

**Cristiano Diniz da Silva**

**EFEITOS DE BEBIDA ACHOCOLATADA SUPLEMENTADA NA  
RECUPERAÇÃO PÓS-EXERCÍCIO**

Belo Horizonte  
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional/UFMG  
2016

**Cristiano Diniz da Silva**

**EFEITOS DE BEBIDA ACHOCOLATADA SUPLEMENTADA NA  
RECUPERAÇÃO PÓS-EXERCÍCIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências do Esporte.

Área de concentração: Treinamento Esportivo

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silami Garcia  
Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Bouzas  
Marins

Belo Horizonte  
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional/UFMG  
2016

S586e Silva, Cristiano Diniz da.  
2016 Efeitos de bebida achocolatada suplementada na recuperação pós-exercício  
[manuscrito] /Cristiano Diniz da Silva. – 2016.  
240f., enc. : il.

Orientador: Emerson Silami Garcia  
Coorientador: João Carlos Bouzas Marins

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional.  
Bibliografia: f. 196-229

1.Exercícios físicos– Aspectos fisiológicos - Teses. 2. Fadiga – Teses. 3. Suplementos nutricionais - Teses. 4.Leucina – Teses. I. Garcia, Emerson Silami. II. Marins, João Carlos Bouzas. III Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional. IV. Título.

CDU:612:796

Ficha catalográfica elaborada pela equipe de bibliotecários da Biblioteca da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional  
Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte

A Tese intitulada “**Efeitos de bebida achocolatada suplementada na recuperação pós-exercício**”, de autoria do doutorando **Cristiano Diniz da Silva**, defendida em 06 de abril de 2016, na Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais, foi submetida à banca examinadora composta pelos professores:

Prof. Dr. Emerson Silami Garcia (orientador)  
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Luciano Sales Prado  
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Eduardo Mendonça Pimenta  
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Carlos Henrique Fonseca  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Maurício Gattás Bara Filho  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Belo Horizonte, 06 de abril de 2016.

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe, Ana Maria Diniz da Silva, a meu pai, Geraldo Araújo da Silva, por serem minha inspiração e exemplo de vida.

À Fabiana Silva Oliveira, minha esposa, por seu amor, aconchego e cuidado oferecido em todos os momentos, sempre confiando em mim, superando distâncias e apoiando as minhas decisões.

À minha irmã, Ana Cristina Diniz da Silva, sempre incentivadora.

Aos amigos e alunos, fonte interminável de inspiração.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, pela força e determinação para chegar até aqui.

Aos não lembrados, pois com certeza cometerei injustiças por falha de memória em não me lembrar de todos que de forma direta ou indireta contribuíram com este trabalho. Também afirmo que mesmo se eu conseguisse me lembrar de todos, ainda assim não caberiam neste documento todos os nomes e o que eu gostaria de dizer a eles.

Aos meus pais, por verem seus olhos brilharem e isso me dizer “siga em frente”.

À minha esposa, Fabiana, que esteve presente e teve participação marcante ao longo de todo o período, ajudando na logística e alicerçando nossos passos na busca do crescimento. Sei que tenho causado muitos problemas por só ter existido uma palavra nos últimos tempos: tese. Estendo o agradecimento, através dela, aos seus familiares que me acolhe sempre carinhosamente e por darem suporte a ela na minha ausência.

Ao estado e povo brasileiro por custear a minha formação no ensino público desde o primeiro dia escolar.

Aos voluntários da pesquisa que, independente dos incômodos se dispuseram com grande boa vontade a participar deste estudo.

Ao professor Dr. Emerson Silami Garcia, figura de admiração desde a graduação por sua importância para a Educação Física, Ciências do Esporte e futebol. Foi mais que um orientador, foi um grande conselheiro e amigo daqueles que te deixam a vontade na medida certa para ter inspiração.

Ao professor Dr. João Carlos Bouzas Marins, que agradeço pelo exemplo profissional e acadêmico, por ter confiado em meu potencial, empreendendo tempo e recursos em meu projeto e em minhas propostas desde o mestrado. Através dele e do professor Israel Teoldo foi viabilizado o financiamento das análises bioquímicas da etapa de estudo principal via Curso de Especialização em Futebol da Universidade Federal de Viçosa.

Ao professor Dr. Ítalo Perrone, que foi tutor na tecnologia de laticínios e de alimentos para um verdadeiro leigo. Através dele tive acesso a sua equipe no INOVALEITE (Nivaldo, Moisés, Cleuber, Ariel, Fernanda, Carolina e Rafael) que ajudaram na execução do protótipo e fabricação dos lotes para experimentação. Praticamente pararam suas atividades e a rotina da planta semi-industrial para me ajudarem.

À Universidade Federal de Minas Gerais, aos professores e funcionários da EEEFTO pela formação maravilhosa e por permitir vivenciar uma proposta de pós-graduação que permitiu tentar inovar. Em especial, aos professores Luciano Prado, Samuel Wanner e Mauro Heleno, por terem dado dicas e pela paciência nas demandas de anuência e regimentos. Agradeço muito ao Hamilton Moreira, sempre atento e solícito as minhas requisições e dúvidas.

À Universidade Federal de Viçosa, aos professores e funcionários do Departamento de Educação Física, Engenharia de Alimentos e Laticínios, Microbiologia e Divisão de Saúde, por terem mantido as portas abertas na minha passagem, o que possibilitou o meu crescimento pessoal e profissional. Ao professor José Ivo do Departamento de Estatística, onde recebo aconselhamento desde mestrado.

À UFJF campus Governador Valadares, por ter me acolhido tão bem e sempre ter entendido as minhas solicitações de viagens para capacitação. Aos professores e funcionários do Departamento de Educação Física da UFJF, aos contatos com demais Departamentos, que através de minhas dúvidas ajudaram a consolidar a base para encarar a reta final do presente trabalho. Fui perguntador chato aos professores Domicio Costa Júnior, Fernando Silva, Sandra Bertelli, Larissa Freitas Bonomo e aos técnicos da BBT Welerson e Aline. Ao Fabrício Sette, grande amigo.

Ao professor Paulo Henrique Costa Paiva, do Instituto Cândido Tostes em Juiz de Fora, amigo de infância e primeiro conselheiro que a ideia de um achocolatado seria possível. Através dele surgiu o contato com o professor Maximiliano da UFMG, Montes Claros, que agradeço por participação inicial nas anuências de apoio para envio ao Comitê de Ética. A professora Dirce Ribeiro de Oliveira da Escola de Enfermagem, Departamento de Nutrição, UFMG, que prestou os mesmos apoios e esteve inclusive na qualificação e foi suplente na defesa.

À técnica Marliane Soares do Bioagro e professora Cláudia Vieira do Departamento de Micobiologia. Através dela conseguimos apoio com a professora Cristina Vanetti para uso do laboratório. Obrigado pela paciência na condução das análises microbiológicas de segurança alimentar e pelas várias tentativas de me ensinar o que as vezes estava muito distante da minha capacidade.

Aos irmãos de pós-graduação UFMG, Leonardo Coelho, Igor Surian, Christiano Veneroso e Thiago Mendes, sempre ensinando o novo sobre a UFMG. Ao Alex Fernandes, companheiro desde Lapeh, UFV, que acolhe bem minhas longas ligações telefônicas.

Aos irmãos de república em Governador Valadares, Marcus Vinicius, Toledo, Helder e Dilson. Com vocês fiz meus primeiros ensaios argumentativos das possibilidades da bebida. Mesmo não tão técnico, vocês acreditaram e me incentivaram a continuar a proposta. Ao Helder, por “transpirar mais que voluntário” para encontrar as garrafinhas “tipo bebida comercial” em Juiz de Fora.

Aos amigos do Lapeh: Mariana Casal, Wellington Sales, Wellington David, Samuel Angelo, Vinícius Vilela, Duílio, Dora, José Francisco, Hamilton, Jaiza, Matheus Cerqueira e Priscila Niquini. Aos amigos lá também presentes, mas de origem na Engenharia de Alimentos, Jeferson Santos e Patrícia Ferreira, que foram oportunos na coleta do último ensaio e fornecimento de materiais bibliográficos para a discussão.

Aos amigos do Nupef, UFV, que através do professor Israel Teoldo, colocou a disposição equipamentos e recursos humanos para colaboração. Foram excepcionais a participação do Marcelo Andrade, Willer Pelluso, Guilherme Machado e Elton Resende. A professora Graciane, UFV, por responder prontamente na ausência do professor Israel.

À empresa Lightsweet Industria e Comercio de Alimentos Ltda que colaborou com doação de amostras.

Aos professores componentes da banca: Luciano Sales Prado, Eduardo Mendonça Pimenta, Carlos Henrique Fonseca e Maurício Gattás Bara Filho pela paciência, orientação e profissionalismo dedicados à confecção dessa tese.



Ama-se mais o que se conquista com esforço.

Benjamin Disraeli

## RESUMO

O objetivo deste trabalho consistiu em analisar os efeitos da suplementação de leucina isolada (L-leucina) numa matriz particularizada de bebida achocolatada sobre marcadores de referência da recuperação após perturbações agudas da homeostase fisiológica e metabólica decorrentes de um protocolo de exercício que simula o futebol. A condição hipotética foi de que a adição de L-leucina criaria um *blend* que sustentaria o potencial anabólico e antiproteolítico desse aminoácido, além de considerar a necessidade e cinética de absorção particulares às demandas recuperativas de atletas de futebol, apresentando, assim, efeito potencial sinérgico ao processo de recuperação, principalmente via resposta insulínica. Após o levantamento de macros e micronutrientes e estabelecimento dos ingredientes e do fluxograma produtivo, desenvolveu-se a bebida achocolatada experimental suplementada com L-leucina [BALL] e uma bebida placebo para controle experimental utilizando a mesma matriz, porém adicionada em equivalência com colágeno bovino hidrolisado [BACH]. Dessa forma, permitiu-se a ingestão isovolumétrica, isonitrogenada e isoenergética entre os tratamentos. Resultados do processo fabril demonstraram que as bebidas apresentaram problemas na saturação em virtude da quantidade de solutos. No entanto, o “corpo de fundo” formado foi passível de correção com a proposta “agite antes de beber”. Ambas as bebidas estiveram dentro dos limites toleráveis de condição microbiológica (aeróbios mesófilos:  $\sim 1.2 \times 10^2$  UFC/mL; coliformes totais:  $\sim 1 \times 10^2$  UFC/mL; e ausência de *Salmonella* sp. e *E.Coli*) para a Instrução Normativa n.º. 16/2005. Esses resultados evidenciam que a BALL atende aos parâmetros exigidos pela legislação para bebida láctea pasteurizada, produto considerado referência por semelhança na ausência de legislação específica para “leite com chocolate suplementado”, resultando em um produto com boa qualidade higiênico-sanitária, indicado para consumo humano. Para a etapa do teste do efeito recuperativo da bebida experimental, 20 voluntários, integrantes do time de futebol da Liga Atlética Universitária, foram designados aleatoriamente (BALL, N=10;  $23 \pm 2$  anos,  $74 \pm 14$  kg,  $174 \pm 5$  cm; BACH, N=10;  $23 \pm 2$  anos,  $73 \pm 7$  kg,  $176 \pm 5$  cm) após protocolo de simulação de futebol (SAFT90+) e monitorados em parâmetros recuperativos até 24 h. Com o uso de BALL pós-exercício, foi observado alto índice de aceitação sensorial afetiva (84% a 90%, para impressão geral, aparência, consistência e sabor), não se modificando na linha do

