a eficiência metabólica (CERMAK, GIBALA *et al.*, 2012). Além disso, o NO pode reduzir a hidrólise de ATP para mesma carga de trabalho, fato que leva a menor degradação de fosfocreatina (PCr) e menor acúmulo de ADP e Pi. O que atenua o estímulo para fosforilação oxidativa e o consumo de oxigênio ( $\text{VO}_2$ ) (BAILEY,

FULFORD *et al.*, 2010) e permite a manutenção do exercício visto que a redução de PCr e elevação de ADP e Pi são mecanismos responsáveis pela interrupção do exercício por fadiga periférica (FINSTERER, 2012).

No que se refere à mitocôndria, o NO e seus derivados inibem a respiração (BROWN e COOPER, 1994). Em concentrações nanomolares, o NO inibe citocromo c oxidase reversivelmente competindo com O<sub>2</sub>. Altas concentrações de NO levam a produção de peroxinitrito que por sua vez inibe complexo I e II. Graças a esses efeitos, Clerc *et al.*, 2007 (CLERC, RIGOULET *et al.*, 2007) ao avaliar a relação entre consumo de oxigênio, síntese de ATP e potencial elétrico transmembrana em mitocôndria de fígados de ratos, confirmaram que o NO induz a uma restrição cinética do citocromo c oxidase maior que a diminuição da síntese de ATP, resultando em aumento da eficiência da fosforilação oxidativa.

Ainda, o NO pode melhorar a eficiência da fosforilação oxidativa por redução do "deslizamento" das bombas de prótons mitocondriais ou atenuando a expressão de proteínas de desacoplamento (CLERC, RIGOULET *et al.*, 2007). Outro estudo que contribui com essa questão foi o realizado por Larsen *et al.*, 2011 (LARSEN, SCHIFFER *et al.*, 2011) que após suplementação de nitrato encontrou redução da expressão do translocador de adenosina-nucleotídeo (ANT), o que indica menor vazamento de prótons, e aumento da razão fosfato/oxigênio, ou seja, maior quantidade de ATP produzida por oxigênio consumido (LARSEN, SCHIFFER *et al.*, 2011).



Figura 4: Possíveis efeitos do óxido nítrico no músculo esquelético. FO: Fosforilação oxidativa; P/O: Razão fosfato/oxigênio.

## SUPLEMENTAÇÃO DE NITRATO, EXERCÍCIO FÍSICO E DESEMPENHO

O NO, por ser um radical livre de meia vida curta, é administrado de forma indireta, por meio de suplementos que após a ingestão são convertidos em NO. O principal deles é o nitrato que pode ser administrado tanto em forma de sal (nitrato de sódio -  $\text{NaNO}_3$  ou nitrato de potássio -  $\text{KNO}_3$ ) quanto pela ingestão de alimentos ricos em nitrato, como o suco de beterraba.

Quando em forma de sal, o  $\text{NaNO}_3$  tem sido utilizado entre os estudos de forma predominante, em comparação ao  $\text{KNO}_3$ , este último utilizado em apenas um estudo da presente revisão (PEACOCK, TJONNA *et al.*, 2012). Suas concentrações variam de 10mg/kg de peso corporal (BESCOS, RODRIGUEZ *et al.*, 2011; BESCOS, FERRER-ROCA *et al.*, 2012), 0,1 mmol/ kg de peso corporal (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2007; LARSEN, SCHIFFER *et al.*, 2011), 0,033 mmol/kg de peso corporal (Larsen *et al.*, 2010). Os sais são dissolvidos em água com baixa concentração de nitrato.

Porém, muitos estudos realizaram suplementação por ingestão de suco de beterraba, neste caso, a concentração varia entre 4,1 mmol e 16 mmol de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (CERMAK, GIBALA *et al.*, 2012; WYLIE, KELLY *et al.*, 2013; WYLIE, MOHR *et al.*, 2013). Quanto ao volume das bebidas, há uma variação entre 0,07 e 0,5L (WILKERSON, HAYWARD *et al.*, 2012; MUGGERIDGE, HOWE *et al.*, 2013) administrada de forma aguda (2,5h antes do exercício) (KELLY, FULFORD *et al.*, 2013) e crônica (15 dias) (VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010) onde a maior parte dos estudos suplementa durante 6 dias (LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011; BOND, MORTON *et al.*, 2012; MASSCHELEIN, VAN THIENEN *et al.*, 2012; BREESE, MCNARRY *et al.*, 2013).

Mediante os diferentes efeitos fisiológicos causados pelo NO, foi cogitado o seu importante papel durante o exercício físico (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2007). Vários pesquisadores têm investigado se a oferta de nitrato, precursor de NO, afeta parâmetros metabólicos ou circulatórios durante o exercício em seres humanos (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2007; BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; BAILEY, FULFORD *et al.*, 2010; VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010; LANSLEY, WINYARD, BAILEY *et al.*, 2011).

Dos vinte e cinco estudos avaliados na presente revisão, doze apresentaram algum tipo de melhora no desempenho esportivo, seja no tempo até a exaustão (BAILEY, FULFORD *et al.*, 2010; VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010; LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011; VANHATALO, FULFORD *et al.*, 2011; MASSCHELEIN, VAN THIENEN *et al.*, 2012; BREESE, MCNARRY *et al.*, 2013; KELLY, FULFORD *et al.*, 2013; WYLIE, KELLY *et al.*, 2013; THOMPSON, TURNER *et al.*, 2014); no tempo de prova (LANSLEY, WINYARD, BAILEY *et al.*, 2011; BOND, MORTON *et al.*, 2012; CERMAK, GIBALA *et al.*, 2012); na velocidade média (MURPHY, ELIOT *et al.*, 2012); na potência pico (VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010) ou na distância percorrida (WYLIE, MOHR *et al.*, 2013). Porém, onze estudos apresentaram uma melhora não significativa do desempenho esportivo, seja (1) no tempo até a exaustão (BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2010; BESCOS, RODRIGUEZ *et al.*, 2011; WYLIE, KELLY *et al.*, 2013); (2) no tempo de prova (BOND, MORTON *et al.*, 2012; WILKERSON, HAYWARD *et al.*, 2012; CHRISTENSEN, NYBERG *et al.*, 2013; MUGGERIDGE, HOWE *et al.*, 2013; MUGGERIDGE, HOWE *et al.*, 2014); (3) na distância percorrida (VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010; BESCOS, FERRER-ROCA *et al.*, 2012; WYLIE, MOHR *et al.*, 2013); (4) na taxa máxima de trabalho (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2007). Apenas dois estudos que

avaliaram potência (CERMAK, RES *et al.*, 2012; PEACOCK, TJONNA *et al.*, 2012) e tempo de prova (PEACOCK, TJONNA *et al.*, 2012) não encontraram melhora no desempenho esportivo.

**Tabela 1.** Resumo dos estudos que investigaram o efeito da suplementação de  $\text{NO}_3^-$  sobre o exercício físico.

Referência	Tipo de atividade / protocolo de exercício	Desenho do estudo	Amostra/ nível de aptidão	Protocolo de suplementação	$\text{VO}_2$	Desempenho
LARSEN et al. 2007	Cicloergômetro / Teste incremental e submáximo (45, 60, 70,80 e 85% do $\text{VO}_{2\text{max}}$ ) 5min de duração cada	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	9 homens treinados	3 dias dieta com alta $[\text{NO}_3^-]$ + supl (3x ao dia 0,033 mmol /kg de $\text{NaNO}_3$ - NR) + 60' antes (NR)	Média das intensidades de 45, 60, 70 e 80% do $\text{VO}_{2\text{max}}$ :  NIT:2,82 ± 0,58 l/min  PL:2,9 ± 0,57 l/min*†	Carga máxima, teste incremental (W):  NIT 360,6 ± 32,8  PL 358,9 ± 32,3
				<i>Versus</i>		
				3 dias dieta com baixa $[\text{NO}_3]$ + PL (NaCl) 60' antes		
LARSEN et al. 2010	Cicloergômetro para braço e perna / Teste incremental	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	7 homens e 2 mulheres (NR)	2 dias dieta com baixa $[\text{NO}_3]$ + supl: 3 x 0,033 mmol /kg/dia de $\text{NaNO}_3$ -NR + 40' antes (NR).	$\text{VO}_{2\text{max}}$  NIT:3,62 ± 0,31l/min  PL:3,72 ± 0,33l/min*	Tempo até exaustão, teste incremental (s):  NIT: 563 ± 30  PL: 524 ± 31
				<i>Versus</i>		
				2 dias dieta com baixa $[\text{NO}_3]$ + PL (NaCl): 3 x 0,033 mmol kg/dia + 0,033 mmol 40'		

antes.

BAILEY et al. 2009	Cicloergômetro / Teste moderado 80% do LL (6min) e muito pesado 70%Δ (até exaustão)	Duplo-cego, <i>crossover</i>	8 homens recreacion almente treinados	6 dias	Moderado:	Tempo até exaustão (s):
				Suco de beterraba	NIT:1,45 ± 0,1 l/min	NIT:675 ± 203
				5,5 mmol/dia de NO <sub>3</sub> -0,5L	PL: 1,52 ± 0,12 l/min*	PL:583 ± 145*
				<i>Versus</i>	Pesado:	
				Suco de Groselha (NR)	NIT: 3,82 ± 0,28 l/min	
					PL:3,87 ± 0,29 l/min	
BAILEY et al. 2010	Ergômetro de extensão de joelho / Baixa intensidade 15% e  Alta intensidade 30% da CVM	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	7 homens recreacion almente treinados	6 dias	Baixa intensidade	Tempo até exaustão (s):
				Suco de beterraba	NIT:778 ± 38 ml/min	NIT:734 ±109
				5,5 mmol/dia de NO <sub>3</sub> -0,5L	PL:870 ± 42 ml/min*	PL:586 ± 80*
				<i>Versus</i>	Alta intensidade	
				Suco de Groselha(NR)	NIT:1,460 ± 54 ml/min	
					PL:1,692 ± 70 ml/min*	

VANHATA LO et al. 2010	Cicloergômetro / Teste moderado 90%LL (5min)	Dublo-cego, <i>crossover</i>	5 homens, três mulheres (NR)	15 dias	90%LL	Potência pico (W):
	Teste incremental			Suco de beterraba 2x 5,2 mmol/dia de NO <sub>3</sub> 250 ml + 0,5l-2,5h antes	NIT:1,37 ± 0,23 l/min PL:1,43 ± 0,23 l/min*	NIT:331 ± 68 PL:323 ± 68*
<i>Versus</i>						
Suco de Groselha(NR)						
BESCOS et al. 2011	Cicloergômetro / Submáximo 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 W/kg de peso (6min)	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	11 homens treinados	3h antes	2,0kg de peso	Tempo até exaustão (s):
	Teste incremental			10 mg/kg de peso de NaNO <sub>3</sub> - 250 ml	NIT:2,33 ± 0,26 l/min PL:2,37 ± 0,23 l/min	NIT:416 ± 32 PL:409 ± 27
<i>Versus</i>						
2,5kg de peso						
10 mg/kg de peso de NaCl - 250 ml						
NIT:2,74 ± 0,22 l/min PL:2,81 ± 0,28 l/min						

3,0kg de peso

NIT:3,19 ± 0,27 l/min

PL:3,29 ± 0,29 l/min

3,5kg de peso

NIT:3,68 ± 0,32 l/min

PL:3,74 ± 0,33l/min

Incremental:

NIT:4,64 ± 0,35 l/min

PL:4,82 ± 0,33 l/min\*

LANSLEY et al. 2010	Esteira / 4 km/h (6min e 10min)	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	9 homens recreacion almente treinados	6 dias:	4 km/h:	Tempo até exaustão 75%Δ (s):
	80%LL (6min)			Suco de beterraba	NIT:0,70 ± 0,10 l/min	NIT:456 ± 90
	75%Δ (6min e até exaustão)			~6,2 mmol de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /dia + 3horas antes	PL:0,87 ± 0,12 l/min*	PL:522 ± 108*
	Ergômetro de extensão do joelho /			<i>Versus</i>	80%LL	Tempo até exaustão, teste incremental (s):
					NIT:2,10 ± 0,28 l/min	NIT:510 ± 48

	Teste incremental			Suco de beterraba depletado	PL: 2,26±0,27 l/min*	PL:492 ± 54
				~0,003 mmol de NO <sub>3</sub> -0,5l/dia + 3horas antes.	75%Δ NIT:3,50 ± 0,62 l/min PL:3,77 ± 0,57 l/min*	
LANSLEY et al. 2011	Cicloergômetro / TT4 de 16.1-km	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	9 homens (NR)	~2,75h antes Suco de beterraba 6,2mmol de NO <sub>3</sub> -0,5L	VO <sub>2max</sub> 4km NIT:4.46 ± 0.50 l/min PL:4.36 ± 0.47 l/min	Tempo de prova 4km (s): NIT:376,2 ± 21 PL:387 ± 25,2*
				<i>Versus</i> Suco de beterraba depletado ~0.0047 de NO <sub>3</sub> -0,5L	16km NIT:4.23±0.47 l/min PL:4.19±0.56l/min	Tempo de prova 16km (s): NIT:1.614±108 PL:1.662±126 *
VANHATA LO et al. 2011	Extensão de Joelho / Extensão até	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	7 homens, 2 mulheres moderada mente	3x : 24 h, 12 h e 2.5 h antes Suco de beterraba	NR	Tempo até exaustão (s): NIT:477 ± 200

exaustão

treinados

9.3 mmol de NO<sub>3</sub>- 0,75L

PL: 393 ± 169\*

*Versus*

Suco de beterraba

depletado

3x : 24 h, 12 h e 2.5 h antes

~ 0.006 mmol de NO<sub>3</sub>MASSCHEL  
EIN et al.  
2012Cicloergômetro /  
Submáximo  
Teste incrementalRandomizado,  
cego,  
*crossover*15 homens  
moderada  
mente  
treinados