tempo de ingestão e não ocorrendo comprometimento da sensação de conforto gastrointestinal ( $p > 0,05$ ). A BALL promoveu aumento significativo no nível de insulina após 2 h de ingestão (BALL=  $43 \pm 20 \mu\text{UI/mL}$  vs. BACH=  $21 \pm 10 \mu\text{UI/mL}$ ;  $p < 0,05$ ,  $\eta^2 = 0,24$ ), com probabilidade de significado clínico ou prático observado como “muito provavelmente” (95%;  $2,1 \times / \div \pm 1,7$  [90% IC]). A BALL amortizou respostas de CK e apresentou menor valor significativo às 24 h pós-ingestão (BALL=  $619 \pm 267 \text{ U/L}$  vs. BACH=  $1.208 \pm 731 \text{ U/L}$ ;  $p < 0,05$ ;  $\eta^2 = 0,241$ ) com probabilidade de significado clínico ou prático “observado como provavelmente” (89%;  $1,5 \times / \div \pm 1,3$  [90 % IC]). Não houve modificação significativa no tempo de curso entre as bebidas e no retorno aos valores pré-exercício da testosterona, cortisol, razão testosterona/cortisol, nos marcadores gerais de imunidade, mioglobina e massa corporal e nas escalas de recuperação percebida e dor muscular até 4 h pós-ingestão. As bebidas não comprometeram o hematócrito (BALL=  $47 \pm 2\%$  vs. BACH=  $44 \pm 2\%$ ) e proporcionaram alta taxa de retenção de fluidos até 4 h pós-ingestão (BACH=  $78 \pm 19\%$ ; BALL=  $79 \pm 13\%$ ), sem diferença entre elas ( $p > 0,05$ ). Contudo, houve comprometimento dos *status* de hidratação via gravidade específica da urina, com a maioria dos voluntários sendo classificados como “desidratação significativa” ou “grave” (BALL= 70%; BACH= 100%), prejuízos no delta do volume plásmatico (BALL=  $\sim -2.2 \pm 4.2\%$  e BACH=  $\sim -1.1 \pm 5\%$ ), assim como não restabelecimento da sensação de sede para valores pré-exercício até 4 h pós-ingestão. Conclui-se que a intervenção com BALL promoveu aumento sinérgico significativo na insulina após 2 h de ingestão, apresentando alto escore de aceitação sensorial afetiva, não comprometimento da sensação de conforto gastrointestinal e alta taxa de retenção de fluidos, assim como amortização de respostas de CK às 24 h pós-ingestão. No entanto, a BALL não proporcionou diferenças significativas na percepção de dor muscular, testosterona, cortisol, razão T/C, nos marcadores gerais de imunidade, mioglobina e massa corporal e nas escalas de recuperação percebida e dor muscular. Segundo Resolução RDC n.º 18/2010, a BALL constitui-se em “suplemento para substituição parcial de refeições para atletas”.

**Palavras-chave:** Exercício. Fadiga. Recuperação. Suplementos nutricionais. Leucina. Bebida achocolatada.

## ABSTRACT

The objective of this study is to examine the effects of supplementation of isolated leucine (L-leucine) in a particularized array of chocolate milk drink on the recovery reference markers after acute disorders of physiological and metabolic homeostasis due to an exercise protocol that simulates soccer. The hypothetical condition was that the addition of L-leucine would create a blend that would sustain the anabolic potential and anti-proteolytic of this amino acid, furthermore to considering the need and kinetics of specific absorption to recovery demands of soccer players, presenting therefore, synergistic potential effect to the recovery process, especially via insulin response. After the lifting of macro and micronutrients and establishment of the ingredients and production of the flow chart, the experimental chocolate beverage supplemented with L-leucine [BALL] and a placebo drink was developed for experimental control using the same array, however added in equivalence with bovine collagen hydrolyzate [BACH]. Thus, isovolumetric intake, isonitrogenous and isoenergetic was allowed during treatments. Results demonstrated that the manufacturing process of the drinks presented problems in saturation due to the amount of solute. However, the "background body" formed was subject to correction with the proposed "shake before drinking." Both drinks were within tolerable limits of microbiological condition (aerobic mesophilic:  $\sim 1.2 \times 10^2$  CFU/mL, total coliforms:  $\sim 1 \times 10^2$  CFU/mL, and absence of Salmonella and E.Coli) to the Normative Instruction. 16/2005. These results show that BALL meets the parameters required by law to pasteurized milk drink, a product considered a reference for similarity in the absence of specific legislation in Brazil to "chocolate milk supplemented", resulting in a product with good sanitary conditions, suitable for human consumption. For recovery effect of the test phase of such experimental drink, 20 volunteers, soccer team members of the University Athletic League were randomly assigned (BALL, N= 10,  $23 \pm 2$  years,  $74 \pm 14$  kg,  $174 \pm 5$  cm; BACH, N= 10;  $23 \pm 2$  years  $73 \pm 7$  kg  $176 \pm 5$  cm) after soccer simulation protocol (SAFT90+) and recovery monitored parameters to 24 h. Using BALL after exercise, it was possible to observe a high affective sensory acceptance rate (84% to 90% for general impression, appearance, consistency and flavor), which did not modify the timeline of ingestion with no occurrence of gastrointestinal discomfort ( $p > 0.05$ ). BALL caused a significant increase in the insulin level for 2 h after ingestion (BALL=  $43 \pm 20$   $\mu$ UI/mL vs.  $21 \pm 10$

BACH=  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ;  $p < 0.05$ ,  $\eta^2 = 0.24$ ) with clinical probability or practical significance observed as "very likely" (95%;  $2.1 \times \div \pm 1.7$  [90% CI]). BALL amortized CK answers and showed less significant value at 24 h post-ingestion (BALL=  $619 \pm 267$  U/L vs. BACH=  $1,208 \pm 731$  U/L;  $p < 0.05$ ,  $\eta^2 = 0.241$ ) with clinical probability or practical significance "seen as likely" (89%;  $1.5 \times \div \pm 1.3$  [90% CI]). There was no significant change in time course between drinks and return to pre-exercise values of testosterone, cortisol, testosterone/cortisol ratio (T/C) in general markers of immunity, myoglobin and body mass and the recovery scales perceived and muscle pain to 4 hours post-ingestion. Beverages do not affect hematocrit (BALL=  $47 \pm 2\%$  vs. BACH=  $44 \pm 2\%$ ) and cause high rate of fluid retention of up to 4 h after ingestion (BACH=  $78 \pm 19\%$ ; BALL=  $79 \pm 13\%$ ), with no difference between them ( $p > 0.05$ ). However, there was impairment of the hydration status via urine specific gravity, with most of the volunteers classified as "significant dehydration" or "severe" (BALL= 70%; BACH= 100%), losses in the delta plasma volume (BALL=  $\sim -2.2 \pm 4.2\%$  and BACH=  $\sim -1.1 \pm 5\%$ ), and not restoring the sensation of thirst for pre-exercise values up to 4 h after ingestion. In conclusion, that the intervention with BALL caused a significant synergistic increase in insulin after 2 h of ingestion, showing high score affective to sensory acceptance, no feeling of gastrointestinal discomfort and high rate of fluid retention, as well as amortization of CK responses at 24 h post-ingestion. However, BALL did not reveal significant differences in perception of muscle pain, testosterone, cortisol, the T/C in the general markers of immunity, myoglobin, body weight and the perceived recovery scales and muscle pain. According to Resolution RDC n.º. 18/2010, BALL is constituted as a "supplement for partial meal replacement for athletes."

**Keywords:** Exercise. Fatigue. Recovery. Nutrition supplements. Leucine. Chocolate milk.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada.....	60
Figura 2 – Eventos de sinalização na estimulação de iniciação da tradução para síntese de proteínas por leucina. ....	63
Figura 3 – Plataforma Inovaleite da Universidade Federal de Viçosa. ....	98
Figura 4 – Fluxograma de processamento das bebidas experimentais. ....	99
Figura 5 – Ilustração de etapas das análises microbiológicas de segurança alimentar.....	106
Figura 6 – Ilustração esquemática do protocolo de exercício que simula partida de futebol SAFT90+. ....	110
Figura 7 – Etapa de envase na fabricação das bebidas achocolatadas.....	121
Figura 8 – Ilustração do protocolo de exercício que simula partida de futebol (SAFT90+).....	128
Figura 9 – Voluntário fazendo ingestão de bebida achocolatada experimental durante a fase de recuperação pós-exercício. ....	128
Gráfico 1 – Escala de esforço percebido (escala de Borg) durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	134
Gráfico 2 – Visual analogue scale (VAS) durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	135
Gráfico 3 – Escala psicofísica de dor durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	136
Gráfico 4 – Escala de recuperação percebida durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada. ....	137
Gráfico 5 – Insulina sérica durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada. ....	139
Gráfico 6 – Testosterona sérica durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	140
Gráfico 7 – Cortisol sérico durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada. ....	141
Gráfico 8 – Razão testosterona/cortisol durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	142

Gráfico 9 – Massa corporal durante o período de experimento em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	144
Gráfico 10 – Gravidade específica da urina (GEU) durante o período de experimento em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada. ....	145
Gráfico 11 – Sensação de sede durante o período de experimento em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	147
Gráfico 12 – Hematócrito durante o período de experimento em resposta ao exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	148
Gráfico 13 – Creatina quinase sérica durante o período de experimento em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	150
Gráfico 14 – Mioglobina sérica durante o período de experimento em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	151
Gráfico 15 – Leucócitos sanguíneos durante o período de experimento função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	152
Gráfico 16 – Neutrófilos sanguíneos durante o tratamento experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	153
Gráfico 17 – Linfócitos sanguíneos durante o tratamento experimental função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	154
Gráfico 18 – Razão neutrófilos/linfócitos durante o tratamento experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.	156
Quadro 1 – Estudos que utilizaram bebida achocolatada como ingestão nutricional recuperativa pós-exercício. ....	77
Quadro 2 – Cronologia dos eventos do delineamento da pesquisa. ....	92
Quadro 3 – Comparativo entre o protocolo de exercício para simulação de partida de futebol original SAFT90 e o adaptado para o presente estudo (SAFT90+).....	109
Quadro 4 – Metodologia da análise bioquímica. ....	114
Quadro 5 – Bebidas achocolatadas experimentais e constituição regulamentar de suplementos para substituição parcial de refeições de atletas segundo RDC n.º 18/2010. ....	123
Equação 1 – Cálculo de densidade corporal.....	94
Equação 2 – Equação de Siri.....	94
Equação 3 – Cálculos do consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ) .....	95
Equação 4 – Cálculo das alterações no volume plasmático .....	115

Equação 5 – Cálculo de retenção de fluidos .....	116
Equação 6 – Cálculo do Índice de Aceitabilidade (IA):.....	118



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração peso por volume (%p/v) dos ingredientes para produção das bebidas experimentais.....	97
Tabela 2 – Composição e informação nutricional da refeição pré-exercício. ....	107
Tabela 3 – Gravidade específica da urina e graus de desidratação.....	115
Tabela 4 – Análise microbiológica das amostras de lote das bebidas achocolatadas. ....	122
Tabela 5 – Informação nutricional das bebidas achocolatadas experimentais.....	124
Tabela 6 – Característica pré-exercício e pós-exercício dos grupos experimentais. ....	127
Tabela 7 – Índice de aceitabilidade das bebidas achocolatadas na ingestão pós-exercício.....	129
Tabela 8 – Avaliação da preferência global das bebidas achocolatadas experimentais na ingestão pós-exercício. ....	130
Tabela 9 – Escores da aceitação afetiva dos atributos das bebidas achocolatadas de tratamento experimental na linha de tempo de ingestão pós-exercício.....	131
Tabela 10 – Percepção gastro-intestinal após ingestão das bebidas achocolatadas. ....	133
Tabela 11 – Classificação percentual dos voluntários para grau de desidratação “significativa” e “grave” segundo a gravidade específica da urina.....	146
Tabela 12 – Delta do volume plasmático segundo os fatores “bebida” e “momento de ingestão” durante a recuperação pós-exercício. ....	149
Tabela 13 – Ponto de corte para normalidade clínica de marcadores bioquímicos durante o tratamento experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.....	157

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Aminoácidos

ABC: Academia Brasileira de Ciência

ABENUTRI: Associação Brasileira de Empresas de Produtos Nutricionais

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

acetil-CoA: acetilcoenzima A

ACR: Aminoácidos de Cadeia Ramificada

ACTN: Alfa-actinas

Akt= Protein kinase B (PKB)

AMDR: Acceptable Macronutrients Distribution Ranges

AMP: Adenosina Monofosfato

AMPK: AMP-activated protein quinase

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP: Adenosina Trifosfato

B(CHO): Bebida contendo Carboidratos

B(CHO-PRO): Bebida contendo Carboidratos e Proteínas

BAC: Bebida Achocolatada Comercial

BACH: Bebida Achocolatada e Colágeno Hidrolisado

BALL: Bebida Achocolatada e L-leucina

Bar= unidade de pressão e equivale a exatamente 100 000 Pa ( $10^5$  Pa)

BEC(CHO-E): Bebida Esportiva Comercial contendo Carboidratos e Eletrólitos

BPF: Boas Práticas de Fabricação

BRASNUTRI: Associação Brasileira dos Fabricantes de Suplementos Nutricionais e Alimentos para Fins Especiais

C6P: glicose-6-fosfato

CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CBH: Colágeno Bovino Hidrolisado

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CHO: Carboidratos

CK: Creatina Quinase

CLA: Ácido Linoléico Conjugado

CMJ: Counter Movement Jump

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
COEP: Comitê de Ética em Pesquisa (UFMG)  
CPS: Concentrado Proteico do Soro  
CTIT: Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica  
DMIT: Dor Muscular de Início Tardio  
DOMS: Delayed Onset Muscle Soreness  
Dp: Desvio padrão  
EAE: Escore de Aminoácidos Essencias  
EEFFTO: Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional  
EER: Estimate Energy Requeriment  
EIDM: exercício indutor de dano muscular  
eIF4G: fator de iniciação eucariótico 4G  
EP: Erro Padrão  
FC: Frequência Cardíaca  
FCM: Frequência Cardíaca Máxima  
FDA/BAM: Food and Drug Administration/Bacteriological Analytical Manual  
fMRI: Ressonância Magnética Funcional  
GEU: Gravidade Específica da Urina  
GH: Growth Hormone  
GLUT-4: Proteína transportadora de glicose-4  
GMP: Glicomacropéptídeos  
GOR: Gordura  
HDL: High Density Lipoproteins  
HMB: Beta-hidroxi-beta-metilbutirato  
HPA: Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal  
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IC95: Intervalo de Confiança de 95%  
ICMSF: The International Commission on Microbiological Specifications for Foods  
IDR: Ingestão diária recomendada  
IG: Índice Glicêmico  
Ig's: Imunoglobulinas  
IL-6: Interleucina 6  
IPAQ: International Physical Activity Questionary

IPE: Índice de Percepção do Esforço  
IPS: Isolado proteico do Soro  
ISAK: International Society for the Advancement of Kinanthropometry  
ITRS: Infecções do Trato Respiratório Superior  
K<sup>+</sup>: Potássio  
K<sub>ATP</sub>: canal de de potássio dependente de ATP  
L: Litro  
LAPEH: Laboratório de Performance Humana  
LDH: Lactato Desidrogenase  
LDL: Low Density Lipoproteins  
LIS: limite da ingestão segura  
LSIS: Limite Superior da Ingestão Segura  
m/m: massa/massa  
mL: mililitros  
m/s= metros por segundo  
m: metros  
Mb: mioglobina  
MC: Massa Corporal  
MCf: Massa Corporal Final  
mcg: microgramas  
MCi: Massa Corporal Inicial  
MET: Equivalente Metabólico da Tarefa  
mg/L: miligramas por Litro  
mg: miligrama  
Min: Minutos  
mL: Mililitro  
MME: Média Marginal Estimada  
mmol/L: milimol por Litro  
mTOR: Mammalian Target of Rapamycin  
N/L: Razão Linfócitos/Neutrófilos  
Na<sup>+</sup>: Sódio  
NF-κB: Fator Nuclear κB  
ng/dL= Nanograma por decilitro

ng/mL= Nanograma por mililitro  
P&D: pesquisa e desenvolvimento  
p70S6k: proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA  
PAR-Q: Physical Activity Readiness Questionnaire  
PDCAAS: Protein digestibility-corrected amino acid score  
PEAD: Polietileno de Alta Densidade  
pH: Potencial Hidrogeniônico  
PKB-GS: proteína quinase-B; glicogênio síntase  
pmol/L: Picomoles por Litro  
PPGCE: Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte  
ppm: Partes por Milhão (ppm)  
PRO: Proteínas  
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada  
rpm: rotações por minuto  
RTIQBL: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Bebida Láctea  
SAFT<sup>90</sup>: Soccer-Specific Aerobic Field Test  
SAFT<sup>90+</sup>: Soccer-Specific Aerobic Field Test adaptado  
s-IgA: Imunoglobulina Salivar A  
SNA= Sistema Nervoso Autônomo  
SNC: Sistema Nervoso Central  
SNS= Sistema Nervoso Simpático  
T/C: Razão Testosterona/Cortisol  
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$   
U/L: Unidade Internacional por Litro  
UA: Unidade Arbitrária  
UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônias por mililitro  
UFC: Unidades Formadoras de Colônia  
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais  
UFV: Universidade Federal de Viçosa  
UHT: Ultra High Temperature  
UR= Umidade Relativa

USDA/FSIS-MLG: United States Department of Agriculture Agency/Food Safety and Inspection Service (FSIS)-Microbiology Laboratory Guidebook

VET: Valor Energético Total

VO<sub>2max</sub>: Volume de Consumo Máximo de Oxigênio

Vps34= phosphoinositide 3-kinase

Wmax: Peak Power output

WW<sup>-1</sup>: quilo seco

Yo-Yo IR2: Yo-Yo Intermittente Recovery Test Level 2

αLA: Alfa-lactoalbumina

βLG: Beta-lactoglobulina

η<sup>2</sup>: *Eta-squared statistic*

%FCM: Percentual da frequência cardíaca máxima

%p/v: Concentração Peso por Volume

μg/dL: Micrograma por decilitro

μUI/mL= Microunidade Internacional por mililitro

4E-BP1: proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E

vs.: Versus

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	27
1.1.	Objetivo geral .....	30
1.2.	Objetivos específicos .....	30
1.3.	Justificativa.....	31
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	33
2.1.	Respostas fisiológicas e motoras do futebol .....	34
2.2.	Substratos energéticos no futebol.....	35
2.3.	Fadiga e distúrbio metabólico decorrentes do futebol.....	37
2.4.	O futebol como exercício indutor de dano e dor muscular .....	41
2.5.	O futebol e imunocompetência.....	46
2.6.	Nutrição recuperativa pós-exercício para futebolistas.....	50
2.6.1.	Necessidades dietéticas .....	51
2.6.2.	Balanço anabolismo e catabolismo.....	54
2.6.3.	Metabolismo de proteínas, aminoácidos e regulação da síntese proteica muscular .....	57
2.6.4.	Estratégias nutricionais e síntese de glicogênio muscular .....	64
2.6.5.	Nutrição e imunocompetência.....	69
2.6.6.	Reposição de fluidos e eletrólitos pós-exercício .....	71
2.7.	Uso de bebidas achocolatadas na recuperação .....	73
2.8.	Lacunas para inovação em bebidas achocolatadas aplicada ao esporte e atividade física .....	81
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	88
3.1.	Geral .....	88
3.2.	Hipóteses estatísticas .....	88
	Hipótese nula ( $H_0$ ).....	88
	Hipótese alternativa ( $H_1$ ) .....	88

<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODO</b>	<b>89</b>
4.1.	Cuidados Éticos	89
4.2.	Amostra de voluntários	89
4.3.	Avaliação do estado de saúde e critérios de inclusão e exclusão de voluntários	90
4.4.	Delineamento experimental	90
4.5.	Procedimentos	93
4.5.1.	Caracterização dos voluntários	93
4.5.2.	Formulação e processamento das bebidas experimentais	95
4.5.3.	Enquadramento legal das bebidas experimentais	101
4.5.4.	Plano de amostragem e segurança alimentar	103
4.5.5.	Avaliações microbiológicas e segurança alimentar	104
4.5.6.	Levantamento dietético e refeição pré-exercício	106
4.5.7.	Protocolo de exercício que simula partida de futebol (SAFT90+)	108
4.5.8.	Protocolo de hidratação pré- e durante exercício	111
4.5.9.	Abordagem de ingestão das bebidas experimentais	111
4.5.10.	Avaliações bioquímicas sanguíneas	113
4.5.11.	Avaliações da urina e de retenção hídrica	115
4.5.12.	Avaliações subjetivas de monitoramento recuperativo	116
4.5.13.	Análise sensorial e conforto gastrointestinal	116
4.6.	Orientações adicionais aos voluntários	119
4.7.	Análise estatística	119
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>121</b>
5.1.	Processo piloto das bebidas achocolatadas	121
5.2.	Segurança alimentar	121
5.3.	Categorização alimentar frente a legislação brasileira	123
5.4.	Caracterização pré-exercício e pós-exercício dos grupos experimentais	125



5.5.	Análise sensorial .....	129
5.6.	Sensação de conforto gastrointestinal .....	131
5.7.	Escalas subjetivas de esforço, dor e recuperação .....	133
	a) Intensidade de esforço percebido (escala de Borg) .....	134
	b) Visual analogue scale (VAS).....	135
	c) Dor psicofísica.....	136
	d) Recuperação percebida.....	137
5.8.	Respostas hormonais.....	138
	a) Insulina.....	138
	b) Testosterona .....	139
	c) Cortisol .....	140
	d) Razão testosterona/cortisol (T/C) .....	141
5.9.	Estado da hidratação .....	143
	a) Massa corporal .....	143
	b) Gravidade específica da urina (GEU) .....	144
	c) Sensação de sede .....	146
	d) Hematócrito.....	147
	e) Volume plasmático.....	148
	f) Retenção de fluidos .....	149
5.10.	Dano muscular.....	149
	a) Creatina Quinase .....	149
	b) Mioglobina.....	150
5.11.	Respostas imunológicas .....	151
	a) Leucócitos.....	151
	b) Neutrófilos.....	153
	c) Linfócitos .....	154
	d) Razão neutrófilos/linfócitos (N/L) .....	155

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	158
6.1.	Análise sensorial afetiva e conforto gastrointestinal.....	159
6.2.	Resposta insulínica .....	164
6.3.	Dano muscular e perceptivas de dor, esforço e recuperação .....	168
6.4.	Respostas imunológicas .....	172
6.5.	Resposta da testosterona e cortisol .....	179
6.6.	Respostas do estado de hidratação .....	182
6.7.	Categorização legal da bebida.....	187
6.8.	Limitações .....	188
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	195
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	196
	<b>ANEXO 1</b> .....	230
	<b>ANEXO 2</b> .....	231
	<b>ANEXO 3</b> .....	232
	<b>ANEXO 4</b> .....	233
	<b>ANEXO 5</b> .....	234
	<b>ANEXO 6</b> .....	235
	<b>ANEXO 7</b> .....	236
	<b>ANEXO 8</b> .....	237
	<b>ANEXO 9</b> .....	238
	<b>ANEXO 10</b> .....	239
	<b>ANEXO 11</b> .....	240

## 1 INTRODUÇÃO

Treinadores de elite estão buscando cada dia mais tomada de decisão sobre atividades e meios de recuperação pós-treinamento ou competição para atletas com base em evidências (HALSON, 2014; VENTER, 2014; WILLIAMS *et al.*, 2007). Tal preocupação desponta pelo fato de que atletas passam a maioria do tempo se recuperando, o que comprova que propostas de recuperação devem ser usadas de forma sistemática para otimizar as condições situacionais do ciclo estímulo-adaptação que as sessões de treinamentos ou competição podem promover.

Conceitualmente, recuperação é um processo multifatorial, dependente da intervenção de estratégias nutricionais, psicológicas, terapêuticas e sociais, com objetivo de restabelecer mais eficazmente as capacidades de desempenho dos atletas (HAUSSWIRTH *et al.*, 2013; KENTTÄ *et al.*, 1998). Portanto, o processo de recuperação deve ser orientado para a ação estratégica, com atividades a serem iniciadas pelos próprios atletas (recuperação pró-ativa), assumindo comportamentos e hábitos comprometidos com o processo, visando assim construir defesas e recursos pessoais de proteção e criação de bons hábitos (KELLMANN, 2010).

O modelo de recuperação atual aponta que, com níveis intermediários de perturbação da homeostase, atletas podem alcançar um nível ideal de desempenho pelo simples período de recuperação (KELLMANN, 2002). No entanto, quando níveis de perturbação da homeostase são intensificados, indivíduos podem se tornar incapazes de suplantar as exigências adaptativas do organismo se eles não se envolverem em estratégias adicionais de recuperação (KELLMANN, 2002; PASTRE *et al.*, 2009). Assim, no esporte voltado ao alto rendimento, é prudente adotar atividades ou estratégias propositadas para recuperação ideal, pois isso permitirá que o atleta execute a próxima sessão de treino ou de competição se sentindo descansado e não fatigado, o que possibilita adaptação saudável e redução da probabilidade de lesões (NÉDÉLEC *et al.*, 2013).