6dias

Suco de beterraba

4x ~100 ml 0.07 mmol/kg de  
peso de NO<sub>3</sub> + 0,5L, 1-2 horas  
antes

NIT:1,95 ± 0,06 l/min

PL:2,03 ± 0,06 l/min\*

Tempo até exaustão (s):

NIT:597 ± 22

PL: 568 ± 23 \*

*Versus*

Suco de beterraba

depletado

4x ~100 ml <5 μmol de NO<sub>3</sub> +

0,5L, 1-2 horas antes						
CERMAK et al. 2012	Cicloergometro /	Duplo-cego, <i>crossover</i>	12 homens (NR)	6dias	45%	Tempo de prova (s):
	Submáximo			Suco de beterraba	NIT: $1,92 \pm 0,06$ l/min	NIT: $953 \pm 18$
	45% e 65% W <sub>max</sub> (30min)			2x 70 ml ~8 mmol de NO <sub>3</sub> +2,5h antes 2x 70 ml ~8 mmol de NaNO <sub>3</sub>	PL: $2,02 \pm 0,09$ l/min*	PL: $965 \pm 18^*$
	TT 10km				65%	
					NIT: $2,94 \pm 0,12$ l/min	
				<i>Versus</i>	PL: $3,11 \pm 0,12$ l/min*	
				Suco de beterraba		
				depletado		
				2x 70ml (NR) +2,5h antes 2x 70ml NO <sub>3</sub> depletado (NR)		
CERMAK et al. 2012	Cicloergômetro /	Duplo-cego, <i>crossover</i>	20 homens treinados	2,5h antes	NR	Potência (W):
	TT~1h			Suco de beterraba	NIT: $275 \pm 7$	
				140 ml de ~8.7 mmol NO <sub>3</sub>	PL: $278 \pm 7$	

*Versus*

Suco de beterraba

depletado

140 ml de 0.004 mmol de NO<sub>3</sub>

BESCOS et al. 2012	Cicloergômetro / TT 40min	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	13 homens treinados	3 dias  10 mg/kg de peso NaNO <sub>3</sub> + 3horas antes 10 mg/kg de peso NaNO <sub>3</sub> (NR)	NR	Distância (km):  NIT:26,4 ± 1,1  PL:26,3 ± 1,2
				<i>Versus</i>		
				10mg/kg de peso NaCl + 3horas antes 10 mg/kg de peso NaCl		
BOND et al. 2012	Remo ergômetro / TT 500m	Randomizado, <i>crossover</i>	14 homens treinados	6dias Suco de beterraba  2x 250 ml/dia 5.5 mmol de NO <sub>3</sub>	NR	Tempo de prova (s):  NIT:89,40  PL: 90,19‡

				<i>Versus</i>		
				Suco de groselha		
				2x 250 ml/dia (depletado-NR)		
MURPHY et al. 2012	Esteira / TT 5km	duplo-cego, <i>crossover</i>	12 homens treinados	75min antes 200 g de beterraba, 500 mg NO <sub>3</sub>	NR	Velocidade média (km/h): NIT:12,3 ± 2,7 PL:11,9 ± 2,6
				<i>Versus</i>		
				200 g oxalicoco (depletado-NR)		Velocidade média (km/h) 3,2- 5,0km NIT:12,7 ± 3,0 PL:12,1 ± 2,8*
PEACOCK et al. 2012	Esteira / Submáximo ~55% do VO <sub>2</sub> max e ~75% do VO <sub>2</sub> max TT5km	Randomizado, duplo-cego	10 homens (NR)	2h antes Cápsula gelatinosa de KNO <sub>3</sub> (9.9 mmol/614 mg de NO <sub>3</sub> )	~55% do VO <sub>2</sub> max NIT:55 ± 5 l/min PL:55 ± 5 l/min	Tempo de prova (s): NIT:1005 ± 53 PL:996 ± 49
				<i>Versus</i>	~75% do VO <sub>2</sub> max	

					NIT:73 ± 9 l/min	
				Cápsula gelatinosa de 1g Maltodextrina	PL: 76 ± 5 l/min	
WILKERSON et al. 2012	Cicloergômetro / TT 50min	Randomizado, cego, <i>crossover</i>	8 homens treinados	2,5h antes Suco de beterraba  0,5L de 6.2 mmol de NO <sub>3</sub>	NIT:3,6 ± 0,4 l/min  PL:3,7 ± 0,4 l/min	Tempo de prova (s):  NIT:8.202 ± 336  PL:8.274 ± 384
				<i>Versus</i>		
				Suco de beterraba depletado  0,5L (NR)		
CHRISTENSEN et al. 2013	Cicloergômetro / Submáximo 70% Wpico  Testes de Sprints Repetidos  TT 400-kcal	Randomizado, cego, <i>crossover</i>	10 homens treinados	6dias  Suco de beterraba  0,5L ~0.5 g/dia de NO <sub>3</sub> + 3horas antes 0,5L ~0.5 g NO <sub>3</sub>	NIT:4.083 ± 297 ml/min  PL:4.106 ± 359 ml/min	Tempo de prova (s):  NIT:1.092,0  PL:1.102,2   Potência pico(W):



					100% Wpico	
					NIT: 4180 ± 390 ml/min	100% Wpico
					PL: 4119 ± 420 ml/min	NIT: 182 ± 37
						PL: 166 ± 26
MUGGERID GE et al. 2013	Caiaque ergômetro / Submáximo 60% Wmax (15min) TT 1km	Randomizado, <i>crossover</i>	8 homens treinados	3 horas antes Suco de beterraba 70ml ~5 mmol de NO <sub>3</sub>	60% Wmax NIT: 35,6 ± 2,5 ml/kg/min PL: 36,8 ± 2,4 ml/kg/min*	Tempo de prova (s): NIT: 276 ± 5s PL: 277 ± 5s
				<i>Versus</i>		
				Suco de tomate 70ml ~0.01 mmol de NO <sub>3</sub>		
MUGGERID GE et al. 2013	Cicloergômetro / Submáximo 60% Wmax TT 16.1km	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	9 homens (NR)	3 horas antes Suco de beterraba 70ml ~5 mmol de NO <sub>3</sub>	NIT: 2542 ± 114 ml/min PL: 2727 ± 85 ml/min*	Tempo de prova (s): NIT: 1664 ± 14 PL: 1702 ± 15
				<i>Versus</i>		

WYLIE et al. 2013	Yo-yo	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	14 homens treinados	Suco de tomate	NR	Distância (km): NIT:1.704 ± 0,3 PL:1.636 ± 0,2*
				70ml ~0,01 mmol NO <sub>3</sub>		
				Suco de beterraba		
				4.1 mmol de NO <sub>3</sub>		
				<i>Versus</i>		
				Suco de beterraba depletado		
				2,5h (140ml) e 1,5h (70ml) antes		
				~0.004 mmol de NO <sub>3</sub>		
BREESE et al. 2013	Cicloergômetro / Moderado 90%LL e Muito pesado 70%Δ	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	9 homens moderada mente treinados	6dias	90%LL	Tempo até exaustão (s):
				Suco de beterraba	NIT:1.70 ± 0.39 l/min	NIT: 521 ± 158
				140 ml ~8 mmol de NO <sub>3</sub>	PL:1.67 ± 0.37 l/min	PL: 635 ± 258*
				<i>Versus</i>	70%Δ	



THOMPSON et al. 2014	Cicloergômetro / Submáximo  50%, 70% e 90% $\dot{V}O_{2max}$ até exaustão	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	16 homens recreacion almente treinados	1,5 hora antes	$VO_2$	Tempo até exaustão (s):
				Suco de beterraba	50%	NIT: 185 ± 122
				450 ml ~5 mmol de $NO_3^-$ + 50ml de suco de maçã	NIT: 1,68 ± 0,29 l/min PL: 1,60 ± 0,26 l/min	PL: 160 ± 109*
				<i>Versus</i>		
				Suco de maçã	70%	
				45ml + 405ml de água (NR)	NIT: 2,65 ± 0,40 l/min PL: 2,70 ± 0,37 l/min	
		90%				
				NIT: 3,46 ± 0,55 l/min PL: 3,40 ± 0,60 l/min		

---

H: homem; M: mulher; T: treinado; MT: moderadamente treinado; NT: não treinado; RT: recreacionalmente treinado; NR: Não referido; TT: *time-trial* (contrarrelógio);  $NO_3^-$ : nitrato; NIT: nitrato; PL: placebo; EG: Eficiência grossa; TI: Teste incremental; LL: Limiar de lactato; CVM: contração voluntária máxima;  $\Delta$ : diferença entre o segundo limiar ventilatório e  $VO_{2max}$  † Valores não referidos isoladamente no artigo \*  $p < 0,05$ .

Mediante os diferentes efeitos promovidos pelo NO, Larsen et al., 2007 (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2007) foram os primeiros a avaliar seu papel durante o exercício físico. Nesse estudo, nove ciclistas consumiram 0,1 mmol/kg de massa corporal de NaNO<sub>3</sub> ou placebo durante 3 dias antes de realizar testes submáximos e máximos. Essa suplementação elevou os níveis plasmáticos de nitrato, reduziu a pressão sanguínea e custo de oxigênio do exercício sem alterar as concentrações sanguíneas de lactato, o que sugere maior eficiência do metabolismo oxidativo muscular. Bescos et al., 2011 (BESCOS, RODRIGUEZ *et al.*, 2011) ao realizar o mesmo procedimento de suplementação de NaNO<sub>3</sub> encontrou diminuição no consumo de oxigênio em teste incremental.

Além da suplementação de NaNO<sub>3</sub> verificada nos estudos supracitados, também foi analisado o efeito do suco de beterraba em diferentes modalidades de exercícios, onde a ingestão por seis dias, também reduziu o consumo de oxigênio em exercício submáximo além de reduzir o tempo de prova em teste contrarrelógio de 10 km (CERMAK, GIBALA *et al.*, 2012). O mesmo efeito foi encontrado por Lansley et al., 2011 (LANSLEY, WINYARD, BAILEY *et al.*, 2011) após suplementação aguda com suco de beterraba em contrarrelógio de 4 e 16.1km.

O efeito ergogênico do suco de beterraba também foi testado após 6 dias de ingestão de 0,5 l em repetições de 500m em remo ergômetro (BOND, MORTON *et al.*, 2012). Os autores concluíram que a suplementação com suco de beterraba trouxe vantagens no tempo de prova em relação ao placebo. Ainda, após suplementação aguda de nitrato, houve redução no consumo de oxigênio após teste submáximo realizado em caiaque ergômetro (MUGGERIDGE, HOWE *et al.*, 2013).

Em contra partida, boa parte dos estudos que não tiveram melhora significativa no desempenho esportivo apresentou redução no consumo de oxigênio pulmonar (VO<sub>2</sub>) (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2007; BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2010; VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010; BESCOS, RODRIGUEZ *et al.*, 2011; MUGGERIDGE, HOWE *et al.*, 2013; WYLIE, KELLY *et al.*, 2013; MUGGERIDGE, HOWE *et al.*, 2014). Os estudos que não apresentaram melhora significativa no consumo de oxigênio e desempenho foram realizados em indivíduos altamente treinados (BESCOS, FERRER-ROCA *et al.*, 2012; BOND, MORTON *et al.*, 2012; CERMAK, RES *et al.*, 2012; PEACOCK, TJONNA *et al.*, 2012; WILKERSON,

HAYWARD *et al.*, 2012; CHRISTENSEN, NYBERG *et al.*, 2013). Assim, talvez isso seja explicado pelo fato de que indivíduos treinados em *endurance* apresentam maior nível basal de nitrato e nitrito que seus homólogos destreinados (JUNGERSTEN, AMBRING *et al.*, 1997; BESCOS, RODRIGUEZ *et al.*, 2011), existindo uma provável relação com a maior atividade da NOS encontrada em sujeitos treinados (WADLEY, CHOATE *et al.*, 2007). Além disso, esses últimos apresentam maior vascularização muscular (JENSEN, BANGSBO *et al.*, 2004) minimizando, durante o exercício, a hipoperfusão que poderia levar a redução na oxigenação e pH, necessárias para estimular a via nitrato-nitrito-NO. Por último, um estudo que avaliou a resposta da ingestão de nitrato em ratos (HERNANDEZ, SCHIFFER *et al.*, 2012), sugeriu uma preferência dessa via por fibras musculares do tipo II, de forma que esse efeito pode ser atenuado em atletas de *endurance*, que apresentam maior proporção de fibras musculares do tipo I (TESCH e KARLSSON, 1985).