O cumprimento de necessidades dietéticas é fundamental para a efetividade do processo recuperativo (BURKE *et al.*, 2006; HAWLEY *et al.*, 2006). Dessa forma, a adoção de práticas alimentares adequadas e imediatas após exercícios apresenta uma série de vantagens para o atleta, como, por exemplo: proporciona o pleno

aproveitamento dos estímulos do treinamento; acelera a capacidade de recuperação entre treinos; contribui para a manutenção do peso e da composição corporal; contribui para a capacidade de concentração; melhora o tempo de reação; e pode reduzir o risco de doenças e lesões (BURKE *et al.*, 2014; BURKE, 1997).

Por conter carboidratos e proteínas de alto valor biológico, fornecendo todos os aminoácidos essenciais, bebidas achocolatadas têm sido investigadas recentemente como uma forma potencial e efetiva para recuperação de atletas de *endurance* (FERGUSON-STEGALL *et al.*, 2011; KARP *et al.*, 2006; PRITCHETT *et al.*, 2009; THOMAS *et al.*, 2009), de escalada (POTTER *et al.*, 2015) e de futebol (GILSON *et al.*, 2010; SPACCAROTELLA *et al.*, 2011).

Uma das hipóteses de efeitos positivos esperados da ingestão de bebidas achocolatadas para recuperação estaria na resposta insulínica aumentada pela combinação CHO-PRO presentes (~3:1), fenômeno conhecido como hiperinsulinemia sinérgica, que sinaliza para efeitos anabólicos (DETKO *et al.*, 2013; VAN LOON *et al.*, 2000a; VAN LOON *et al.*, 2000b). Além disso, o leite bovino é possuidor de aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) que tem sido frequentemente utilizados por atletas com a finalidade de promover anabolismo proteico muscular, atenuar a fadiga central, estimular a secreção de insulina, melhorar os processos imunológicos e atenuar a lesão muscular induzida pelo exercício (DA LUZ *et al.*, 2011).

No entanto, por talvez serem testadas propostas comerciais de bebidas achocolatadas, sem considerar formulações particulares para atletas, alguns estudos falharam em demonstrar recuperação superior em parâmetros inflamatórios, danos musculares e perceptivos de dor pós-exercício, em comparação a bebida esportiva comercial contendo carboidratos e eletrólitos [BEC(CHO-E)] (FERGUSON-STEGALL *et al.*, 2011; GILSON *et al.*, 2010; KARP *et al.*, 2006; PRITCHETT *et al.*, 2009; RANKIN *et al.*, 2004; SPACCAROTELLA *et al.*, 2011; THOMAS *et al.*, 2009; WOJCIK *et al.*, 2001).

Dessa forma, lacunas de inovação e tecnologia apontam para formulação e desenvolvimento de bebidas achocolatadas mais específicas para aplicação em atletas com suas demandas particulares. A adição de produto(s) ou ingredientes(s)

alimentícios(s) ou suplementação de interesse com balanço de massa particular, dentro do que permitem as normativas para formulação, aditivos tecnológicos e critérios de ordem sanitária e de conservação para consumo humano, podem originar novos produtos com base em inovação, ou mesmo o melhoramento funcional, através da chamada inovação tecnológica incremental (TIDD *et al.*, 2015).

Entre as diversas possibilidades de formulação, a modificação de bebidas achocolatadas poderia ser considerada uma suplementação com leucina isolada (L-leucina). Diversos estudos vêm demonstrando potencial anabólico por estimular o início do processo de tradução proteica e da sinalização celular via cascata da mTOR (ANTHONY *et al.*, 2000; KATO *et al.*, 2015; ROWLANDS *et al.*, 2015). Além disso, esse aminoácido é considerado um potente secretagogo de insulina, pois é capaz de estimular agudamente a secreção desse hormônio nas células  $\beta$  pancreáticas, servindo de combustível metabólico e ativador alostérico da enzima glutamato desidrogenase, que catalisa a desaminação oxidativa do glutamato endógeno, estando este presente em concentração elevada nas células  $\beta$  pancreáticas (VETTERLI *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2001).

Embora o efeito da leucina já venha sendo amplamente descrito na literatura, há relatos de que a suplementação com L-leucina poderia causar desbalanço na concentração de aminoácidos plasmáticos, sugerindo então um possível efeito antagônico sobre a aminoacidemia com uso crônico (MATTHEWS, 2005; VERHOEVEN *et al.*, 2009). Além disso, dados recentes demonstram claramente que a adição de leucina a proteínas de soro de leite não resultou em respostas anabólicas superiores após exercício contrarresistência (TIPTON *et al.*, 2009). Portanto, a alternativa de suplementação de L-leucina juntamente com produtos lácteos que contenham naturalmente proteínas (PRO), gordura (GOR) e carboidratos (CHO), como se dá na constituição convencional de bebidas achocolatadas, poderá evitar antagonismos sobre a aminoacidemia e potencializar respostas anabólicas, restabelecimento na homeostase de glicose e respostas benéficas na inflamação muscular e sistêmica para reparação de danos musculares.

Propostas como uma bebida achocolatada suplementada com L-leucina poderiam permitir efeitos sinérgicos ao processo recuperativo, assim como os evidenciados por uso de *blends* proteicos, hidrolisados de leucina e CHO na ampliação da

resposta insulínica (JENTJENS *et al.*, 2001; KAASTRA *et al.*, 2006; KOOPMAN *et al.*, 2005; ROWLANDS *et al.*, 2015), na estocagem de glicogênio muscular associada à hiperinsulinemia (DETKO *et al.*, 2013; JENTJENS *et al.*, 2001; KAASTRA *et al.*, 2006; VAN LOON *et al.*, 2000b) e na ação imunomoduladora de leucócitos e neutrófilos (NELSON *et al.*, 2013). Outra aplicabilidade esperada da bebida achocolatada formulada pode ser para restabelecimento de reidratação pós-exercício. Por ser um fluido altamente energético e com alta concentração de eletrólitos, há um processo de esvaziamento mais lento do estômago, atenuando as grandes flutuações da osmolalidade do plasma (JAMES, 2012; MARSHALL, 2004). Esse problema é muito comum com o consumo de grandes quantidades de água ou de BEC(CHO-E) trazendo prejuízos de retenção hídrica (MAUGHAN *et al.*, 2004).

Nesse sentido, formulações especiais de bebidas achocolatadas para jogadores de futebol como a intentada no presente estudo poderão permitir estratégias alimentares imediatas e efetivas para modulação de processos recuperativos agudos. Sabe-se que o jogo de futebol pode representar estresse fisiológico significativo para os jogadores, o que pode ser notado pela magnitude de respostas do sistema endócrino, sistema imunológico ou dano muscular (microtraumas), além de depleção significativa dos estoques de energia e perda de líquidos (MALM *et al.*, 2004; NÉDÉLEC *et al.*, 2012; REILLY *et al.*, 2005).

### **1.1. Objetivo geral**

Analisar os efeitos da suplementação de L-leucina numa matriz particularizada de bebida achocolatada sobre marcadores de referência da recuperação após perturbações agudas da homeostase fisiológica e metabólica decorrentes de um protocolo de exercício que simula o futebol.

### **1.2. Objetivos específicos**

Verificar o efeito da bebida experimental no comportamento das seguintes variáveis:

- i) Teste de aceitação sensorial afetiva.
- ii) Percepção da sensação de conforto gastrointestinal.
- iii) Hormônios insulina, cortisol e testosterona.

- iv) Percepção de esforço, dor muscular e recuperação percebida.
- v) Estado de hidratação (massa corporal, gravidade específica da urina, hematócrito, volume plasmático, retenção de fluidos e sensação de sede).
- vi) Marcadores de danos musculares (creatina quinase e mioglobina).
- vii) Marcadores imunes de mobilização (leucócitos e sub-classes).

### 1.3. Justificativa

O uso de bebida achocolatada tem sido proposto como estratégia alimentar para recuperação pós-exercício (FERGUSON-STEGALL *et al.*, 2011; KARP *et al.*, 2006; PRITCHETT *et al.*, 2009; THOMAS *et al.*, 2009; POTTER *et al.*, 2015; GILSON *et al.*, 2010; SPACCAROTELLA *et al.*, 2011). No entanto, esses estudos utilizaram propostas comercializadas e não intencionalmente formuladas para recuperação de atletas, observando resultados conflitantes. Nesse sentido, há escassez de estudos com propostas de desenvolvimento de formulações particulares de bebidas achocolatadas experimentais para fins recuperativos pós-exercícios, assim como estudos bem controlados para verificação do efeito de sua ingestão. Adicionalmente, há escassez de evidências que buscam correlacionar os efeitos desses compostos sobre a recuperação no futebol.

A suplementação de L-leucina tem sido amplamente investigada, uma vez que a sua taxa anabólica é maior quando comparada à de isoleucina e valina. Contudo, há evidências de que a suplementação com leucina isolada possa ocasionar efeitos antagônicos sobre a concentração plasmática de aminoácidos (especialmente de isoleucina e valina), impedindo de forma aguda que ela estimule a ativação/fosforilação de proteínas envolvidas na cascata de sinalização proteica muscular.

Na bebida achocolatada, há naturalmente presença de aminoácidos de rápida (whey) e lenta absorção (caseína), o que poderia evitar antagonismos sobre a aminoacidemia. Assim, com o uso de L-leucina isolada para suplementação de uma matriz de bebida achocolatada, cria-se um *blend* que poderia sustentar o potencial

anabólico e antiproteolítico desse aminoácido. Além disso, esse efeito da suplementação somar-se-á à formulação matriz particularizada, considerando a necessidade e cinética de absorção particulares às demandas recuperativas de atletas de futebol, apresentando, assim, efeito potencial sinérgico ao processo de recuperação, sobretudo via resposta insulínica.

Outra perspectiva é a produção de uma BALL livre de lactose, o que colaboraria para a popularização dessa proposta na dieta de atletas, pelo fato de boa parcela da população mundial sofrer de intolerância à lactose. Espera-se que essa formulação possa se tornar uma alternativa de alimentação de atletas voltada a recuperação pós-exercício, pois, além dos efeitos esperados, essa forma de produto tem apelo sensorial, por ser saborosa ou aprazível ao paladar.

Pretende-se com esse tema instigar pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novos produtos considerando as estratégias de utilização dos alimentos funcionais na nutrição esportiva. Nesse sentido, o desenvolvimento do protótipo da bebida achocolatada suplementada cria oportunidades de "*know-how*" e avanço no patamar tecnológico à medida que disponibiliza um produto de alto valor agregado, custo relativamente baixo e de forte apelo funcional e de saúde.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Jogadores de futebol passam a maior parte do dia se recuperando dos estímulos das sessões de treinamentos ou jogos (DUPONT *et al.*, 2010). Portanto, a necessidade de recuperar eficazmente o jogador torna-se evidente, e a estratégia nutricional pós-exercício adotada pode desempenhar papéis essenciais no processo recuperativo (NÉDÉLEC *et al.*, 2013).

Uma das regras básicas para a saúde é que os atletas devem manter um equilíbrio entre as suas necessidades de nutrição e dieta, a fim de restaurar funções biológicas perturbadas pelo exercício (BURKE, 1997). Outro ponto de vista é considerar o rendimento esportivo, onde jogadores de futebol devem consumir uma dieta que contenha uma quantidade de calorias adequada que permita a manutenção da massa corporal e seja suficiente para atender a demanda de treinos e jogos (WILLIAMS *et al.*, 2006). Sendo assim, para intervir eficazmente no processo recuperativo pós-jogo há necessidade de entendimento dos mecanismos de fadiga no futebol e identificação dos fatores que poderão exercer influência efetiva no processo de restabelecimento da homeostase (NÉDÉLEC *et al.*, 2012).

Procurando maior aplicabilidade, atletas, treinadores e nutricionistas esportivos têm se esforçado para encontrar uma estratégia nutricional pós-exercício adequada e viável visando melhorar a reparação de processos deletérios causados pelo exercício, e conseqüentemente, mantendo ou melhorando a qualidade dos treinos ou desempenhos esportivos futuros.

Desta forma, essa revisão tem como objetivo ampliar o entendimento da fadiga e recuperação no futebol, apresentando tópicos que apresentaram evidências sobre as respostas fisiológicas e motoras, distúrbios metabólicos, danos musculares e imunocompetência moduladas pelas demandas de jogo. Além disso, será apresentado como a intervenção nutricional poderá modular processos recuperativos de jogadores a partir das características de demanda energética, depleção de fontes e metabolismo pós-exercício. Na sequência são apresentadas evidências do uso de bebidas achocolatadas, assim como possibilidades de inovação e desenvolvimento de novos produtos para uso como estratégia nutricional no esporte e atividade física. Com essa fundamentação, procurou-se o

estabelecimento de uma bebida achocolatada experimental com formulação particular para jogadores de futebol.

## **2.1. Respostas fisiológicas e motoras do futebol**

O futebol, fisiologicamente, pode ser considerado um desporto com atividades intermitentes em alta intensidade (80-90% da frequência cardíaca máxima individual -  $FC_{máx}$  (DELLAL *et al.*, 2012; STØLEN *et al.*, 2005), caracterizadas por corridas rápidas de curta duração, saltos, cabeceios e disputas de bola, que são intercaladas com momentos de caminhadas e até mesmo na posição parada, onde os atletas, nos critérios de pesquisa, apenas se sustentam de pé no campo de jogo (BANGSBO *et al.*, 1991; MOHR *et al.*, 2003; STRØYER *et al.*, 2004).

Cada jogador percorre uma distância de 10-12 km (CARLING *et al.*, 2012; DELLAL *et al.*, 2011) e executam de 1.200 a 1.600 ações envolvendo disputas de bola, saltos, mudança de direção e *sprints* (BANGSBO *et al.*, 1991; RIENZI *et al.*, 2000). No entanto, a maioria das ações é de baixa a moderada intensidade, o que confere ao futebol uma característica aeróbia, sendo esperado que do total de energia despendida, aproximadamente 90% provenha de fontes aeróbias (BANGSBO, 1994).

A estimativa de gasto energético de uma partida está entre 1100 a 1500 kcal (COELHO *et al.*, 2010; EKBLUM, 1986; OSGNACH *et al.*, 2010; STØLEN *et al.*, 2005), variações estas (~15%) devidas ao custo de acelerações e desacelerações quando se considera uma mesma distância percorrida de forma contínua e regular (OSGNACH *et al.*, 2010). Em média, 18 % da distância total percorrida é executada em movimentos de aceleração ou desaceleração a uma taxa maior do que  $1 \text{ ms}^{-2}$ . Além disso, 7,5 %, 4,3 % e 3,3 % da distância total é coberta a  $1-2 \text{ m.s}^{-2}$ ,  $2-3 \text{ m.s}^{-2}$  e  $> 3 \text{ m.s}^{-2}$ , respectivamente (AKENHEAD *et al.*, 2013).

Durante o jogo são executadas de 150 a 250 ações (~15% do total) de forma intensa (MOHR *et al.*, 2003), ocorrendo uma corrida de alta intensidade ( $>19,8 \text{ km}^{-1}$ ) a cada 72 s (BRADLEY *et al.*, 2009). A maioria das ações (~67%) de altas intensidades consecutivas ( $>19,8 \text{ km}^{-1}$ ) é intercalada por recuperação com intervalo superior a 61

s, enquanto que nos jogadores meio-campistas são mais frequentemente observadas sequências de ações realizadas após um tempo de recuperação muito curto (20 s) (BRADLEY *et al.*, 2009; CARLING *et al.*, 2012). Portanto, essa posição de jogo é a que passa o maior tempo se movendo em intensidades mais elevadas em comparação com as outras posições, o que impacta no tempo que seria dedicado à recuperação imediata para regeneração do ATP (CARLING *et al.*, 2012). O menor e o mais alto número de ações de jogo, que requerem mudanças bruscas na direção e aceleração, são realizados por zagueiros e por jogadores do meio-campo, respectivamente (NEDELEC *et al.*, 2013).

Esse comportamento de intermitência entre ações de baixa a alta intensidade são suficientes para provocar acúmulo de lactato sanguíneo de 3 a 8 mmol/L ao final dos dois períodos de jogos oficiais de jogadores de diversos níveis e categorias (ANANIAS *et al.*, 1998; BANGSBO *et al.*, 1991; CAPRANICA *et al.*, 2001; EKBLÖM, 1986; FLORIDA-JAMES *et al.*, 1995; KRUSTRUP *et al.*, 2006; MOHR *et al.*, 2003), sem considerar que esses valores podem estar subestimados por já terem difundido para todo o corpo e estar sofrendo o processo de remoção no momento da coleta (BANGSBO, 1994; ROHDE *et al.*, 1988).

## **2.2. Substratos energéticos no futebol**

O futebol tende a ter uma natureza de produção de energia predominante por metabolismo aeróbio (STØLEN *et al.*, 2005). A longa duração das partidas e o *turnover* pronunciado de energia anaeróbia durante períodos mais intensos do jogo estão associados com o consumo de grandes quantidades de substratos (BANGSBO, 1994; MOHR *et al.*, 2005).

Durante o exercício extenuante, os carboidratos e gorduras são substratos relevantes para o metabolismo oxidativo no músculo, embora fatores como dieta, condicionamento físico e condições ambientais também possam influenciar no metabolismo de substrato energético para a realização de exercício (REILLY *et al.*, 2008). Além disso, existem grandes diferenças interindividuais na produção de energia aeróbia e anaeróbia durante um jogo em virtude de uma variedade de fatores que influenciam a intensidade do exercício, como a motivação, a capacidade

física, as estratégias, a posição desempenhada no time e as táticas (BANGSBO *et al.*, 1991; BANGSBO, 1994).

Os estoques de fosfocreatina nas células musculares do tipo II fornecem a maior parte da energia necessária para exercícios de curta duração e também quando há mudanças na intensidade do exercício que está sendo realizado (BANGSBO, 1994). Conseqüentemente, quando esses exercícios são realizados com um pequeno intervalo de tempo entre eles, os estoques de fosfocreatina serão depletados e não haverá energia necessária para os exercícios seguintes (MOHR *et al.*, 2005).

A síntese de fosfocreatina depende da disponibilidade de oxigênio durante a recuperação (BANGSBO, 1994). Por isso, é lógico supor que indivíduos com maior capacidade de consumo de oxigênio terão maior capacidade de fornecimento de oxigênio para os músculos que estão se exercitando e, assim, terão maior fosforilação dos estoques de fosfocreatina durante o período de recuperação do exercício (MOHR *et al.*, 2005).

Há grande utilização de glicogênio muscular durante o jogo, mas nem sempre são totalmente depletados, indicando que síntese de glicogênio pode ocorrer durante períodos de descanso e de atividades de baixa intensidade (BANGSBO *et al.*, 1992). O fígado libera glicose suficiente para sustentar a demanda de glicose sanguínea durante um jogo, e por isso os estoques de glicogênio, tanto muscular quanto hepático, são importantes para o desempenho no futebol, em especial no segundo tempo de jogo (EKBLÖM, 1986).

O principal substrato lipídico para as demandas energéticas do futebol são os ácidos graxos livres, mobilizados das reservas do tecido adiposo, e os triglicerídeos dos músculos, com menor contribuição dos triglicerídeos plasmáticos (BANGSBO, 1994). A utilização e a mobilização de ácidos graxos livres são maiores durante exercícios de baixa a moderada intensidade. Quando o exercício é prolongado, a lipólise é estimulada, mas durante os primeiros estágios do exercício, os ácidos graxos livres plasmáticos, ainda estarão com disponibilidade limitada para serem metabolizados havendo compensação por metabolismo de CHO (EKBLÖM, 1986). Os corpos cetônicos funcionam como fonte de lipídio, mas isso parece ter menor importância durante o futebol (BANGSBO *et al.*, 1992).

O papel da proteína para o metabolismo energético durante o jogo de futebol ainda não está claro (COLOMBINI *et al.*, 2014; LEMON, 1994; STØLEN *et al.*, 2005). Evidências demonstraram que a oxidação de proteínas pode contribuir com menos de 10% da produção total de energia, parecendo que no futebol os aminoácidos servem como fonte auxiliar de combustível (EKBLÖM, 1986).

### **2.3. Fadiga e distúrbio metabólico decorrentes do futebol**

Toda a característica do futebol faz com que o desempenho do jogador já se deteriore no prolongar da partida, sendo observadas reduções importantes de desempenho no segundo tempo de jogo, como por exemplo, deslocando-se por distâncias menores (5 a 10%) (ANANIAS *et al.*, 1998; BANGSBO *et al.*, 1991; BARROS *et al.*, 2007; MOHR *et al.*, 2003; RIENZI *et al.*, 2000), sobretudo nas atividades de média, classificadas entre 11,1 a 19,0 km/h (DI SALVO *et al.*, 2007) e alta intensidade, 18,0 a 30,0 km/h (MOHR *et al.*, 2003). Essas atividades dependem de fontes de glicogênio e por isso há liberação de hormônios hiperglicemiantes, como os modulados pelo Sistema Nervoso Autônomo (i.e cortisol, MALM *et al.*, 2004; THORPE *et al.*, 2012 e as catecolaminas, SCHULPIS *et al.*, 2009), estando significativamente aumentado aos finais dos jogos como tentativa de regulação do metabolismo de GOR e CHO.

Um aspecto interessante quanto à fadiga é que os jogadores de futebol podem experimentar redução de desempenho de *sprint* (~2,4%) ao início do segundo tempo e temporariamente ao longo do jogo como consequência subsequente a momentos de alta solicitação de esforço (MOHR *et al.*, 2003). Reduções tempo-dependentes em distâncias percorridas sugerem que a capacidade de aceleração e desaceleração estão agudamente comprometidas durante o jogo (AKENHEAD *et al.*, 2013). Possibilidades explicativas para essa redução foram levantadas como a redução de temperatura muscular no intervalo (MOHR *et al.*, 2004) e a fadiga temporária por mecanismos iônicos (elevações de H<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e o impacto no metabolismo intersticial e os consequentes distúrbios elétricos na célula) (KRÜSTRUP *et al.*, 2006) que acarretariam prejuízos na maquinaria contrátil.

Hipóteses relacionadas à elevação de temperatura corporal e fadiga do Sistema Nervoso Central (SNC) têm sido postuladas e também poderia ser um importante fator interveniente no desempenho de jogadores de futebol onde processos cognitivos e decisórios assumem o comportamento tático. Essa possibilidade parece pertinente quando se observa que a temperatura corporal média de jogadores de futebol está entre 39-39,5°C (MAUGHAN *et al.*, 2010; OZGÜNEN *et al.*, 2010). No entanto, há relatos na literatura de que valores individuais ultrapassando 40°C (MAUGHAN *et al.*, 2010) se fazem presentes, o que causaria menor atividade eletroencefalográfica e menor velocidade do fluxo sanguíneo cerebral, que poderia provocar fadiga central (NYBO *et al.*, 2004).

Desta forma, estas descobertas sugerem que os estados prolongados de redução da ingestão de água, como ocorre durante o jogo de futebol, poderiam afetar negativamente as funções executivas, como planejamento e processamento visoespacial (KEMPTON *et al.*, 2011). Achados desse estudo anteriormente citado (KEMPTON *et al.*, 2011), que usou ressonância magnética funcional (fMRI), sugerem que o aumento da fadiga foi superado por um aumento na ativação cerebral fronto-parietal, o que pode ser percebida pelos participantes como um esforço maior. Portanto, este padrão indica que os participantes exercem um nível mais elevado de atividade neuronal, a fim de alcançar o mesmo nível de desempenho.

Exemplos da necessidade termorregulatória no futebol fica demonstrada nas perturbações de homeostase hídrica que ocorrem de forma expressiva com reduções de 7-12% no plasma sanguíneo (EDWARDS *et al.*, 2006), de 1-4 L de líquidos corporais (KRUSTRUP *et al.*, 2006; KRUSTRUP *et al.*, 2011) e, conseqüentemente, por perda de 1,5-4% no massa corporal (BANGSBO, 1994; EDWARDS *et al.*, 2006; KRUSTRUP *et al.*, 2006; KRUSTRUP *et al.*, 2011; MOHR *et al.*, 2004) são notadas após o jogo. Assim, jogadores de futebol estão submetidos a uma série de demandas que os predispõe a fadiga durante e após os jogos, podendo ser causada por diferentes fenômenos fisiológicos e dependentes da posição de jogo, do número de *sprints* e mudanças bruscas na direção realizada durante a partida (NEDELEC *et al.*, 2013). Do ponto de vista cognitivo são também

esperados prejuízos no desempenho relacionado à tomada de decisão, aumento da percepção de esforço e conseqüentemente, implicações no jogo tático.