A ingestão oral de nitrato de sódio durante 2-3 dias mostrou redução no consumo de oxigênio pulmonar ( $VO_2$ ) durante exercício submáximo (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2010). Da mesma forma, a ingestão de 0,5L de suco de beterraba por dia durante 6 dias reduz o  $VO_2$  durante o exercício submáximo (BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010; LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011) e o custo de ATP na produção de força muscular, sugerindo maior eficiência contrátil (BAILEY, FULFORD *et al.*, 2010). Como relatado previamente, muitos estudos encontraram redução similar no  $VO_2$  em exercício submáximo evidente após a ingestão aguda (2,5 horas) de única dose de 0,5L de suco de beterraba que persiste por 15 dias de suplementação (VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010).

Dessa forma, o nitrato surge com potencial efeito ergogênico, promovendo elevação nos tempos de exaustão em cicloergômetro (BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; BREESE, MCNARRY *et al.*, 2013), tempo de prova em teste contrarrelógio (4, 10 e 16,1km) (CERMAK, GIBALA *et al.*, 2012) e *yo-yo test* (WYLIE, MOHR *et al.*, 2013). Além disso, reduz o consumo de oxigênio de pico em teste incremental em cicloergômetro de braço e perna (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2010), e consumo de oxigênio durante caminhada (4km/h) (LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011), corrida (80% do LL e 75% do  $\Delta$ ) (LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011), extensão de joelho (15- 30% da CVM) (BAILEY, FULFORD *et al.*, 2010), ciclismo (90% do LL, 45 e 65%

do  $VO_2\text{max}$ ) (CERMAK, GIBALA *et al.*, 2012) e canoagem (60% da potência aeróbia máxima) (MUGGERIDGE, HOWE *et al.*, 2013).

Como descrito previamente, não existe consenso quanto à forma de administração de nitrato, apesar de existir uma tendência ao uso de suco de beterraba. Por último, as diferenças nos protocolos experimentais promovem incertezas quanto aos efeitos do nitrato sobre o desempenho.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O NO é um potente sinalizador celular envolvido em diversas reações no organismo. Evidências indicam que o nitrato, precursor de NO, tem uma gama de efeitos benéficos e tem demonstrado um potencial efeito ergogênico sobre o exercício. Os resultados dos artigos analisados na presente revisão apontam que a suplementação de nitrato é menos eficiente em atletas treinados em *endurance*, existindo maior eficácia em indivíduos pouco treinados. Por outro lado, não está claro em qual intensidade de exercício o efeito é potencializado, visto que algumas não foram avaliadas como, por exemplo, os domínios severo (acima do  $VO_2\text{max}$ ) e pesado (entre o primeiro e segundo limiar ventilatório). Com relação à suplementação, para maioria dos voluntários o suco de beterraba foi escolhido onde a dose de ~8 mmol parece ser suficiente para resposta positiva, sendo observado que a dose de 16,8 mmol não promove efeitos adicionais, a ingestão deve ser realizada entre 2,5-3 horas antes do exercício, além disso, os resultados dos estudos apontam que a suplementação crônica não potencializa os efeitos da suplementação.

**2º artigo: artigo de resultados**

GHIARONE, T; LIMA-SILVA, AE. Impacto da suplementação aguda de nitrato sobre a cinética do consumo de oxigênio nos domínios moderado, pesado, muito pesado e severo do esforço físico: um estudo randomizado, crossover e duplo cego

**Revista pretendida:** Medicine & Science and Sports & Exercise

## RESUMO

O óxido nítrico é um radical livre endógeno de meia vida curta envolvido em inúmeros processos fisiopatológicos. A suplementação com nitrato aumenta a disponibilidade de óxido nítrico no organismo, este por sua vez age sobre as mitocôndrias promovendo redução no consumo de oxigênio durante o exercício, mas não se sabe ainda até que ponto isso é dependente da intensidade de esforço. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da suplementação aguda de nitrato sobre a cinética de  $\text{VO}_2$  nos domínios moderado, pesado, muito pesado e severo. Além disso, foi avaliado o efeito da suplementação aguda de nitrato sobre o tempo até a exaustão no domínio muito pesado e severo (desempenho). Para isso, onze voluntários fisicamente ativos foram submetidos a suplementação de nitrato e placebo, separados por 72h, por meio de um estudo contrabalançado, randômico e duplo cego. Foram encontradas reduções na amplitude e ganho do componente lento no domínio pesado. Contudo, os parâmetros cinéticos avaliados não foram diferentes entre as condições nitrato e placebo nos domínios moderado, muito pesado e severo. Por último, o tempo de exaustão nos domínios muito pesado e severo não diferiram entre as condições nitrato e placebo. Os resultados desse estudo indicam que suplementação de nitrato apresenta efeito restrito ao domínio pesado, reduzindo a amplitude e o componente lento.

**Palavras-chave:** óxido nítrico, suco de beterraba e desempenho.

## ABSTRACT

Nitric oxide is an endogenous free radical with a short half-life and is involved in numerous pathophysiological processes. The nitrate supplementation increases the availability of nitric oxide into the body, which in turn acts on the mitochondria promoting important effects on oxygen uptake during exercise. However, it is still unknown where this effect is exercise-intensity-dependent. The aim of this study was to investigate the effects of acute nitrate supplementation on  $\text{VO}_2$  kinetics in moderate, heavy, very heavy and severe domains. In addition, it was evaluated the effect of acute nitrate supplementation on time to exhaustion during very heavy and severe domains (performance). Eleven physically active volunteers, were supplemented with either nitrate or placebo, separated by 72 hours, in a randomized, double-blind and crossover design. We found reduction in the amplitude and gain of the slow component in the heavy domain. However, the parameters of  $\text{VO}_2$  kinetics were not different between nitrate and placebo in the moderate, very heavy and severe domains. Finally, the time to exhaustion in the very heavy and severe domains did not differ between nitrate and placebo. The results of this study indicate that nitrate supplementation has an effect restricted on heavy domain, reducing amplitude and slow component

**Key –words:** nitric oxide, beet juice, nitrate and performance

## 1 INTRODUÇÃO

O Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) inorgânico, abundante em vegetais de folhas verdes, era conhecido de forma predominante como uma molécula indesejada na dieta, com potenciais efeitos nocivos, tais como metahemoglobinemia e câncer (LUNDBERG, WEITZBERG *et al.*, 2008). No entanto, durante a última década, estudos publicados na literatura têm demonstrado que o nitrato é fisiologicamente reciclado no sangue e tecidos para agir como substrato alternativo na produção de óxido nítrico (NO) (LUNDBERG e GOVONI, 2004).

O NO contribui de forma significativa na regulação de muitas funções corporais tais como: contratilidade muscular, metabolismo energético, respiração mitocondrial, inibição da agregação plaquetária, pressão e fluxo sanguíneo (COOPER e GIULIVI, 2007). Seus níveis nos tecidos são regulados pelo balanço entre a produção e o consumo, de maneira que atualmente existem evidências de duas vias de produção endógena de NO: 1) na principal, o NO é produto da oxidação da L-arginina, numa reação catalisada pela classe de enzimas óxido nítrico sintases (NOS) (ALDERTON, COOPER *et al.*, 2001) e; 2) na via alternativa, o NO é produzido a partir do nitrato absorvido para a circulação, o qual é posteriormente secretado na saliva pelas glândulas salivares (TANNENBAUM, WEISMAN *et al.*, 1976) e reduzidos a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) por meio de bactérias anaeróbias facultativas presentes na cavidade oral (DUNCAN, DOUGALL *et al.*, 1995).

O  $\text{NO}_2^-$  é convertido em NO no estômago (MCKNIGHT, SMITH *et al.*, 1997) e uma porção substancial é absorvida de forma intacta para o sangue. Este nitrito é convertido em NO e em outros agentes bioativos no sangue e tecidos por meio de uma variedade de enzimas (LUNDBERG e WEITZBERG, 2008). Apesar de o produto final ser o mesmo em ambas as vias, há uma diferença fundamental entre elas. A via da L-arginina é dependente de oxigênio, enquanto a via nitrato-nitrito-NO é facilitada em condições de baixa disponibilidade de oxigênio e baixo pH, como ocorre durante o exercício intenso ou isquemia tecidual (MODIN, BJORNE *et al.*, 2001).

Recentemente, tem sido demonstrado que a suplementação dietética com nitrato acarreta aumento no tempo de exaustão durante exercícios de alta intensidade (BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; BAILEY, FULFORD *et al.*, 2010; LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011) e melhora no desempenho em exercícios contra relógio (LANSLEY, WINYARD, BAILEY *et al.*, 2011; CERMAK, GIBALA *et al.*, 2012). Além

disso, a suplementação dietética com nitrato causa uma redução significativa no consumo de oxigênio pulmonar ( $\text{VO}_2$ ) durante exercícios de intensidades submáximas (isto é, que exigem um consumo de oxigênio abaixo do  $\text{VO}_2$  máximo) (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2007; BESCOS, RODRIGUEZ *et al.*, 2011; LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011). O efeito poupador de oxigênio propiciado pelo nitrato ocorreu sem quaisquer alterações na concentração de lactato sanguíneo (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2007), o que indica uma não alteração no metabolismo não oxidativo (anaeróbio). Isso sugere um metabolismo aeróbio mais eficiente ou uma melhor eficiência mecânica após a suplementação de nitrato.

O mecanismo preciso pelo qual a administração de nitrato reduz o custo de  $\text{O}_2$  no exercício submáximo não está bem elucidado, mas provavelmente está relacionado com o papel do  $\text{NO}_2^-$  e NO como reguladores da utilização de  $\text{O}_2$  celular (LARSEN, SCHIFFER *et al.*, 2011). O NO pode melhorar a eficiência da fosforilação oxidativa por redução do "deslizamento" das bombas de prótons mitocondriais ou atenuando a expressão de proteínas de desacoplamento (CLERC, RIGOULET *et al.*, 2007). Isso reduz o custo de ATP na produção de força muscular durante o exercício (BAILEY, FULFORD *et al.*, 2010), melhorando assim a eficiência metabólica (CERMAK, GIBALA *et al.*, 2012). Os achados de um estudo realizado em exercício submáximo sugerem que esta resposta pode ser derivada a partir de melhoria da respiração mitocondrial, com um aumento da razão fosfato/oxigênio, que corresponde a uma maior quantidade de ATP produzida por oxigênio consumido (LARSEN, SCHIFFER *et al.*, 2011).

Apesar do efeito do nitrato sob o custo de oxigênio em exercício submáximo ser conhecido, há uma confusão quanto a denominação, determinação e padronização das intensidades de esforço (BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2010; LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011). Alguns estudos foram realizados com cargas calculadas em  $\% \text{VO}_{2\text{max}}$  (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2007; PEACOCK, TJONNA *et al.*, 2012; THOMPSON, TURNER *et al.*, 2014), fato que gera conflito quanto as intensidades relativas a cada sujeito (risco de uma carga se encontrar acima ou abaixo do limiar de lactato) levando a resultados distintos em decorrência de respostas metabólicas diferentes. Quanto aos estudos que utilizaram domínios metabólicos, o moderado foi investigado em quatro estudos (VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010; LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011; BREESE, MCNARRY *et al.*, 2013;

WYLIE, KELLY *et al.*, 2013), com a intensidade variando entre 80 e 90% do primeiro limiar de lactato ou de trocas gasosas ( $\theta_L$ ), enquanto o domínio muito pesado foi reportado também quatro vezes (Bailey, Winyard *et al.*, 2009; Lansley, Winyard, Fulford *et al.*, 2011; Wylie, Kelly, et al., 2013; Breese, McNarry *et al.*, 2013) com intensidades variando entre 60, 70 e 80% do delta ( $\Delta$ ) da diferença entre  $VO_{2max}$  e  $\theta_L$ . Por outro lado, até o momento nenhum estudo procurou investigar as potenciais propriedades ergogênicas do nitrato em exercício no domínio pesado (40% do  $\Delta$ ) e no domínio severo, este último correspondente a uma intensidade de esforço acima do consumo máximo de oxigênio (supra  $VO_{2max}$ ) (OZYENER, ROSSITER *et al.*, 2001). O estudo nesses domínios é importante porque a menor disponibilidade de  $O_2$  muscular promove uma limitação adicional à dinâmica do  $VO_2$  em exercícios desempenhados em intensidades acima do  $\theta_L$  (GRASSI, HOGAN *et al.*, 2000). Além disso, nessas intensidades há uma maior proporção de fibras musculares do tipo 2 sendo recrutadas, adicionado a uma maior utilização das reservas anaeróbias (PCr e glicose anaeróbia), que resultam em acúmulo de metabólitos e acidose. Uma vez que a elevação da acidez encontrada nesse tipo de exercício poderia exacerbar a via nitrato-nitrito-NO, isso poderia levar à um custo de  $O_2$  reduzido. Por último, evidências sugerem a ingestão de nitrato eleva a oxigenação no músculo esquelético em contração (BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009) e a infusão de nitrito provoca maior fluxo sanguíneo muscular (GLADWIN, SHELFHAMER *et al.*, 2000). Muitos desses efeitos fisiológicos decorrentes da suplementação de nitrato levam a suspeitar que seu efeito sobre o  $VO_2$  e desempenho sejam maiores nos domínios mais intensos.

Visando responder essas questões, o objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da suplementação aguda de nitrato sobre a cinética de  $VO_2$  nos domínios moderado, pesado, muito pesado e severo. Além disso, foi avaliado o efeito da suplementação aguda de nitrato sobre o tempo até a exaustão no domínio muito pesado e severo (desempenho). Espera-se que a suplementação aguda de nitrato reduza o consumo de  $O_2$ , principalmente nos domínios pesado, muito pesado e severo, e aumente o tempo de exaustão em exercício no domínio muito pesado e severo.