Quantificação de performance durante a fase de recuperação tem mencionado que até 72 h ainda há prejuízos no desempenho de salto contra movimento (CMJ), na força isométrica dos músculos isquiotibiais e no pico de velocidade de *sprint* de forma significativa, além de percepção subjetiva acentuada de dor muscular (NEDELEC *et al.*, 2013; NÉDÉLEC *et al.*, 2012). Estudos de caráter longitudinal são necessários para maior entendimento. Para o nosso saber, apenas o estudo de Rollo *et al.* (2014), estudando jogadores universitários ingleses, apresentou evidências de que a capacidade dos jogadores foi prejudicada para “sprintar” (10-20m; +5%), saltar (CMJ; -19%) e executar exercício intenso repetido (YYIRT; -11%) quando se joga duas partidas competitivas por semana num intervalo de seis semanas.

A identificação da divergência entre as de cargas externas (demandas de jogo) e internas (assimilação do estresse pelo organismo) pode ajudar na identificação de fontes de fadiga e assim na diferenciação entre um atleta recuperado e um atleta cansado. Uma abordagem atual, didaticamente considerada para entendimento do fenômeno da fadiga, é a proposta de que há mecanismos centrais e periféricos (i.e fadiga central e periférica) (BOYAS *et al.*, 2011; GANDEVIA, 2001), designando, respectivamente, (i) por uma diminuição na ativação voluntária do músculo (por exemplo, uma redução no número e nas taxas de descarga das unidades motoras recrutadas; *out put* cortical motor abaixo do ideal [fadiga supra-espinhal] e/ou entradas aferentes alteradas [fadiga espinhal]) (GANDEVIA, 2001) e (ii) por uma diminuição da força contrátil das fibras musculares e modificações dos mecanismos subjacentes à transmissão dos potenciais de ação na maquinaria de contração do músculo (BOYAS *et al.*, 2011).

Do ponto de vista prático, a fadiga envolve mudanças na força máxima, máxima velocidade de contração, e a curvatura da relação força-velocidade com diferentes mecanismos subjacentes, que seja no processamento ou disparo do potencial de ação, nos íons extracelulares e intracelulares, ou nos muitos metabólitos intracelulares que intermediam o processo de contração (ALLEN *et al.*, 2008).

Entre as teorias mais aceitas para explicação do mecanismo central da fadiga é que o exercício prolongado aumente a atividade serotoninérgica no cérebro, ocasionando assim, uma limitação do SNC para um recrutamento ampliado de unidades motoras, prejudicando a geração de força muscular (BOYAS *et al.*, 2011). Além da limitação de geração de força com o prolongar do jogo, outro efeito da serotonina hipotetizado é que ela poderia ocasionar impactos táticos nos jogadores em função de modificações de aspectos cognitivos relacionados à seleção de respostas e tomada de decisão, pois efeitos da serotonina têm sido relacionados com letargia e perda de motivação (MEEUSEN *et al.*, 2006). Elos sugestivos de tais efeitos podem também apontar para ligações com a teoria de que redução aguda na concentração de glicose no sangue, como as esperadas a partir do final do primeiro tempo de jogo, pode estar associada com alteração do estado de humor e disfunção cognitiva (DONOHOE *et al.*, 2000).

Entre as diversas hipóteses periféricas da fadiga ligadas a reciclagem do ATP pode ser citada, em um primeiro momento, a diminuição de *pH* intramuscular e a acumulação de fosfato inorgânico, produtos do trabalho intermitente e em alta intensidade realizado pelos músculos esqueléticos dos membros inferiores via estoques de creatina fosfato e o recrutamento de glicólise para garantir a síntese de energia (MOHR *et al.*, 2005). Assim, as caracterizações de altas intensidades e as longas durações da partida levam a uma grande solicitação das fontes de glicogênio (hepático e muscular), para geração de energia, sendo, portanto, fontes cruciais para o desempenho no futebol.

Outro sugestivo elo explicativo entre depleção de glicogênio compartimentada e fadiga muscular, dentro da teoria de hipóteses periféricas, pode ser levantado ao notar que a baixa quantidade de glicogênio intramiofibrilar prejudicou a taxa de liberação de  $Ca^{2+}$  de vesículas isoladas do retículo sarcoplasmático em humanos (ØRTENBLAD *et al.*, 2011), prejudicando assim a contração muscular. O glicogênio também poderia desempenhar um papel na fadiga central, porque a ativação do cérebro tem estado associada com uma queda no glicogênio cerebral após exercício prolongado (MATSUI *et al.*, 2011; SECHER *et al.*, 2008). Essa conjuntura de prejuízos por ordens centrais e periféricas, e maior uso da perna dominante por realizarem uma maior frequência de ações técnicas, pode explicar, em parte, porque



ela tem um maior número significantes de lesões (50% *versus* 37%) (HAWKINS *et al.*, 2001) e porque elas se recuperam mais lentamente no pós-jogo (NEDELEC *et al.*, 2013).

Dada a importância do glicogênio como fonte de energia no futebol, alguns estudos tem averiguado a depleção de glicogênio muscular em jogadores pela técnica de biopsia com análise enzimática (BANGSBO *et al.*, 1992; JACOBS *et al.*, 1982), espectrofotômetro (KRUSTRUP *et al.*, 2011) ou por microscopia eletrônica de transmissão (GUNNARSSON *et al.*, 2013; KRUSTRUP *et al.*, 2006) indicando que ao final das partidas uma depleção de 30 a 70% dos estoques desse substrato energético. Observações em jogadores dinamarqueses de primeira e segunda divisão demonstraram que essa depleção ocorreu sem diferenciação estatística nas fibras de tipo I e II (GUNNARSSON *et al.*, 2013; KRUSTRUP *et al.*, 2006), refletindo assim que ambas são solicitadas. Rico-Sanz *et al.* (1999), utilizando espectroscopia de ressonância magnética ( $^{13}\text{C}$  NRM) observaram que em média a quantidade de glicogênio muscular de jogadores de elite da Suíça era de  $135 \pm 53$  mmol/kg antes e na ordem de  $87 \pm 27$  mmol/kg depois de um protocolo de 42 min, simulando as demandas intermitentes do futebol, correspondente, desse modo, a metade de uma partida oficial.

Portanto, reposição rápida dos estoques de glicogênio muscular é requerida em atletas de futebol para sustentar as rotinas de treinamentos e competições, e em particular para essa última, por esse substrato ser fonte de energia importante para alto rendimento permitindo sustentar a execução de repetidas ações intensas durante o jogo. Como demonstrado por Ekblom (1986), jogadores suecos com menores níveis de glicogênio muscular tiveram um ritmo mais lento e cobriram menores distâncias de deslocamentos na segunda metade da partida.

#### **2.4. O futebol como exercício indutor de dano e dor muscular**

Uma característica marcante em jogos de futebol é a troca de ações e movimentos que ocorrem a cada 4-5 s (BANGSBO *et al.*, 1991; RIENZI *et al.*, 2000) exigindo, especialmente, o regime excêntrico de contração muscular, já que as atividades motoras durante a partida são interrompidas abruptamente e reiniciadas diversas

vezes de maneira aleatória (MOUGIOS, 2007; STØLEN *et al.*, 2005). Essas repetitivas e intensas contrações musculares excêntricas, geradas durante a partida (ex., no quadríceps com desacelerações e no ciclo alongamento-encurtamento de saltos; nos isquiotibiais como desaceleração da tíbia e estabilização do joelho em chutes, além de contatos físicos (SINGH *et al.*, 2011) e com bola), são potencialmente reconhecidas e protocoladas em experimentos como “exercício indutor de dano muscular” (EIDM) (MCCULLY *et al.*, 1986; TEE *et al.*, 2007), repercutida clinicamente por dor muscular percebida subjetivamente que perdura por vários dias pós-exercício (CHEUNG *et al.*, 2003).

Percepções subjetivas de dor geralmente acontece com início tardio e por isso chamadas de “dor muscular de início tardio” (em inglês: *delayed-onset muscle soreness* [DOMS]), podendo continuar elevada desde momentos imediatamente pós-jogo, atingindo um pico por volta de 48 h e somente retornando aos níveis basais 96 h após o jogo, mesmo em jogadores de elite (FATOUROS *et al.*, 2010; ISPIRLIDIS *et al.*, 2008). Durante esse período, amplitude articular de movimento do joelho, medido por índice do edema muscular, diminuiu às 24 h após o jogo, atingindo o seu valor mais baixo às 48 h, retornando aos valores de *baseline* fisiológicos às 96 h (ISPIRLIDIS *et al.*, 2008).

O regime de contração excêntrica é a hipótese mais aceita como provocadora de danos musculares mais graves acarretando em percepção mais intensa de dor e diminuição da amplitude articular. Isso pode ser entendido por ela recrutar um número menor de unidades motoras, o que faz com que o número de pontes cruzadas efetivadas diminua e o comprimento da fibra aumente, proporcionando assim um aumento de força por unidade de ponte cruzada (MCCULLY *et al.*, 1986).

Efeitos mais severos das contrações excêntricas podem ser notados ainda durante o jogo, e principalmente ao final dele, onde o desempenho em atividades mais intensas fica significativamente prejudicado (NÉDÉLEC *et al.*, 2012). É por isso que o pico de DOMS, após EIDM com característica bem marcada por ações excêntricas como no futebol, acontece entre 24-48 h, permanece elevada por até mais de uma semana (ISPIRLIDIS *et al.*, 2008; TEE *et al.*, 2007). Danos musculares em regimes concêntricos também ocorrem, mas ainda não são tão bem esclarecidos na literatura (TEE *et al.*, 2007).

Um possível processo somático para dano muscular, acima explicado para as ações excêntricas (processo mecânico), pode ser chamado de processo metabólico, que se inicia com a deficiência do processo de síntese de ATP por isquemia, ocasionando depleção severa de glicogênio e ação diminuída do *Ca<sup>2+</sup>adenosina trifosfatase* (ATPase) no retículo sarcoplasmático ou sarcolema (TEE *et al.*, 2007). Isto compromete a remoção de  $Ca^{2+}$ , causando a elevação citosólica de  $[Ca^{2+}]$  e resultando numa cascata de eventos metabólicos que conduzem à degeneração da maquinaria contrátil muscular (FRIDÉN *et al.*, 2001; MCCULLY *et al.*, 1986). Por não existir dano muscular mais importante, como ocorre por meios mecânicos, é esperado para esse processo metabólico, que o pico de DOMS acontecesse em até 24 h e com persistência em até sete dias, portanto de maneira mais branda em relação a protocolos de EIDM por via excêntrica (TEE *et al.*, 2007).

O período de recuperação mais longo após EIDM (i.e ainda não sabido pelas diversas gravidades, mas verificado por acontecer não completamente após 12 semanas depois de uma maratona (WARHOL *et al.*, 1985), se justifica pelos diversos mecanismos de reparação tecidual que ocorrem. Nesse sentido, os danos musculares induzidos por exercícios, assumindo que no futebol se tem tanto a vertente mecânica como metabólica de EIDM, estão relacionados com o aumento de danos estruturais (miofibrilas, citoesqueletos), de processamento de energia (mitocôndria e retículo sarcoplasmático), a resposta inflamatória aguda caracterizada por infiltração de fagócitos no músculo, a aumento de radicais livres, de produção de citocinas e alterações hormonais (ANDERSSON *et al.*, 2008; BANFI *et al.*, 2012; GLEESON *et al.*, 1995; ISPIRLIDIS *et al.*, 2008).

Entre os efeitos de compensações metabólicas mais notáveis após EIDM estão os aumentos da FC, concentração de lactato no sangue venoso e cortisol plasmático para mesma taxa de trabalho relativa a outros trabalhos que não exacerbaram regimes de solicitação com contração excêntrica (GLEESON *et al.*, 1995). Outra modificação após EIDM é a sensibilidade reduzida a insulina, que prejudica a síntese de glicogênio muscular (AOI *et al.*, 2013; KIRWAN *et al.*, 2003; TEE *et al.*, 2007), fonte energética muito importante para esportes intermitentes e de longa duração como o futebol como já apontado anteriormente e que pode retardar o processo recuperativo.

Mais detalhadamente, os danos musculares exercitados excentricamente são verificados por exames de biópsias com microscopia eletrônica, mostrando que a microlesão é grave o suficiente para alterar a arquitetura celular, afetando as membranas e seus canais iônicos, e também o fornecimento de energia (FRIDÉN *et al.*, 1981). Em corredores de maratonas foram notadas dissolução das cristas e perdas da matriz mitocôndrial (WARHOL *et al.*, 1985). Assim, ao perceber tais situações, o organismo ativa proteases que levam à destruição de miofibrilas e digestão lisossomal de conteúdo dessas fibras musculares (ARMSTRONG *et al.*, 1991; WARREN *et al.*, 2002).

Outra constatação é que a membrana também pode ter sido destruída ou estar com alteração de permeabilidade, causando como consequência, mais tarde, uma fuga dessas miofibrilas para o sistema linfático até chegar à corrente sanguínea, ocasionando aumento séricos de proteínas musculares (rabdomiólise), incluindo creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), alfa-actinas (ACTN's) e mioglobina (Mb) (WARREN *et al.*, 2002). Portanto, essas proteínas podem ser identificadas e quantificadas através do soro sanguíneo, auxiliando no diagnóstico de danos musculares pós-exercício.

Recentemente, observações em jogadores semi-profissionais de futebol confirmaram correlação positiva ( $n=7$ ;  $r=0.80$ ,  $p=0.029$ ) entre número de *sprints* e alterações na CK (THORPE *et al.*, 2012). Outros estudos em jogadores de futebol observaram valores individuais dessa enzima pós-jogo oficial (24, 48 e 72 h) variando de 500 a 1200 U/L (ASCENSAO *et al.*, 2011; ASCENSÃO *et al.*, 2008; COELHO *et al.*, 2011; FATOUROS *et al.*, 2010; KRUSTRUP *et al.*, 2011; LAZARIM *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013). Aumentos nos níveis de CK nas primeiras 24-48 h podem refletir um aumento na permeabilidade sarcolemal (WARREN *et al.*, 2002), e elevações superiores a quatro dias podem estar ligados à necrose miofibrilar (TURNER *et al.*, 2012), observadas inclusive em seres humanos (JONES *et al.*, 1986). Como ponto de corte para tal fenômeno da necrose miofibrilar, parece que aumento dos níveis de CK (isto é, aproximadamente acima de 10.000 U/L) circulante precede a fase final deste processo, que não é histologicamente aparente até vários dias após o exercício (JONES *et al.*, 1986).

Existe uma faixa de liberação de CK pós exercício entre 300-500 U/L e a sua liberação é modulara individualmente apresentando pico em 24 h (BRANCACCIO *et al.*, 2007). Os sujeitos podem ser classificados como altamente responsivos e ou baixo responsivos (BRANCACCIO *et al.*, 2007). No futebol, o monitoramento de 128 jogadores ao longo de uma temporada de futebol revelaram valores de repouso médios de  $493 \pm 315$  U/L entre os jogadores (LAZARIM *et al.*, 2009). Neste mesmo estudo, os jogadores que apresentassem valores de CK de aproximadamente 950 U/L antes de treinamentos eram aconselhados a não fazerem parte dos treinamentos daquele dia.

Apesar de sua alta variabilidade intraindividual, tem-se tentado determinar valores de referência de CK para o monitoramento de modalidades esportivas em geral, como no caso do futebol (MOUGIOS, 2007) tendo-se determinado concentrações pico de CK de  $786 \pm 96$  U/L entre 12-24 h pós jogo e crônicas em períodos de treinamento de cerca de 350 U/L (COELHO *et al.*, 2011).

Para a Mb foram notados valores individuais entre 190 a 350  $\mu\text{g/L}$  (ASCENSÃO *et al.*, 2008; KRUSTRUP *et al.*, 2011), valores esses que podem estar aumentados por seis vezes como observado em jogadores de alto nível da Dinamarca (KRUSTRUP *et al.*, 2011) ou por  $238 \pm 79\%$  em jogadores semiprofissionais ingleses (THORPE *et al.*, 2012) em relação ao *baseline*. Já para a LDH forma observados valores individuais entre 375 U/L a 475 U/L para jogadores de elite gregos (ISPIRLIDIS *et al.*, 2008) e jogadoras de elite e sub-elite da Espanha (GRAVINA *et al.*, 2011). Normalização de valores de CK, LDH e Mb são restabelecidos, na maioria das vezes, entre 24 a 48 h para as duas primeiras e em até 24 h para a última. Concentrações de CK geralmente atingem um pico entre 24 a 48 h pós-exercício e precedem o maior índice de dor subjetiva (BANFI *et al.*, 2012; BRANCACCIO *et al.*, 2006).

Para fechar diagnóstico e graduar a constatação de dano muscular de maneira indireta, alguns meios auxiliares aos marcadores sanguíneos e imagens (ressonância magnética ou por modo B-ultra-som (FOLEY *et al.*, 1999; NOSAKA *et al.*, 1996) e por calor infravermelho-termografia (AL-NAKHLI *et al.*, 2012; HILDEBRANDT *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2005) devem ser utilizados com os *scores* obtidos pelas sensações subjetivas de inchaço, dor muscular sensível à palpação ou

movimento, ambas relatadas por escalas subjetivas de dor como, por exemplo, a *visual analogue scale* (VAS)(AL-NAKHLI *et al.*, 2012; CHEUNG *et al.*, 2003). Isso também deve ser considerado para a CK sérica, um marcador comumente utilizado no dia a dia dos clubes de futebol, que precisa de acompanhamento de outros parâmetros, já que se tem argumentado que a mesma pode se tornar um marcador com limitações de lesão muscular, devido à alta variabilidade intraindividual, bem como a natureza dinâmica de sua liberação, *clearance* e pouca relação com torque muscular após EIDM (FRIDÉN *et al.*, 2001).

## **2.5. O futebol e imunocompetência**

Muitos estudos têm mostrado que vários aspectos da função imunológica são suprimidos temporariamente após o exercício extenuante como o futebol (REBELO *et al.*, 1998; SUREDA *et al.*, 2009; THORPE *et al.*, 2012). Este efeito pode ser mediado através das ações dos hormônios ao stress, particularmente glicocorticoides e catecolaminas (WALSH *et al.*, 2011) que se apresentam durante o jogo para desempenhar papéis hiperglicemiantes, mas que causam um grande desafio ao organismo do ponto de vista recuperativo da homeostase através dos processos inflamatórios disparados pelo jogo.

No intervalo temporal após EIDM, alguns processos de reparação do músculo esquelético acontecem e podem ser categorizados em três partes: (i) necrose, (ii) fagocitose e reparação, e por último em (iii) remodelação e restauração da função do músculo (TURNER *et al.*, 2012). Na forma aguda, a inflamação local (1-6 h) é iniciada por um rápido extravasamento de fluído e neutrófilo granulócito enviado pelo sangue ao tecido danificado, sendo os neutrófilos as primeiras células imunes a serem recrutadas para o local da lesão, atingindo o pico entre aproximadamente 48 h, seguido por acumulação de monócitos/macrófagos que atingem seus picos após vários dias (WALSH *et al.*, 2011). Sequencialmente, duas populações de macrófagos (M1 e M2) invadem o músculo lesionado, e a sua passagem é importante para o processo de remoção fagocítica e são vitais para a diferenciação de mioblastos e regeneração, respectivamente (TIDBALL *et al.*, 2010). Por essa complexidade de mecanismos, e dependendo do tipo e da gravidade da lesão, a

regeneração completa do músculo é esperada por ocorrer entre de 7-21 dias pós-lesão (TURNER *et al.*, 2012).

Atividades competitivas repetidas com recuperação insuficiente como ocorre no futebol, principalmente durante períodos mais intensos de treinamento e competição, parecem agravar a capacidade de recuperação dos atletas por ocasionar depressão crônica de vários aspectos da função imunológica (MALM *et al.*, 2004; REBELO *et al.*, 1998; WALSH *et al.*, 2011). Assim, devido à importância do entendimento de processos inflamatórios no processo de dor e reparação/remodelação tecidual, alguns estudos avaliaram as respostas de citocinas após jogos (ASCENSÃO *et al.*, 2008; BISHOP *et al.*, 2002; ISPIRLIDIS *et al.*, 2008; PIMENTA *et al.*, 2012) mostrando aumentos na contagem de leucócitos, nos níveis de interleucina (IL-6) (SOUGLIS *et al.*, 2015) e no fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (SOUGLIS *et al.*, 2015).

Portanto, toda a cascata imune se altera após exercício, com ênfase pró ou antiinflamatória de acordo com a gravidade da lesão. Prejuízos imediatos na maquinaria contrátil celular são notados, sendo observada uma correlação positiva entre o acúmulo de leucócitos radioativos e fraqueza muscular nos primeiro três dias após o exercício, e entre acúmulo de células CD16<sup>+</sup> e redução da capacidade de geração de força muscular quatro dias após o mesmo exercício (PAULSEN *et al.*, 2010).

A IL-6 é a primeira citocina a estar aumentada de forma exponencial (até 100 vezes) no sangue em resposta ao exercício e diminuindo durante o período pós-exercício estando relacionado à intensidade, duração, capacidade aeróbica e quantidade de massa muscular envolvida (PEDERSEN, 2007; PETERSEN *et al.*, 2005; PETERSEN *et al.*, 2006). A IL-6 é produzida por fibras musculares através de uma via independente de TNF- $\alpha$  (PETERSEN *et al.*, 2005) e entre os seus papéis estão o estímulo ao aparecimento na circulação de outros agentes anti-inflamatório, tais como IL-1ra, IL-10 e sTNF-R e inibição da produção da citocina pro-inflamatória TNF- $\alpha$  (OSTROWSKI *et al.*, 1999; PETERSEN *et al.*, 2005).

Além disso, há papéis relacionados ao aumento da produção de neutrófilos pela medula óssea como medida de defesa fagocítica e esse aumento podem estar

ligados à depleção de glicogênio no músculo de trabalho (aumenta ainda mais a IL-6 mRNA e taxa de transcrição de IL-6) (KELLER *et al.*, 2005; STEENBERG *et al.*, 2001), representando assim uma sinalização para falta de energia e uma necessidade de aumentar a mobilização de substrato a partir de outros tecidos (WALSH *et al.*, 2011). Dessa forma, a IL-6 estimula a lipólise bem como a oxidação das gorduras (PETERSEN *et al.*, 2005). Ela pode ainda sinalizar para maior participação do catabolismo proteico como compensação energética durante o exercício, que é algo totalmente indesejado em atletas, principalmente na perspectiva de longo prazo por poder gerar perda de massa magra. Outras cascatas relacionadas às mudanças na homeostase do cálcio e aumento da formação de espécies reativas de oxigênio podem ativar fatores de transcrição que regulam a síntese de IL-6 (PEDERSEN *et al.*, 2008).

Ascensão *et al.* (2008) observaram que a contagem de neutrófilos no sangue estava aumentada em 30 min pós-jogo, enquanto que os linfócitos diminuídos, voltando a linha de base de 24 a 72 h. Fatouros *et al.* (2010) observaram leucocitose imediatamente ao jogo e durante as primeiras 24 h de recuperação em jogadores de elite gregos. Após treinamento de turno único de futebol, a uma intensidade de 75% da  $FC_{máx}$ , foi também notado leucocitose causada principalmente por neutrofilia em jogadoras de elite e amadoras de futebol (AVLONITI *et al.*, 2007). Portanto, leucocitose é um evento esperado após jogo de futebol.

Pela perspectiva crônica, foi relatada ao longo de uma temporada uma depressão progressiva da função dos neutrófilos em jogadores profissionais de futebol da primeira divisão belga (BURY *et al.*, 1998). Outro estudo de caráter longitudinal notou diminuição gradual da função imune de neutrófilos durante temporada de 10 meses em jogadores profissionais japoneses (SUDA *et al.*, 2013), que abre possibilidades hipotéticas para o entendimento de que atletas podem conviver com imunocompetência diminuída por longo prazo.

Outras respostas imunitárias pós-jogo também podem caracterizar incapacidade de ativação eficaz desse sistema, como por exemplo, o quadro verificado após cinco dias de treinamentos consecutivos em jovens jogadores de futebol que diminuiu o número de células *T* e *B* afetando a sua capacidade de ativar o sistema imunitário para resistir às infecções (MALM *et al.*, 2004). O aumento do número total de



leucócitos circulantes também tem sido relatado imediatamente após partida em jogadores do sexo masculino (ASCENSÃO *et al.*, 2008; ISPIRLIDIS *et al.*, 2008; MALM *et al.*, 2004) e feminino (ANDERSSON *et al.*, 2010; TSUBAKIHARA *et al.*, 2013), normalizando em até 21 h após o jogo, o que caracteriza um combate agudo dessas células visando à eliminação de microrganismos e estruturas químicas estranhas ao organismo por meio de sua captura ou da produção de anticorpos, sejam eles patogênicos ou não.