## 2 MÉTODOS

### 2.1 SUJEITOS E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram convidados a participar do estudo 12 homens fisicamente ativos com idade de  $25,0 \pm 6,0$  anos, estatura  $175,0 \pm 8,4$  cm, peso:  $74,4 \pm 11,5$  kg, IMC:  $24,1 \pm 3,0$  kg.cm<sup>2</sup>, percentual de gordura:  $14,5 \pm 6,2\%$  e VO<sub>2</sub>max:  $39,4 \pm 9,6$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (CEP/UFAL) protocolo 039412/2013. Todos os participantes, após serem informados sobre os possíveis riscos e benefícios do estudo, bem com os procedimentos aos quais seriam submetidos, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam a um questionário (ANEXO A) para excluir aqueles com riscos cardiovasculares (PAR-q). Apenas um voluntário não atendeu aos critérios estabelecidos pelo (PAR-q) e foi excluído do restante dos testes.

### 2.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os participantes foram instruídos a respeitarem à sua rotina normal de exercício, exceto para não realizar nenhum exercício nas 24 h antes de cada teste. Além disso, os sujeitos foram aconselhados a abster-se de ingerir suplementos dietéticos (géis e bebidas), além de serem orientados a não ingerir qualquer tipo de substância que contivesse cafeína e bebida alcoólica 24 h antes de cada teste. Por fim, foram orientados a não fazer uso de antisséptico bucal durante o período de execução do experimento, no intuito de evitar a remoção das bactérias conversoras de nitrato presentes na cavidade oral (GOVONI, JANSSON *et al.*, 2008). Os testes de exercício foram realizados sempre pela manhã, respeitando uma variação inferior a  $\pm 2$  h para cada sujeito.

Os sujeitos receberam suplemento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (N) e placebo (PL) através de um desenho cruzado e duplo cego. Cada indivíduo compareceu ao laboratório treze vezes até o término do estudo (Figura 1). O estudo foi dividido em duas etapas. A primeira etapa foi composta de uma única visita onde foram realizadas a avaliação antropométrica para caracterização da amostra e, em seguida, um teste incremental no cicloergômetro para

determinação do  $\text{VO}_{2\text{max}}$  e  $\theta_L$ . Em até sete dias após a conclusão dessa primeira etapa foi iniciada a etapa 2, respeitando um intervalo mínimo de 48 horas entre as duas.

Na etapa 2, após suplementação (N ou PL), foram realizados testes experimentais nos quatro domínios (moderado, pesado, muito pesado e severo). Cada domínio foi realizado em dias diferentes, separados por 72 h de intervalo, exceto o domínio moderado que precedeu todos os demais domínios em todos os dias de teste. O domínio moderado foi realizado doze vezes (seis vezes na condição N e seis vezes na condição PL), enquanto os outros domínios foram realizados quatro vezes (duas vezes na condição N e duas vezes na condição PL). A ordem dos testes (domínios e suplementos) foi escolhida de forma contrabalançada e randomizada.

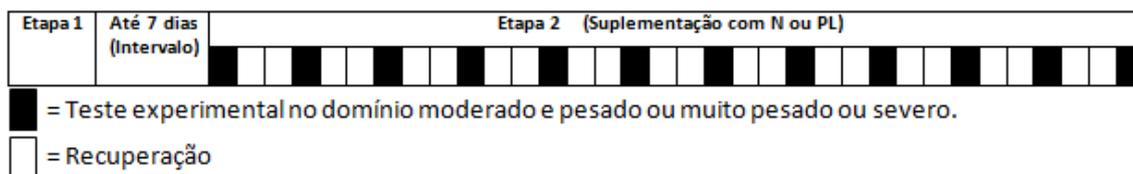


Figura 1. Resumo do desenho experimental. N = Nitrato de sódio; PL = placebo.

Os indivíduos responderam a um recordatório de 24 horas no dia do teste incremental e foram orientados a seguir o mesmo padrão dietético durante as 24 horas antecedentes a cada experimento ( $2598,0 \pm 467,5$  kcal;  $54,3 \pm 6,2$  % CHO;  $19,2 \pm 3,8$  % PTN;  $26,5 \pm 5,5$  % LIP). Os mesmos foram lembrados 24 horas anteriores a cada experimento por meio de mensagens de texto e ligações telefônicas realizadas pelos pesquisadores. No Brasil não há regulamentação das concentrações de nitrato e nitrito na água da torneira, para um controle mais adequado, os participantes foram instruídos a não ingerir água de torneira (apenas mineral), durante o estudo experimental. Além disso, nos dias de teste experimental, o café da manhã foi consumido 2 h antes da suplementação e respeitando a distribuição individual dos macronutrientes ( $476,3 \pm 213,0$  kcal;  $57,3 \pm 15,2$  % CHO;  $13,8 \pm 6,4$  % PTN;  $28,9 \pm 10,7$  % LIP). Essa última refeição foi mantida com baixo teor de nitrato. A concentração de nitrato na dieta habitual foi estimada através do padrão dietético de alimentos e líquidos ingeridos nas 24 horas antes de cada dia de teste (KIROVSKA-CIGULEVSKA, 2002; JAN ALEXANDER, ALESSANDRO DI

DOMENICO *et al.*, 2008; HORD, TANG *et al.*, 2009; HOBBS, KAFFA *et al.*, 2012; JAWAD, 2012; LIDDER e WEBB, 2013).

### 2.3 MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

A massa corporal foi medida em balança da marca Filizola-Brasil, modelo ID-1500, com precisão de 0,1 kg, ao passo que a estatura foi obtida com uma fita métrica fixada na parede, com precisão de 0,1 cm. Foram também realizadas medidas de dobras cutâneas de tórax, abdome e coxa para posterior obtenção da densidade corporal, adotando o protocolo de (JACKSON e POLLOCK, 1978). A densidade corporal foi convertida a percentual de gordura pela equação de (SIRI, 1961).

### 2.4 TESTE INCREMENTAL

Os sujeitos iniciaram um aquecimento de cinco minutos em carga de 25 W em ciclo ergômetro (Ergo Fit 167, Pirmansens, Germany). Posteriormente, foram incrementados 25 W a cada minuto até a exaustão voluntária. Durante todo o teste, os indivíduos mantiveram a frequência de rotação do pedal a 70 rpm. A exaustão foi considerada quando houve queda em 10 rpm sem recuperação por tempo maior que 5 s. O consumo de oxigênio ( $VO_2$ ), a produção de gás carbônico ( $VCO_2$ ) e a ventilação (VE) foram mensurados em cada ciclo ventilatório durante todos os testes. Para isso, os indivíduos utilizaram uma máscara para captação das respostas da ventilação e trocas gasosas mensuradas por um sistema computadorizado e com transmissão imediata, respiração a respiração, para um *software* específico (Cortex Metalyzer 3B, Cortex Biophysik, Leipzig, Germany). O  $VO_{2max}$  foi determinado pela média dos valores dos últimos 10 segundos do último estágio do teste. A frequência cardíaca (FC) foi mensurada através de um transmissor acoplado ao analisador de gases, sendo a FC máxima (FCmax) definida como o maior valor obtido ao final do teste. O  $\theta_L$  foi estabelecido como aumento desproporcional na produção do  $CO_2$  ( $VCO_2$ ) observado nas curvas  $VCO_2$  versus  $VO_2$ ; aumento na razão VE/ $VO_2$  sem aumento na razão VE/ $VCO_2$  e o primeiro aumento na PET  $O_2$  sem queda na PET  $CO_2$  (BEAVER, WASSERMAN *et al.*, 1986) esse limiar foi determinado a partir do consenso de dois

avaliadores, havendo discordância um terceiro avaliador foi requisitado. Por último, foi aplicada uma correção da carga do  $\theta_L$  por redução de dois terços da carga adicionada no teste incremental, isto é,  $\theta_L$  é a carga identificada menos 16,6W ( $25W \cdot 2/3 = 16,6W$ ) (WHIPP, DAVIS *et al.*, 1981).

## 2.5 SUPLEMENTAÇÃO

Todos os participantes foram submetidos à suplementação com nitrato de sódio (Sodium nitrate, ReagentPlus®,  $\geq 99.0\%$  Sigma Aldrich)  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de peso dissolvidos em 500 ml de água mineral em temperatura ambiente (BESCOS, RODRIGUEZ *et al.*, 2011). Para a condição placebo, a mesma concentração de cloreto de sódio dissolvido em 500 ml de água mineral em temperatura ambiente foi utilizada (BESCOS, RODRIGUEZ *et al.*, 2011). A ingestão foi realizada 2,5h antes do teste experimental. Após a ingestão, os sujeitos foram questionados quanto à percepção do suplemento ingerido no que se refere ao sabor, odor e cor.

## 2.6 TESTES EXPERIMENTAIS

Após ingerirem o suplemento, os participantes repousaram por 2,5 h (VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010). Durante este tempo, os sujeitos foram autorizados a beber apenas água. Duas horas e meia após a ingestão o teste foi iniciado com aquecimento de 5 min a 25 W, seguido do ajuste da carga para o domínio moderado, o qual foi realizado por 10 min. Os indivíduos recuperam depois de forma passiva durante 10 minutos. Em seguida, houve novo aquecimento de 5 min a 25 W, seguido de um aumento abrupto da carga para a intensidade de um dado domínio (pesado, muito pesado, ou severo), que teve duração de 15 min (pesado) ou até a exaustão (muito pesado e severo). Em todos os domínios os indivíduos foram orientados a manter a cadência a 70 rpm. Como critério de exaustão foi considerado o mesmo adotado no teste incremental, isto é, uma queda em 10 rpm, sem recuperação por tempo maior que 5 s.

A fim de calcular a intensidade dos domínios, o  $VO_{2max}$  e o  $\theta_L$  obtidos no teste incremental, foram utilizados. A carga de 90% do  $\theta_L$  correspondeu ao domínio moderado, a

de 40% do  $\Delta$  (diferença entre o  $VO_{2max}$  e o  $\theta_L$ ) ao domínio pesado, a de 80% do  $\Delta$  ao domínio muito pesado e a de 110% do  $VO_{2max}$  ao domínio severo (OZYENER, ROSSITER *et al.*, 2001).

## 2.7 ANÁLISE DOS DADOS

Para o cálculo dos parâmetros da cinética *on* do  $VO_2$ , os primeiros 20 s dos dados de exercício (fase 1 ou cardiodinâmica) foram eliminados (OZYENER, ROSSITER *et al.*, 2001). Houve edição dos dados para excluir as respirações errantes causadas por tosse, deglutição, suspiro, etc. Valores maiores que quatro desvios padrões da média local foram excluídos (LAMARRA, WHIPP *et al.*, 1987). Os dados foram interpolados no tempo a cada 1 s e, posteriormente, calculado a média dos testes para cada um dos domínios. Isso foi feito para reduzir os ruídos na distribuição dos dados (SLAWINSKI, DEMARLE *et al.*, 2001).

As curvas da cinética *on* foram ajustadas por uma equação monoexponencial para os domínios moderado e severo, usando a seguinte equação (OZYENER, ROSSITER *et al.*, 2001):

$$VO_{2(t)} = A_0 + A_1 (1 - e^{-t/\tau_1})$$

Onde  $A_0$  é o consumo de oxigênio da linha de base (aquecimento), 1 denota componente fundamental,  $A$ ,  $t$ ,  $\tau$  e  $\delta$  são referentes à amplitude, tempo, constante de tempo e tempo de atraso, respectivamente.

Nos domínios pesado e muito pesado as curvas da cinética *on* foram ajustadas por uma equação biexponencial, usando a seguinte equação (OZYENER, ROSSITER *et al.*, 2001):

$$VO_{2(t)} = A_0 + A_1 (1 - e^{-t/\tau_1}) + A_2 (1 - e^{-(t-\delta)/\tau_2})$$

Onde  $A_0$  é o consumo de oxigênio da linha de base (aquecimento), 1 denota componente fundamental e 2 corresponde ao componente lento.  $A$ ,  $t$ ,  $\tau$  e  $\delta$  são referentes à amplitude, tempo, constante de tempo e tempo de atraso, respectivamente.

Um algoritmo de mínimos quadrados não-linear foi utilizado para ajustar as curvas. O  $\text{VO}_2$  de linha de base foi considerado como a média dos 90s finais do aquecimento. O  $\text{VO}_2$  final foi definido como a média do  $\text{VO}_2$  ao longo dos últimos 10s de exercício. O ganho funcional foi calculado dividindo-se a amplitude de aumento do  $\text{VO}_2$  pela carga de trabalho.

## **2.8 CONCENTRAÇÃO DE LACTATO**

Uma amostra capilar (40  $\mu\text{l}$  de sangue do lóbulo da orelha) foi retirada no repouso e nos minutos três e cinco após o exercício em cada domínio. As amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 ml contendo 8  $\mu\text{l}$  EDTA e imediatamente centrifugadas a 3.000 rpm, a 4°C, durante 15 minutos, para separação do plasma. Em seguida, foram mensuradas as concentrações plasmáticas de lactato através de reações colorimétricas usando kits comerciais (biotécnica) em espectrofotômetro Quimis® (Modelo Q798U2V5, Diadema, São Paulo, Brasil).

## **2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Primeiramente foi verificada a normalidade na distribuição dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Quando confirmada a normalidade, as concentrações de lactato, tempo de exaustão (domínio pesado e severo) e os parâmetros cinéticos foram comparados entre as condições N e PL utilizando o teste t de Student para medidas pareadas. Para todos os tratamentos foi adotado um nível de significância inferior a 5%. O software utilizado foi o SPSS versão 17.0.

## **3 RESULTADOS**

Nenhum voluntário foi capaz de identificar diferenças entre placebo e nitrato no que se refere a cor, odor e sabor.

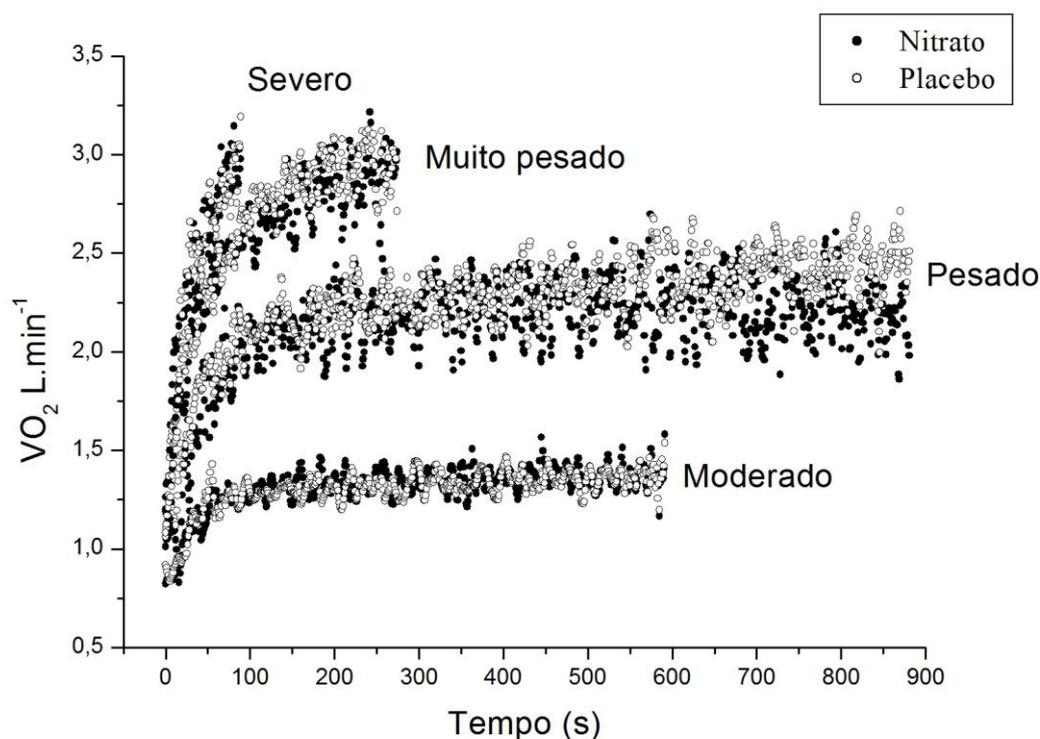
A ingestão de nitrato antes de cada teste (2,5h) elevou em 7 vezes o consumo de nitrato na situação de nitrato em relação ao placebo ( $861,3 \pm 131,8 \text{ mg.dia}^{-1}$  vs  $116,4 \pm 53,1 \text{ mg.dia}^{-1}$  respectivamente,  $p < 0,05$ ).

As cargas ajustadas para os domínios foram: moderado  $99,1 \pm 13,6 \text{ W}$ ; pesado  $163,0 \pm 21,1 \text{ W}$ ; muito pesado  $215,0 \pm 28,4 \text{ W}$  e severo  $288,1 \pm 44,4 \text{ W}$ .

Não houve diferença nas concentrações de lactato de repouso e pico entre as condições nitrato e placebo nos domínios moderado, pesado, muito pesado e severo (tabelas 1 e 2).

### Dinâmica do $\text{VO}_2$

Os dados da cinética *on* do  $\text{VO}_2$  para os domínios moderado, pesado, muito pesado e severo de um indivíduo representativo da amostra é apresentado na figura 2.



**Figura 2.** Consumo de oxigênio ( $\text{VO}_2$ ) em função do tempo durante o exercício nos quatro domínios de intensidade (moderado, pesado, muito pesado e severo) nas condições nitrato e placebo de um sujeito representativo da amostra.

Para o domínio moderado e severo os parâmetros derivados do modelo monoexponencial são apresentados na tabela 1. Não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as condições nitrato e placebo em nenhuma das variáveis cinéticas nesses dois domínios ( $VO_2\text{rep}$ ,  $A_0$ ,  $\tau_1$ ,  $A_1$ ,  $G_1$ ,  $VO_2\text{final}$ ).

**Tabela 1.** Parâmetros cinéticos e concentração de lactato, obtidos no domínio moderado e severo nas condições nitrato e placebo.

	MODERADO		SEVERO	
	NITRATO	PLACEBO	NITRATO	PLACEBO
$VO_2 \text{ rep (L}\cdot\text{min}^{-1})$	$0,29 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,04$
$A_0 \text{ (L}\cdot\text{min}^{-1})$	$0,70 \pm 0,06$	$0,72 \pm 0,06$	$0,72 \pm 0,07$	$0,71 \pm 0,07$
$\tau_1 \text{ (s)}$	$27,5 \pm 7,1$	$25,9 \pm 9,1$	$26,4 \pm 9,5$	$27,6 \pm 8,7$
$A_1 \text{ (L}\cdot\text{min}^{-1})$	$0,71 \pm 0,14$	$0,70 \pm 0,13$	$2,05 \pm 0,40$	$1,89 \pm 0,66$
$G_1 \text{ (ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{W}^{-1})$	$7,14 \pm 0,59$	$7,06 \pm 0,35$	$5,66 \pm 2,90$	$6,63 \pm 2,05$
$VO_2 \text{ final (L}\cdot\text{min}^{-1})$	$1,42 \pm 0,11$	$1,43 \pm 0,11$	$2,79 \pm 0,34$	$2,78 \pm 0,43$
$[\text{Lac}]_{\text{rep}} \text{ (mmol}\cdot\text{l}^{-1})$	$1,80 \pm 0,45$	$1,75 \pm 0,33$	$1,78 \pm 0,85$	$1,80 \pm 0,59$
$[\text{Lac}]_{\text{pico}} \text{ (mmol}\cdot\text{l}^{-1})$	$2,54 \pm 1,21$	$2,76 \pm 1,00$	$7,45 \pm 2,37$	$7,56 \pm 1,85$

Valores descritos em média  $\pm$  desvio padrão para onze voluntários no domínio moderado e oito para o domínio severo.  $VO_2 \text{ rep}$ :  $VO_2$  de repouso;  $A_0$ :  $VO_2$  de linha de base;  $\tau_1$ : Constante de tempo do componente fundamental;  $A_1$ : Amplitude do componente fundamental;  $G_1$ : Ganho do componente fundamental;  $[\text{Lac}]_{\text{rep}}$ : Concentração de lactato em repouso;  $[\text{Lac}]_{\text{pico}}$ : concentração de lactato pico. Não houve diferença significativa entre nitrato e placebo em ambos os domínios

Para o domínio pesado e muito pesado os parâmetros derivados do modelo biexponencial estão representados na tabela 2. Na intensidade do domínio pesado houve redução significativa na amplitude do componente lento (nitrato:  $0,93 \pm 0,36$  vs placebo:  $1,13 \pm 0,59 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ) e no ganho do componente lento (nitrato:  $5,81 \pm 2,37$  vs placebo:  $7,09 \pm 3,67 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{W}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ) na condição nitrato em comparação com a

condição placebo. Por outro lado, os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas nesse domínio. Da mesma forma, para a intensidade no domínio muito pesado, não houve nenhuma diferença significativa entre nitrato e placebo em nenhum dos parâmetros.

**Tabela 2.** Parâmetros cinéticos obtidos e concentração de lactato, obtidos no domínio pesado e muito pesado nas condições nitrato e placebo.

	PESADO		MUITO PESADO	
	NITRATO	PLACEBO	NITRATO	PLACEBO
<b>VO<sub>2</sub> rep (L·min<sup>-1</sup>)</b>	0,31 ± 0,03	0,32 ± 0,04	0,30 ± 0,03	0,32 ± 0,03
<b>A<sub>0</sub> (L·min<sup>-1</sup>)</b>	0,71 ± 0,06	0,73 ± 0,06	0,85 ± 0,49	0,86 ± 0,54
<b>τ<sub>1</sub> (s)</b>	30,1 ± 10,9	34,5 ± 19,9	18,9 ± 9,6	28,2 ± 31,7
<b>A<sub>1</sub> (L·min<sup>-1</sup>)</b>	0,85 ± 0,22	0,84 ± 0,21	0,84 ± 0,31	0,79 ± 0,27
<b>G<sub>1</sub> (ml·min<sup>-1</sup>·W<sup>-1</sup>)</b>	5,15 ± 0,82	5,11 ± 0,88	3,81 ± 1,18	3,65 ± 1,04
<b>τ<sub>2</sub> (s)</b>	618,1 ± 508,5	791,6 ± 638,4	286,9 ± 142,5	324,1 ± 240,2
<b>A<sub>2</sub> (L·min<sup>-1</sup>)</b>	0,93 ± 0,36	1,13 ± 0,59*	1,53 ± 0,48	1,67 ± 0,37
<b>A<sub>1</sub> + A<sub>2</sub> (L·min<sup>-1</sup>)</b>	1,78 ± 0,37	1,97 ± 0,34	2,37 ± 0,60	2,46 ± 0,46
<b>G<sub>2</sub> (ml·min<sup>-1</sup>·W<sup>-1</sup>)</b>	5,81 ± 2,37	7,09 ± 3,67*	7,27 ± 2,45	7,80 ± 1,58
<b>Gtotal (ml·min<sup>-1</sup>·W<sup>-1</sup>)</b>	10,96 ± 2,21	12,20 ± 3,41	11,08 ± 2,67	11,45 ± 1,56
<b>VO<sub>2</sub> final (L·min<sup>-1</sup>)</b>	2,32 ± 0,24	2,34 ± 0,27	2,83 ± 0,44	2,75 ± 0,41
<b>[Lac]rep (mmol.l<sup>-1</sup>)</b>	1,70 ± 0,69	1,76 ± 0,55	1,91 ± 0,50	1,85 ± 0,54
<b>[Lac]pico (mmol.l<sup>-1</sup>)</b>	5,28 ± 2,40	5,90 ± 2,58	7,69 ± 1,32	7,62 ± 1,40

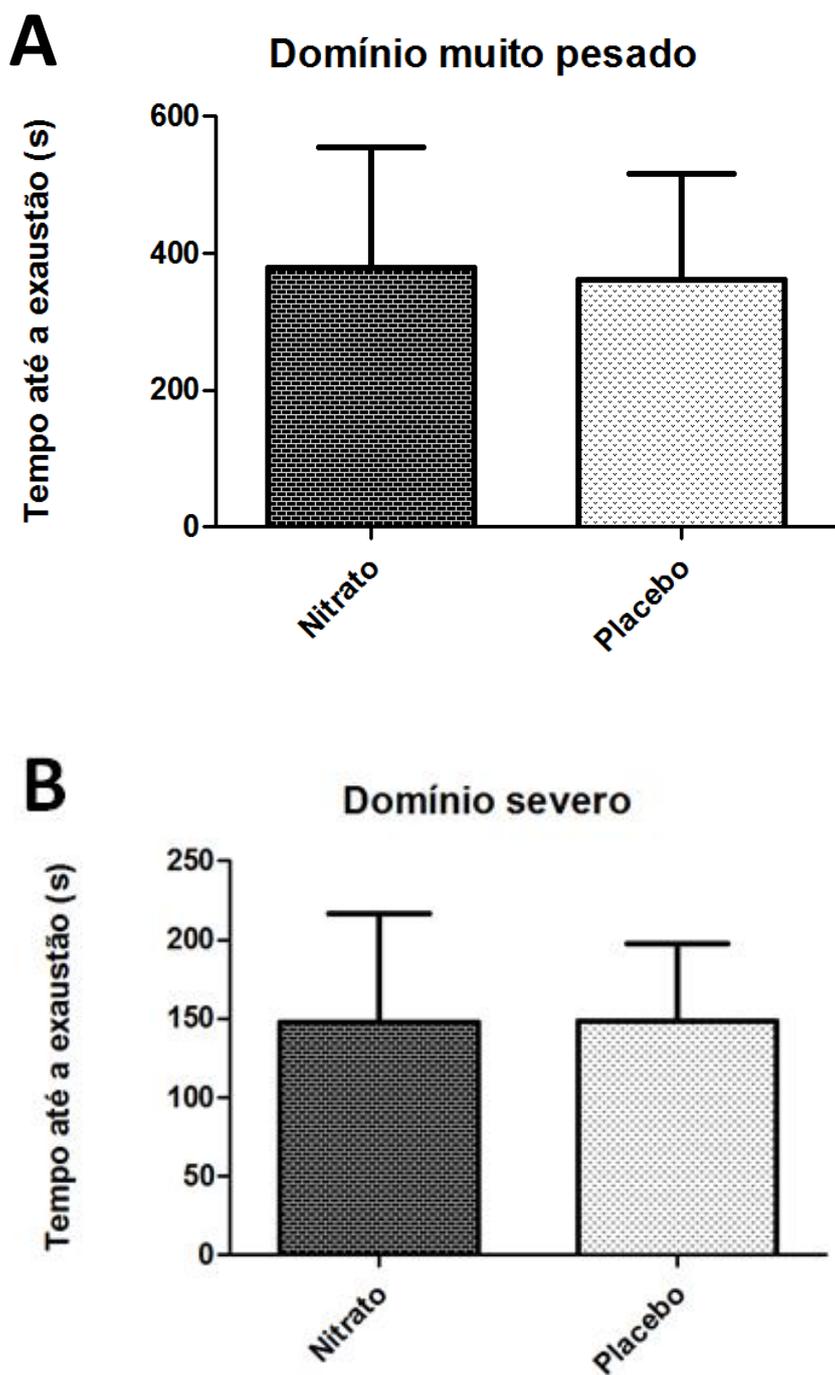
Valores descritos em média ± desvio padrão para dez voluntários no domínio pesado e nove voluntários para o muito pesado. VO<sub>2</sub> rep: VO<sub>2</sub> de repouso; A<sub>0</sub>: VO<sub>2</sub> de linha de base; τ<sub>1</sub>: Constante de tempo componente fundamental; A<sub>1</sub>: Amplitude do componente fundamental; G<sub>1</sub>: Ganho do componente fundamental; τ<sub>2</sub>: Constante de tempo do componente lento; A<sub>2</sub>: Amplitude do componente lento; G<sub>2</sub>: Ganho do componente lento; Gtotal: Ganho total; [Lac]rep: Concentração de lactato em repouso; [Lac]pico: concentração de lactato pico. \*p < 0,05 entre as condições nitrato e placebo.

O VO<sub>2</sub> final obtido nos domínios moderado, pesado, muito pesado e severo (tabela 1 e 2) corresponderam, respectivamente, a 49,5 ± 3,8%; 80,7 ± 8,8%; 97,0 ± 14,7% e 96,7

$\pm 13,3\%$  do  $VO_{2max}$  obtido no teste incremental. O  $VO_2$  final em ambos, nitrato e placebo, foi significativamente menor do que o  $VO_{2max}$  obtido no teste incremental nos domínios moderado e pesado ( $p < 0,05$ ), mas não foi diferente nos domínios muito pesado e severo ( $p > 0,05$ ).

### **Tolerância ao exercício**

O tempo até a exaustão nos domínios muito pesado (nitrato:  $379,0 \pm 168,7$  vs placebo:  $361,9 \pm 154,4$  s) e severo (nitrato:  $147,7 \pm 68,7$  vs placebo:  $148,6 \pm 49,0$  s) não foram estatisticamente diferentes entre as condições nitrato e placebo (Figura 3 A e B).



**Figura 3.** A: Tempo até exaustão representado em média e desvio padrão no domínio muito pesado. B: Tempo até exaustão representado em média e desvio padrão no domínio severo. Não houve diferença significativa entre nitrato e placebo em ambos os domínios.

#### 4. DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da suplementação aguda de nitrato (2,5h antes) sobre a cinética de *on* VO<sub>2</sub> nos domínios moderado, pesado, muito pesado e severo. Além disso, foi avaliado o efeito da suplementação aguda de nitrato sobre o tempo até a exaustão nos domínios muito pesado e severo. Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a avaliar o efeito da suplementação de nitrato na cinética de consumo de VO<sub>2</sub> em diferentes domínios de exercício, em especial no domínio pesado e severo, utilizando um desenho contrabalançado, randômico e duplo cego. Foram encontradas reduções na amplitude e ganho do componente lento no domínio pesado (40% do  $\Delta$ ). Contudo, os parâmetros cinéticos avaliados não foram diferentes entre as condições nitrato e placebo nos domínios moderado, muito pesado e severo. Por último, o tempo de exaustão nos domínios muito pesado e severo não diferiram entre as condições nitrato e placebo.

Para o domínio moderado, os parâmetros cinéticos ( $A_0$ ,  $\tau_1$ ,  $A_1$ ,  $G_1$ ) foram semelhantes entre as condições nitrato e placebo, corroborando com outros estudos (BESCOS, RODRIGUEZ *et al.*, 2011; BREESE, MCNARRY *et al.*, 2013; CHRISTENSEN, NYBERG *et al.*, 2013; KELLY, FULFORD *et al.*, 2013). Por outro lado, nos estudos citados a seguir, o componente fundamental (BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010; LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011), ganho do componente fundamental (BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010) e VO<sub>2final</sub> (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2007; BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; VANHATALO, BAILEY *et al.*, 2010) no domínio moderado foram reduzidos após a suplementação de nitrato. Uma explicação para essa inconsistência de resultados na literatura não é facilmente identificada, mas para alguns estudos que não encontraram efeito de suplementação, os voluntários eram altamente treinados (67 ml.kg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>), com aproximadamente duas vezes mais nitrato e nitrito plasmático de repouso do que indivíduos destreinados (42 ml.kg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>) (VASSALLE, LUBRANO *et al.*, 2003). No entanto, assim como no presente estudo, Breese *et al.*, 2013, também realizaram testes em indivíduos destreinados e não encontraram diferenças significativas para qualquer parâmetro cinético de VO<sub>2</sub>. No nosso estudo, a carga do  $\theta_L$  foi corrigida em dois terços do incremento de carga do teste incremental, isto é,  $\theta_L$  é a carga identificada menos 16,6 W. Nos demais estudos supracitados, foram utilizadas cargas que variavam entre 80-90% do  $\theta_L$ , mas sem realizar a correção. Isso talvez tenha gerado uma

carga de trabalho um pouco menor no presente estudo do que nos demais estudos. Como o efeito do nitrato talvez seja maior com o aumento da intensidade, devido a sua maior ação em fibras do tipo II, uma carga mais baixa talvez amenize seus efeitos. Contudo, como não foi encontrado efeito em outros domínios de maior intensidade no presente estudo, os quais também recrutam preferencialmente fibras do tipo II, a discrepância de resultados para o domínio moderado sobre o efeito da suplementação de nitrato permanece não resolvido.

A amplitude e ganho do componente lento foram reduzidas após suplementação de nitrato no domínio pesado. A comparação desses resultados com o de outros estudos é limitada, pois até o presente momento, ninguém havia avaliado esse domínio metabólico (40% do  $\Delta$ ). Um único estudo realizado por Christensen et al., 2013, relataram o efeito da suplementação de nitrato em “domínio pesado”, no entanto, para classificação dessa intensidade eles usaram a referência de 70% da potência pico obtido no teste incremental, fato que não garante a mesma “carga metabólica” para todos os voluntários. Nesse estudo, não foi encontrada redução em nenhum dos parâmetros cinéticos após a suplementação do nitrato. Contudo, foi utilizado ciclistas altamente treinados como amostra ( $72,1 \pm 4.5$  ml.min<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>), com os dados sendo ajustados num período de apenas 6 min de exercício. Entre os domínios nos quais é possível identificar o componente lento (pesado e muito pesado), o domínio pesado é o único que é capaz de apresentar  $\text{VO}_2$  em estado estável, mas dentro de um período mais longo de tempo (entre 10-15min) (JONES, 2005), como o utilizado no presente estudo. De igual importância, o domínio pesado é o único desses dois que apresenta componente lento, mas não atinge o  $\text{VO}_2\text{max}$ . De fato, o  $\text{VO}_2$  final do domínio pesado correspondeu a apenas ~81% do  $\text{VO}_2\text{max}$  e foi significativamente menor do que o  $\text{VO}_2\text{max}$ , enquanto para o domínio muito pesado foi identificado a ~ 97%, sem diferença estatística significativa. Esses resultados sugerem que a suplementação aguda de nitrato talvez seja mais efetiva quando aplicada em exercícios que apresentem componente lento, mas que também alcance um estado estável e não levem os indivíduos a atingir seu  $\text{VO}_2\text{max}$ .

O componente lento corresponde a um aumento de  $\text{VO}_2$  em taxas maiores do que as previstas a partir da extrapolação do  $\text{VO}_2$  de cargas abaixo do  $\theta_L$  (POOLE e JONES, 2012). Existem diversas explicações para a existência do componente lento, mas a mais plausível é que isso ocorra devido as fibras musculares do tipo 1 tornarem-se fadigadas com o

decorrer do exercício, enquanto há um maior recrutamento das fibras do tipo 2 (POOLE, BARSTOW *et al.*, 1994). Essas fibras apresentam maior demanda energética e consomem mais O<sub>2</sub>. Duas evidências suportam um maior efeito da suplementação de nitrato em exercícios que recrutem fibras do tipo 2. São elas: 1) a força contrátil, a taxa do desenvolvimento de força e a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático são maiores em fibras do tipo 2, mas não nas do tipo 1, em ratos suplementados com nitrato (HERNANDEZ, SCHIFFER *et al.*, 2012); e 2) O pH e a PO<sub>2</sub> microvascular declinam mais rapidamente em fibras musculares do tipo 2, condições que promovem maior formação de NO pela via nitrato – nitrito – NO (BEHNKE, MCDONOUGH *et al.*, 2003; MCDONOUGH, BEHNKE *et al.*, 2005). Dessa forma, parece que o maior efeito da suplementação de nitrato no domínio pesado, ocorre pelo recrutamento das fibras musculares do tipo 2 e consequente surgimento do componente lento.

Poucos estudos avaliaram o efeito da suplementação do nitrato no domínio muito pesado. No presente estudo não foram encontradas diferenças nos parâmetros de cinética *on* de O<sub>2</sub> nesse domínio. Esse resultado está de acordo com Kelly *et al.*, 2013, que avaliaram intensidades de 60, 70 e 80 % do  $\Delta$  em exercício na esteira e não encontrou diferenças significativas em nenhum dos parâmetros. Por outro lado, Bailey *et al.*, 2009, encontraram redução na constante de tempo do componente fundamental, na amplitude do componente fundamental e lento, e no ganho total em ciclismo à 70% do  $\Delta$ . Na mesma intensidade ( $\Delta$ 70%), Breese *et al.*, 2013, encontraram redução apenas na constante de tempo do componente fundamental em ciclismo. Por último, Lasnley *et al.*, 2011, que avaliaram corrida em 75% do  $\Delta$ , encontraram redução no VO<sub>2</sub> baseline e final após ingestão de nitrato. A intensidade utilizada no presente estudo foi de 80% do  $\Delta$ , valor ligeiramente maior em relação aos outros estudos que encontraram melhora na cinética de VO<sub>2</sub>. O tempo de teste também foi diferente entre os estudos, e poderiam explicar parte das discrepâncias entre os resultados. Quando avaliado o domínio muito pesado, o tempo de exercício do presente estudo não foi fixo, de maneira que o tempo médio de exercício para ambas condições foi de  $379,0 \pm 168,7$  segundos para nitrato e  $361,9 \pm 154,4$  segundos para placebo. Dessa forma, o tempo total de ajuste variou consideravelmente entre os indivíduos. Para os outros estudos citados acima, o tempo de exercício foi fixo em 360 segundos para todos os voluntários. Essa diferença na forma de ajustar a curva VO<sub>2</sub>-tempo talvez explique esses resultados discrepantes.

Quando avaliada a cinética de  $\text{VO}_2$  no domínio severo (acima do  $\text{VO}_{2\text{max}}$ ), os parâmetros obtidos por esse ajuste não foram diferentes após a suplementação de nitrato. Nenhum outro estudo foi realizado em intensidades acima do  $\text{VO}_{2\text{max}}$ , dificultando uma possível comparação. Um estudo que mais se aproximou desse domínio foi o de Kelly et al., 2013 (100% do  $\text{VO}_{2\text{max}}$ ), e que também não encontraram diferenças entre os parâmetros cinéticos das condições nitrato e placebo. Nessa intensidade, um ajuste monoexponencial é recomendado, em parte porque o tempo de permanência em exercício é tão curto que impede o aparecimento do componente lento (OZYENER, ROSSITER *et al.*, 2001). Esses resultados reforçam um maior efeito do nitrato em exercícios que apresentam componente lento, mas que concomitantemente possuam estabilização.

Em desacordo com a nossa hipótese inicial, de que o nitrato seria capaz de reduzir o consumo de oxigênio em maior proporção com o aumento da intensidade do exercício, foi encontrada redução da amplitude e ganho do componente lento apenas na intensidade de domínio pesado após a suplementação aguda de nitrato. A magnitude do efeito não foi proporcional à intensidade do exercício, visto que não houve diferença entre as condições nitrato e placebo em relação aos parâmetros cinéticos do  $\text{VO}_2$  avaliados nos domínios moderado, muito pesado e severo. Apenas o domínio pesado apresenta tempo suficiente (15 min) para estabilização do  $\text{VO}_2$  e avaliação completa do componente lento. Além disso, o  $\text{VO}_2$  final dessa intensidade corresponde a apenas ~81% do  $\text{VO}_{2\text{max}}$  obtido pelo teste incremental, diferente dos domínios muito pesado e severo onde ambos atingiram ~97 do  $\text{VO}_{2\text{max}}$ . Logo, talvez o  $\text{VO}_{2\text{max}}$  e a exaustão foram alcançados antes de apresentar um componente lento completo, o que poderia explicar a ausência de efeito da suplementação de nitrato.

O tempo de exaustão mensurado no domínio muito pesado não foi diferente entre as condições nitrato e placebo, apresentando valores que são abaixo de outros estudos (BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; LANSLEY, WINYARD, FULFORD *et al.*, 2011; BREESE, MCNARRY *et al.*, 2013). Este também foi o primeiro estudo a avaliar o desempenho no domínio severo, onde também não foram encontradas diferenças no tempo até a exaustão entre as condições nitrato e placebo. Em nossa recente revisão (GHIARONE, 2014), dos vinte e cinco estudos avaliados, apenas metade (doze) apresentaram algum tipo de melhora no desempenho físico, seja no aumento do tempo até a exaustão, redução do tempo de prova, ou aumento da velocidade média, potência de pico

ou distância percorrida. O mecanismo responsável por essas discrepâncias não estão claros, mas pode existir uma relação com o tempo de suplementação, estado de treinamento, intensidade de exercício e/ou tipo de exercício.

### **Limitações do estudo**

No presente estudo não foi exigida restrição no consumo de alimentos que continham nitrato. Houve apenas uma padronização da dieta habitual 24h antes de cada teste, de modo que todas as condições se iniciassem em condições semelhantes pré-exercício. Isso foi escolhido para não criar duas manipulações simultâneas (dieta e suplemento) e confundir a interpretação dos resultados. Contudo, o consumo habitual de nitrato dos participantes relativamente baixo ( $116,4 \pm 53,1 \text{ mg.dia}^{-1}$ ), com a suplementação de nitrato elevando em aproximadamente 7 vezes esse consumo de nitrato. No entanto, nós não realizamos análise da concentração de nitrato do sangue, o que poderia auxiliar na confirmação do efeito do suplemento. Por outro lado, o estudo realizado por Bescos fez uso da mesma concentração de nitrato para suplementação ( $10\text{mg.kg}^{-1}$  de peso) e encontrou um aumento de  $86.9\% \pm 8.4\%$  na concentração plasmática de nitrato 3 horas após a ingestão de nitrato, em relação ao placebo. Outros estudos com suplementação similar encontraram elevação de mesma magnitude nas concentrações plasmáticas de nitrato e nitrito (LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2007; WEBB, PATEL *et al.*, 2008; BAILEY, WINYARD *et al.*, 2009; BAILEY, FULFORD *et al.*, 2010; LARSEN, WEITZBERG *et al.*, 2010). Por fim, uma outra limitação do presente estudo poderia ser o número de testes de carga constante. Mais repetições poderiam reduzir o limite de confiança dos parâmetros estimados. No entanto, as recomendações de 4 a 8 testes para intensidades abaixo do  $\theta_L$  e de 2 a 4 testes para intensidades acima do  $\theta_L$  foram respeitadas (JONES, 2005). Dessa forma, o número de testes utilizados no presente estudo pode ser considerado suficiente para aumentar a razão sinal/ruído para níveis satisfatórios, garantindo assim uma boa confiabilidade nos parâmetros cinéticos obtidos (JONES, 2005).

### **5.CONCLUSÃO**

A suplementação aguda de nitrato de sódio ( $10\text{mg.kg}^{-1}$  de peso) 2,5h antes do teste de exercício foi suficiente para elevar a ingestão de nitrato em aproximadamente 7 vezes, resultando em redução da amplitude e o ganho do componente lento no domínio pesado, mas não nos domínios moderado, muito pesado e severo. A suplementação de nitrato

também não reduziu o tempo até a exaustão nos domínios muito pesado e severo. Assim, esses resultados trazem novas implicações para a intensidade de exercício ideal em que a suplementação de nitrato deve ser administrada, visto que apresentou efeito restrito ao domínio pesado.

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O NO é um potente sinalizador celular envolvido em diversas reações no organismo. Evidências indicam que o nitrato, precursor de NO, tem uma gama de efeitos benéficos e tem demonstrado um potencial efeito ergogênico sobre o exercício. Por outro lado, não está claro em qual intensidade de exercício o efeito é potencializado, visto que aproximadamente metade dos estudos não obteve melhora no desempenho após suplementação de nitrato. Nossos resultados sugerem que a intensidade de domínio pesado é a mais adequada para a suplementação de nitrato, pois apenas nesse domínio houve redução da amplitude e o ganho do componente lento, fato que leva a novas implicações para a intensidade de exercício ideal em que a suplementação de nitrato deve ser administrada. Além disso, esses efeitos podem se estender para as populações senescentes ou indivíduos com doença pulmonar, cardiovascular ou metabólica. Nesses grupos, as atividades da vida diária são fisicamente exaustivas porque eles têm uma exigência de energia que representa uma alta porcentagem do  $VO_{2max}$ . Uma redução no custo de  $O_2$  após a suplementação de nitrato poderia resultar em maior tolerância ao exercício e qualidade de vida para esses indivíduos.



ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v. 357, n. Pt 3, p. 593-615, Aug 1 2001.

ALONSO, D.; RADOMSKI, M. W. Nitric oxide, platelet function, myocardial infarction and reperfusion therapies. **Heart Fail Rev**, v. 8, n. 1, p. 47-54, Jan 2003.

BAILEY, S. J. et al. Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. **J Appl Physiol (1985)**, v. 109, n. 1, p. 135-48, Jul 2010.

BAILEY, S. J. et al. Dietary nitrate supplementation reduces the O<sub>2</sub> cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 4, p. 1144-55, Oct 2009.

BEAVER, W. L.; WASSERMAN, K.; WHIPP, B. J. A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange. **J Appl Physiol (1985)**, v. 60, n. 6, p. 2020-7, Jun 1986.

BEHNKE, B. J. et al. Oxygen exchange profile in rat muscles of contrasting fibre types. **J Physiol**, v. 549, n. Pt 2, p. 597-605, Jun 1 2003.

BERGSTROM, J. et al. Diet, muscle glycogen and physical performance. **Acta Physiol Scand**, v. 71, n. 2, p. 140-50, Oct-Nov 1967.

BESCOS, R. et al. Sodium nitrate supplementation does not enhance performance of endurance athletes. **Med Sci Sports Exerc**, v. 44, n. 12, p. 2400-9, Dec 2012.

BESCOS, R. et al. Acute administration of inorganic nitrate reduces VO<sub>2peak</sub> in endurance athletes. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 10, p. 1979-86, Oct 2011.

BOLANOS, J. P. et al. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. **J Neurochem**, v. 63, n. 3, p. 910-6, Sep 1994.

BOND, H.; MORTON, L.; BRAAKHUIS, A. J. Dietary nitrate supplementation improves rowing performance in well-trained rowers. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 22, n. 4, p. 251-6, Aug 2012.

BREESE, B. C. et al. Beetroot juice supplementation speeds O<sub>2</sub> uptake kinetics and improves exercise tolerance during severe-intensity exercise initiated from an elevated metabolic rate. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 305, n. 12, p. R1441-50, Dec 15 2013.

BROWN, G. C.; COOPER, C. E. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. **FEBS Lett**, v. 356, n. 2-3, p. 295-8, Dec 19 1994.

CERMAK, N. M.; GIBALA, M. J.; VAN LOON, L. J. Nitrate supplementation's improvement of 10-km time-trial performance in trained cyclists. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 22, n. 1, p. 64-71, Feb 2012.

CERMAK, N. M. et al. No improvement in endurance performance after a single dose of beetroot juice. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 22, n. 6, p. 470-8, Dec 2012.

CHRISTENSEN, P. M.; NYBERG, M.; BANGSBO, J. Influence of nitrate supplementation on VO<sub>2</sub> kinetics and endurance of elite cyclists. **Scand J Med Sci Sports**, v. 23, n. 1, p. e21-31, Feb 2013.

CLEETER, M. W. et al. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. **FEBS Lett**, v. 345, n. 1, p. 50-4, May 23 1994.

CLERC, P. et al. Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency. **J Bioenerg Biomembr**, v. 39, n. 2, p. 158-66, Apr 2007.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 8, p. 1397-406, Aug 2001.

COOPER, C. E.; GIULIVI, C. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: Molecular mechanism and tissue physiology. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 292, n. 6, p. C1993-2003, Jun 2007.

DUNCAN, C. et al. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. **Nat Med**, v. 1, n. 6, p. 546-51, Jun 1995.

FARRELL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric oxide. **Ann Rheum Dis**, v. 55, n. 1, p. 7-20, Jan 1996.

FINSTERER, J. Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 13, p. 218, 2012.

FORSTERMANN, U. et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, n. 6 Pt 2, p. 1121-31, Jun 1994.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 27 1980.

GALLER, S.; HILBER, K.; GOBESBERGER, A. Effects of nitric oxide on force-generating proteins of skeletal muscle. **Pflugers Arch**, v. 434, n. 3, p. 242-5, Jul 1997.

GHIARONE, T. A. T. S. B., R.; LIMA-SILVA A.E. SUPLEMENTAÇÃO DE NITRATO E SUA RELAÇÃO COM A FORMAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E EXERCÍCIO FÍSICO. **Rev. Acta Brasileira do Movimento Humano**, v. 4, n. 4, p. 103-135, 2014.

GILCHRIST, M.; WINYARD, P. G.; BENJAMIN, N. Dietary nitrate--good or bad? **Nitric Oxide**, v. 22, n. 2, p. 104-9, Feb 15 2010.

GLADWIN, M. T. et al. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 21, p. 11482-7, Oct 10 2000.

GOVONI, M. et al. The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 4, p. 333-7, Dec 2008.

GRASSI, B. et al. Role of convective O<sub>2</sub> delivery in determining VO<sub>2</sub> on-kinetics in canine muscle contracting at peak VO<sub>2</sub>. **J Appl Physiol (1985)**, v. 89, n. 4, p. 1293-301, Oct 2000.

GREEN, D. J. et al. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **J Physiol**, v. 561, n. Pt 1, p. 1-25, Nov 15 2004.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J Physiol Pharmacol**, v. 54, n. 4, p. 469-87, Dec 2003.

HART, J. D.; DULHUNTY, A. F. Nitric oxide activates or inhibits skeletal muscle ryanodine receptors depending on its concentration, membrane potential and ligand binding. **J Membr Biol**, v. 173, n. 3, p. 227-36, Feb 1 2000.

HERNANDEZ, A. et al. Dietary nitrate increases tetanic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and contractile force in mouse fast-twitch muscle. **J Physiol**, v. 590, n. Pt 15, p. 3575-83, Aug 1 2012.

HEUNKS, L. M. et al. Nitric oxide impairs  $Ca^{2+}$  activation and slows cross-bridge cycling kinetics in skeletal muscle. **J Appl Physiol** (1985), v. 91, n. 5, p. 2233-9, Nov 2001.

HOBBS, D. A. et al. Blood pressure-lowering effects of beetroot juice and novel beetroot-enriched bread products in normotensive male subjects. **Br J Nutr**, v. 108, n. 11, p. 2066-74, Dec 14 2012.

HORD, N. G.; TANG, Y.; BRYAN, N. S. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. **Am J Clin Nutr**, v. 90, n. 1, p. 1-10, Jul 2009.

IGNARRO, L. J. et al. Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. **J Biol Chem**, v. 261, n. 11, p. 4997-5002, Apr 15 1986.

JACKSON, A. S.; POLLOCK, M. L. Generalized equations for predicting body density of men. **Br J Nutr**, v. 40, n. 3, p. 497-504, Nov 1978.

JAN ALEXANDER, D. B., ANDREW COCKBURN, JEAN-PIERRE CRAVEDI, EUGENIA DOGLIOTTI, et al. Nitrate in vegetables Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. **The EFSA Journal**, v. 689, p. 1-79, 2008.

JAWAD, I. M. Estimation of Nitrite, Nitrate and N-Nitrosamines in Selected Food Samples. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 11, n. 5, p. 481-483, 2012.

JENSEN, L.; BANGSBO, J.; HELLSTEN, Y. Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 557, n. Pt 2, p. 571-82, Jun 1 2004.

JONES, M. A. P., D. C. Oxygen uptake kinetics in sport, exercise and medicine. In: (Ed.), 2005. cap. Measuring  $VO_2$  kinetics. The practicalities p.39-61.

JUNGERSTEN, L. et al. Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. **J Appl Physiol** (1985), v. 82, n. 3, p. 760-4, Mar 1997.

KELLY, J. et al. Effects of short-term dietary nitrate supplementation on blood pressure,  $O_2$  uptake kinetics, and muscle and cognitive function in older adults. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 304, n. 2, p. R73-83, Jan 15 2013.

KELLY, J. et al. Effects of nitrate on the power-duration relationship for severe-intensity exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 45, n. 9, p. 1798-806, Sep 2013.

KELM, M.; SCHRADER, J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. **Circ Res**, v. 66, n. 6, p. 1561-75, Jun 1990.

KINGWELL, B. A. et al. Nitric oxide synthase inhibition reduces glucose uptake during exercise in individuals with type 2 diabetes more than in control subjects. **Diabetes**, v. 51, n. 8, p. 2572-80, Aug 2002.

KIROVSKA-CIGULEVSKA, O. DETERMINATION OF NITRATES IN FOOD PRODUCTS. **Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, v. 4, n. 2, p. 70-73, 2002.

KOBZIK, L. et al. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature**, v. 372, n. 6506, p. 546-8, Dec 8 1994.

KOZLOV, A. V.; STANIEK, K.; NOHL, H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. **FEBS Lett**, v. 454, n. 1-2, p. 127-30, Jul 2 1999.

LAMARRA, N. et al. Effect of interbreath fluctuations on characterizing exercise gas exchange kinetics. **J Appl Physiol (1985)**, v. 62, n. 5, p. 2003-12, May 1987.

LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; DREXLER, H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? **Circulation**, v. 109, n. 21 Suppl 1, p. II27-33, Jun 1 2004.

LANSLEY, K. E. et al. Acute dietary nitrate supplementation improves cycling time trial performance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 6, p. 1125-31, Jun 2011.

LANSLEY, K. E. et al. Dietary nitrate supplementation reduces the O<sub>2</sub> cost of walking and running: a placebo-controlled study. **J Appl Physiol (1985)**, v. 110, n. 3, p. 591-600, Mar 2011.

LARSEN, F. J. et al. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. **Cell Metab**, v. 13, n. 2, p. 149-59, Feb 2 2011.

LARSEN, F. J. et al. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 191, n. 1, p. 59-66, Sep 2007.

\_\_\_\_\_. Dietary nitrate reduces maximal oxygen consumption while maintaining work performance in maximal exercise. **Free Radic Biol Med**, v. 48, n. 2, p. 342-7, Jan 15 2010.

LAU, K. S. et al. nNOS and eNOS modulate cGMP formation and vascular response in contracting fast-twitch skeletal muscle. **Physiol Genomics**, v. 2, n. 1, p. 21-7, Jan 24 2000.

LAUER, T. et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 22, p. 12814-9, Oct 23 2001.

LAUGHLIN, M. H.; ARMSTRONG, R. B. Muscular blood flow distribution patterns as a function of running speed in rats. **Am J Physiol**, v. 243, n. 2, p. H296-306, Aug 1982.

LIAUDET, L.; SORIANO, F. G.; SZABO, C. Biology of nitric oxide signaling. **Crit Care Med**, v. 28, n. 4 Suppl, p. N37-52, Apr 2000.

LIDDER, S.; WEBB, A. J. Vascular effects of dietary nitrate (as found in green leafy vegetables and beetroot) via the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. **Br J Clin Pharmacol**, v. 75, n. 3, p. 677-96, Mar 2013.

LUIKING, Y. C.; ENGELEN, M. P.; DEUTZ, N. E. Regulation of nitric oxide production in health and disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, n. 1, p. 97-104, Jan 2010.

LUNDBERG, J. O.; GOVONI, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 3, p. 395-400, Aug 1 2004.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. Nitrite reduction to nitric oxide in the vasculature. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, n. 2, p. H477-8, Aug 2008.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 2, p. 156-67, Feb 2008.

MACKIE, B. G.; TERJUNG, R. L. Blood flow to different skeletal muscle fiber types during contraction. **Am J Physiol**, v. 245, n. 2, p. H265-75, Aug 1983.

MARTIN E YOUNG, B. L. Fuel oxidation in skeletal muscle is increased by nitric oxide/cGMP – evidence for involvement of cGMP-dependent protein kinase. **FEBS Letters**, v. 424, n. 1-2, p. 79–83, 1998.

MASSCHELEIN, E. et al. Dietary nitrate improves muscle but not cerebral oxygenation status during exercise in hypoxia. **J Appl Physiol (1985)**, v. 113, n. 5, p. 736-45, Sep 1 2012.

MCDONOUGH, P. et al. Control of microvascular oxygen pressures in rat muscles comprised of different fibre types. **J Physiol**, v. 563, n. Pt 3, p. 903-13, Mar 15 2005.

MCKNIGHT, G. M. et al. Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. **Gut**, v. 40, n. 2, p. 211-4, Feb 1997.

MERRY, T. L.; LYNCH, G. S.; MCCONELL, G. K. Downstream mechanisms of nitric oxide-mediated skeletal muscle glucose uptake during contraction. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 299, n. 6, p. R1656-65, Dec 2010.

MODIN, A. et al. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation. **Acta Physiol Scand**, v. 171, n. 1, p. 9-16, Jan 2001.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Nitric oxide and the vascular endothelium. **Handb Exp Pharmacol**, n. 176 Pt 1, p. 213-54, 2006.

MORI, M.; GOTOH, T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 275, n. 3, p. 715-9, Sep 7 2000.

MORRISON, R. J.; MILLER, C. C., 3RD; REID, M. B. Nitric oxide effects on shortening velocity and power production in the rat diaphragm. **J Appl Physiol (1985)**, v. 80, n. 3, p. 1065-9, Mar 1996.

MUGGERIDGE, D. J. et al. The effects of a single dose of concentrated beetroot juice on performance in trained flatwater kayakers. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 23, n. 5, p. 498-506, Oct 2013.

MUGGERIDGE, D. J. et al. A single dose of beetroot juice enhances cycling performance in simulated altitude. **Med Sci Sports Exerc**, v. 46, n. 1, p. 143-50, Jan 2014.

MURPHY, M. et al. Whole beetroot consumption acutely improves running performance. **J Acad Nutr Diet**, v. 112, n. 4, p. 548-52, Apr 2012.

MURRANT, C. L.; WOODLEY, N. E.; BARCLAY, J. K. Effect of nitroprusside and endothelium-derived products on slow-twitch skeletal muscle function in vitro. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 72, n. 9, p. 1089-93, Sep 1994.

NOHL, H. et al. Mitochondria recycle nitrite back to the bioregulator nitric monoxide. **Acta Biochim Pol**, v. 47, n. 4, p. 913-21, 2000.

OZYENER, F. et al. Influence of exercise intensity on the on- and off-transient kinetics of pulmonary oxygen uptake in humans. **J Physiol**, v. 533, n. Pt 3, p. 891-902, Jun 15 2001.

PEACOCK, O. et al. Dietary nitrate does not enhance running performance in elite cross-country skiers. **Med Sci Sports Exerc**, v. 44, n. 11, p. 2213-9, Nov 2012.

POOLE, D. C. et al. VO<sub>2</sub> slow component: physiological and functional significance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 26, n. 11, p. 1354-8, Nov 1994.

POOLE, D. C.; JONES, A. M. Oxygen uptake kinetics. **Compr Physiol**, v. 2, n. 2, p. 933-96, Apr 2012.

QUYYUMI, A. A. et al. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. **J Clin Invest**, v. 95, n. 4, p. 1747-55, Apr 1995.

REES, D. D.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 9, p. 3375-8, May 1989.

REUTOV, V. P.; SOROKINA, E. G. NO-synthase and nitrite-reductase components of nitric oxide cycle. **Biochemistry (Mosc)**, v. 63, n. 7, p. 874-84, Jul 1998.

SCHMIDT, H. H. et al. Is arginine a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide? **Eur J Pharmacol**, v. 148, n. 2, p. 293-5, Mar 29 1988.

SCHULZ, E.; ANTER, E.; KEANEY, J. F., JR. Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 9, p. 1093-104, May 2004.

SHEN, W. et al. Endogenous nitric oxide enhances coupling between O<sub>2</sub> consumption and ATP synthesis in guinea pig hearts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, n. 2, p. H838-46, Aug 2001.

SIRI, W. E. Body composition from fluid space and density. In. J. Brozek & A. Hanschel.(Eds).

Techniques for measuring body composition. **National Academy of Science.**, 1961.

SLAWINSKI, J. et al. Effect of supra-lactate threshold training on the relationship between mechanical stride descriptors and aerobic energy cost in trained runners. **Arch Physiol Biochem**, v. 109, n. 2, p. 110-6, Apr 2001.

SUREDA, A. et al. Blood cell NO synthesis in response to exercise. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 1, p. 5-12, Aug 2006.

TANNENBAUM, S. R.; WEISMAN, M.; FETT, D. The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. **Food Cosmet Toxicol**, v. 14, n. 6, p. 549-52, Dec 1976.

TESCH, P. A.; KARLSSON, J. Muscle fiber types and size in trained and untrained muscles of elite athletes. **J Appl Physiol (1985)**, v. 59, n. 6, p. 1716-20, Dec 1985.

THOMPSON, K. G. et al. Influence of dietary nitrate supplementation on physiological and cognitive responses to incremental cycle exercise. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 193, p. 11-20, Mar 1 2014.

VANHATALO, A. et al. Acute and chronic effects of dietary nitrate supplementation on blood pressure and the physiological responses to moderate-intensity and incremental exercise. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 299, n. 4, p. R1121-31, Oct 2010.

VANHATALO, A. et al. Dietary nitrate reduces muscle metabolic perturbation and improves exercise tolerance in hypoxia. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 22, p. 5517-28, Nov 15 2011.

VANHATALO, A. et al. Influence of hyperoxia on muscle metabolic responses and the power-duration relationship during severe-intensity exercise in humans: a 31P magnetic resonance spectroscopy study. **Exp Physiol**, v. 95, n. 4, p. 528-40, Apr 2010.

VASSALLE, C. et al. Influence of chronic aerobic exercise on microcirculatory flow and nitric oxide in humans. **Int J Sports Med**, v. 24, n. 1, p. 30-5, Jan 2003.

WADLEY, G. D.; CHOATE, J.; MCCONELL, G. K. NOS isoform-specific regulation of basal but not exercise-induced mitochondrial biogenesis in mouse skeletal muscle. **J Physiol**, v. 585, n. Pt 1, p. 253-62, Nov 15 2007.

WEBB, A. J. et al. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. **Hypertension**, v. 51, n. 3, p. 784-90, Mar 2008.

WHIPP, B. J. et al. A test to determine parameters of aerobic function during exercise. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 50, n. 1, p. 217-21, Jan 1981.

WILKERSON, D. P. et al. Influence of acute dietary nitrate supplementation on 50 mile time trial performance in well-trained cyclists. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, n. 12, p. 4127-34, Dec 2012.

WONG, G. K.; MARSDEN, P. A. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 11, n. 1, p. 215-20, Jan 1996.

WU, G.; MORRIS, S. M., JR. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J**, v. 336 ( Pt 1), p. 1-17, Nov 15 1998.

WYLIE, L. J. et al. Beetroot juice and exercise: pharmacodynamic and dose-response relationships. **J Appl Physiol (1985)**, v. 115, n. 3, p. 325-36, Aug 1 2013.

WYLIE, L. J. et al. Dietary nitrate supplementation improves team sport-specific intense intermittent exercise performance. **Eur J Appl Physiol**, v. 113, n. 7, p. 1673-84, Jul 2013.



**ANEXO A – Questionário para excluir indivíduos com riscos cardiovasculares (PAR-q).****NOME:**.....**PAR-Q**

A prática regular da atividade física é prazerosa e saudável. A cada dia que passa, torna-se maior o número de pessoas que se tornam, fisicamente mais ativas. Tornar-se fisicamente mais ativo é seguro para a grande maioria das pessoas, entretanto, algumas pessoas necessitam de exames médicos antes de submeter-se a esforço físico maior do que aquele ao qual está acostumado. Dessa forma, se você está planejando tornar-se, fisicamente, mais ativo do que é hoje, comece por responder as sete questões abaixo.

Se você tem idade entre 15 e 69 anos, este questionário (PAR-Q) lhe dirá da necessidade de se submeter a uma consulta médica antes de se engajar em um programa de atividade física. Se você tem mais de 69 anos de idade e não é acostumado a fazer atividades físicas procure seu médico antes de iniciar.

O bom senso é o seu melhor guia quando você for responder estas questões. Por favor, leia com atenção cada uma das questões e responda honestamente a cada uma delas, preenchendo com um "X" a lacuna do SIM ou do NÃO.

1. Alguma vez um médico lhe disse que você possui um problema de coração e recomendou que só fizesse atividade física sob supervisão médica?

SIM NÃO

2. Você sente dor no peito quando pratica atividade física?

SIM NÃO

3. Você sentiu dor no peito, sem fazer esforço, no último mês?

SIM NÃO

4. Você tende a perder a consciência ou cair, como resultado de tonteira?

SIM NÃO

5. Você tem algum problema ósseo, muscular ou articular que poderia ser agravado com a prática de atividade física?

SIM NÃO

6. Algum médico já recomendou o uso de medicamentos para a sua pressão arterial ou condição cardiovascular (ex: diuréticos ou outros)?

SIM NÃO

7. Você tem consciência, através da sua própria experiência ou aconselhamento médico, de alguma outra razão física que impeça lhe impeça de praticar atividade física sem supervisão médica?

SIM NÃO

**Se você respondeu afirmativamente a uma ou mais questões acima, entre em contato com seu médico antes de iniciar a se tornar mais ativo fisicamente. Fale com seu médico do PAR-Q e de qual questões você respondeu afirmativamente. As seguintes situações poderão ocorrer:**

**Observações:**

- 1. Este questionário só deve ser aplicado para aqueles com idades compreendidas entre 15 e 69 anos.**
- 2. Se você está temporariamente doente, como por exemplo: gripado ou com febre, ou não está se sentindo bem neste momento, você deve adiar o início da prática da atividade física.**
- 3. Se você é mulher e está grávida, aconselha-se a discutir o uso do "PAR-Q" com seu médico, antes de iniciar um programa de exercícios.**

**Se houver alguma mudança em seu estado, relativo às questões acima, por favor, traga esta informação ao conhecimento do seu professor/treinador**