As alterações nesses marcadores da função imunológica prestam apoio para a teoria da "janela aberta", segundo a qual se acredita que os indivíduos são mais suscetíveis do que o normal ao risco de infecções por volta de até 6 h após exercício extenuante (KAKANIS *et al.*, 2010; PEDERSEN *et al.*, 1996). Mortatti *et al.* (2012), estudando jogadores sub-19 brasileiros, observaram que os mesmos estiveram mais suscetíveis a infecções do trato respiratório superior (ITRS) após alguns jogos ocorridos num intervalo de 20 dias. Segundo esses pesquisadores (MORTATTI *et al.*, 2012), valores reduzidos nos níveis de imunoglobulina salivar A (s-IgA) diminuiu a imunidade da mucosa, podendo assim ter conduzido a uma maior incidência de ITRS.

Por causar imunossupressão, tem sido especulado que exercícios intensos e de média a longa duração reduzam a resistência à infecção, pois a s-IgA atua inibindo a aderência bacteriana, neutralizando vírus e toxinas, e prevenindo a absorção de antígenos pela superfície mucosal (BISHOP *et al.*, 2009). Papéis similares como a s-IgA, cooperando com as defesas inatas das mucosas, podem ser listados para a alfa-amilase (ptialina), lactoferrina e lisozima, que em conjunto fornecem a "primeira linha de defesa" contra patógenos e antígenos apresentados em superfícies mucosais (BISHOP *et al.*, 2009).

A longa duração do jogo oficial de futebol e sua alta intensidade tem o potencial para estimular a liberação de cortisol (SABBADINI *et al.*, 1995) e ativação do sistema nervoso simpático (SNS), com conseqüente vasoconstrição de vasos sanguíneos que circundam as glândulas salivares (CHICHARRO *et al.*, 1998), o que impacta numa menor concentração de s-IgA após o jogo. Essa maior possibilidade de ITRS, sugerida pela diminuição da s-IgA, pode ser postulada, já que valores diminuídos têm sido observados para jogadores de futebol adulto (MOREIRA *et al.*, 2009) e de

futsal (MOREIRA *et al.*, 2011) após jogos oficiais, e para jogadores adultos profissionais após 70 min em jogo amistoso (MOREIRA *et al.*, 2009), após treinamento de alta intensidade, quando comparado com treinamento de baixa intensidade (OWEN *et al.*, 2014) ou para jogadoras japonesas após um jogo oficial de jogadores de nível universitário (TSUBAKIHARA *et al.*, 2013). Conforme relatado na literatura, é necessário um período de normalmente 24 h para a cinética de recuperação de s-IgA para promover um retorno aos valores basais após a diminuição transitória identificada após o exercício de alta intensidade (NEVILLE *et al.*, 2008).

Portanto, susceptibilidade a ITRS parece ser um problema a resolver no contexto do futebol, já que atletas nas rotinas de viagens e hospedagens estarão sempre expostos a novos patógenos, e experimentado outros estressores para o sistema imunológico incluindo a falta de sono, estresse mental grave, condições ambientais com clima frio, dietas inadequadas ou perda de peso. No Brasil, por exemplo, as viagens são longas e consequências fisiológicas desses deslocamentos em transportes aéreos podem acontecer, incluindo redução da saturação de oxigênio e qualidade do sono (FOWLER *et al.*, 2014), o mesmo fenômeno observado como se fosse durante e após a exposição prolongada à hipóxia leve (COSTE *et al.*, 2009). Isso certamente afeta a cascata imunomoduladora via liberação do cortisol, sugerindo possibilidade de vulnerabilidades a infecções (COSTE *et al.*, 2009).

## **2.6. Nutrição recuperativa pós-exercício para futebolistas**

A nutrição desempenha papéis essenciais no rendimento esportivo de atletas. Uma das regras básicas para a saúde é que os atletas devem manter um equilíbrio entre as suas necessidades de nutrição e dieta, a fim de restaurar funções biológicas (BURKE, 1997). Este equilíbrio deve ser entendido na necessidade dietética diária tanto em termos de calorias (saldo quantitativo) e em termos de macro e micronutrientes (saldo qualitativo).

Os objetivos da nutrição na recuperação são específicos para cada atleta e para cada período de formação, e parece assim ser determinada através de um grupo de

fatores ligados a treino e competição como afirmado por (BURKE *et al.*, 2014), sendo:

- modificações fisiológicas e homeostáticas;
- esgotamento dos substratos energéticos;
- lesão muscular ou catabolismo protéico;
- adaptação morfológica ou enzimática superior.

No entanto, a efetividade das abordagens nutricionais é dependente da duração e outras obrigações ou necessidades durante o período de recuperação (por exemplo, dormir, viajar). Do ponto de vista da intervenção, há de se observar a necessidade, disponibilidade e logística para ingestão imediata de alimentos. Desta forma, entendimento das fontes de substratos, metabolismo, balanço catabolismo e anabolismo, assim como, imunocompetência em interação como diferentes abordagens nutricionais, são necessárias para tornar a intervenção eficaz para recuperação e com aderência por parte dos atletas.

### **2.6.1. Necessidades dietéticas**

Os jogadores de futebol devem consumir uma dieta que contenha uma quantidade de calorias adequada que permita a manutenção da massa corporal e seja suficiente para atender a demanda de treinos e jogos (WILLIAMS *et al.*, 2006). Tanto a quantidade (aspecto temporal) quanto a qualidade (intensidade) do treino/jogo influenciam o gasto energético do jogador. Além disso, outros fatores, como a posição que o jogador desempenha no time, a distância que ele percorre durante um jogo e o estilo de jogo adotado, também influenciarão no gasto energético (REILLY, 1997).

Em termos gerais, pode se dizer que os jogadores de futebol são atletas com alta demanda energética e têm seus requerimentos energéticos diários entre 3.150 a 4.300 kcal (RUSSELL *et al.*, 2011). Mais especificamente, o gasto energético durante os treinos é, em média, 12 kcal/min e, durante uma partida oficial, 4,8 kcal/min para os goleiros e 16,7 kcal/min para os demais jogadores (SHEPHARD, 1999).

O carboidrato é a fonte de energia mais importante na dieta de um jogador de futebol e direcionamento de consumo diário recomendado para manter estoques de glicogênio muscular durante vários dias de treinamento intenso está entre 60% e 70% da ingestão total de energia (CLARK, 1994). Além disso, em termos de orientações dietéticas da FIFA/F-MARC (FIFA/F-MARC. CONSENSUS STATEMENT, 2006) para a ingestão de CHO, sugere-se que jogadores de futebol podem necessitar de 5-7 g de CHO por kg de massa corporal durante os períodos de treinamento moderado, enquanto que durante o treinamento intenso ou jogo, esta ingestão poderia subir para 10 g/kg/dia de CHO, o que corresponderia a um montante de 500–800 g/dia de CHO (CLARK, 1994).

Apesar da importância, têm sido observados que atletas de futebol consomem menores taxas de energia média diária e quantidade total de carboidratos do que aquilo que é normalmente consumido por atletas em esportes similares quando nenhuma intervenção nutricional é feita para que eles sigam (JACOBS *et al.*, 1982). Da mesma forma, um déficit de energia diária média de  $788 \pm 174$  kcal existiu em uma semana de recordatório alimentar em jovens jogadores ingleses durante período competitivo (RUSSELL *et al.*, 2011).

Juntamente com o CHO, a GOR é a principal fonte de energia durante o exercício. O objetivo da utilização de gorduras durante o exercício é poupar o uso do glicogênio muscular. Geralmente, um consumo elevado de GOR na dieta é um problema muito comum nas dietas de atletas, tornando mais difícil o consumo das quantidades recomendadas de carboidrato (IGLESIAS-GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; RUSSELL *et al.*, 2011). Entretanto, uma redução muito severa no consumo de GOR não é indicado, já que esse nutriente participa do metabolismo da produção de energia, do transporte de vitaminas lipossolúveis e são componentes das membranas celulares (MAUGHAN *et al.*, 2004).

Hoje em dia é muito comum dietas com muito baixo teor de GOR, porém podem reduzir as reservas de triglicerídeos intramusculares, que são cruciais para fornecer ácidos graxos livres para os músculos durante a recuperação, especialmente para atletas em disciplinas de longa duração ou aqueles de treinamento várias vezes por dia. Por outro lado, o consumo de GOR na dieta de um jogador de futebol não deve ser maior do que 30% do valor energético total diário, já que os efeitos causados

por dieta hiperlipídica em relação à saúde são bem conhecidos (GUERRA *et al.*, 2001).

A necessidade de proteína de um indivíduo é definida como o menor nível de ingestão proteica proveniente da dieta que irá equilibrar as perdas de nitrogênio a partir do organismo em repouso em pessoas que mantêm um equilíbrio de energia em atividade física moderada (BURKE *et al.*, 2014). As taxas dinâmicas variam de tecido para tecido e as contribuições relativas mudam com a idade e adaptação a vários níveis de ingestão de proteínas. Durante o esgotamento físico são liberados aminoácidos essenciais que serão reutilizados para síntese proteica, outros são perdidos pelo catabolismo oxidativo. Este processo de reciclagem, o qual inclui intercâmbio de aminoácidos entre tecidos, depende de vários fatores metabólicos, hormonais e é influenciado pelo estado fisiológico do indivíduo (HAWLEY *et al.*, 2011; VAN LOON *et al.*, 2011).

Manipulações nutricionais para jogadores de futebol devem respeitar a IDR de PRO, já que esse esporte é uma atividade que requer também o desenvolvimento de atividades motoras de força levando a danos musculares. Assim o consumo indicado de proteínas está na ordem de 1,4 a 1,7 g/kg de massa corporal dia (LEMON, 1994). Essa recomendação de proteína poderia ser atingida através de ingesta alimentar habitual diária somente, sem o uso de suplementos PRO ou AA, sendo que a ingestão energética total deve ser suficiente para o uso ótimo da PRO e desempenho físico. Mas com o aumento da oxidação de AA ainda no jogo, há necessidade de reposição que muitas das vezes não é possível com a dieta abrindo possibilidade de uso benéfico da suplementação de AA (LEMON, 1994).

Vitaminas e minerais, conhecidos como micronutrientes, são necessários para o organismo em pequenas quantidades diárias (FOGELHOLM, 1994). Esses micronutrientes não são combustíveis para o metabolismo energético, mas participam de várias reações bioquímicas fundamentais para a manutenção da saúde, entre elas: produção de energia; síntese de hemoglobina; manutenção da massa óssea; função imune e proteção dos tecidos contra os danos oxidativos (MAUGHAN *et al.*, 2004).

Particularmente, os atletas correm risco potencial de ingestão inadequada de vitaminas e minerais pelo fato de se exercitarem por muito tempo sob alta intensidade e, também, pelo fato de viajarem bastante e dependerem de cardápios de restaurantes locais (GARCÍA-ROVÉS *et al.*, 2014). Assim, é de se esperar deficiência de um ou mais desses micronutrientes em atletas (GARRIDO *et al.*, 2007; MULLINIX *et al.*, 2003) e que isso possa trazer algum prejuízo em relação ao desempenho de jogadores de futebol (GRAVINA *et al.*, 2012). Além disso, pessoas fisicamente ativas perdem minerais pelo suor excessivo, pelas fezes e pela urina (BURKE, 1997; FOGELHOLM, 1994). Por isso, a ingestão de uma ampla variedade de alimentos, em especial frutas e hortaliças, pode assegurar para o organismo um adequado fornecimento de micronutrientes sem necessidades de suplementações especiais (BURKE *et al.*, 2014; GUERRA *et al.*, 2001).

### **2.6.2. Balanço anabolismo e catabolismo**

O desequilíbrio entre o balanço das concentrações dos hormônios anabólicos e catabólicos geram uma alteração na quantidade das reservas de PRO nos tecidos (VELDERS *et al.*, 2013). A razão testosterona/cortisol (T/C), que faz o controle do balanço anabólico/catabólico, vem sendo utilizada por muitos pesquisadores como marcador de anabolismo e catabolismo muscular (BANFI *et al.*, 2006; THORPE *et al.*, 2012). Pode se dizer que o aumento na razão a razão T/C pode estar relacionado com o aumento na atividade anabólica, enquanto que decréscimos na razão T/C maiores do que 30% demonstram sinais de recuperação incompleta do estresse imposto pelo exercício (BANFI *et al.*, 2006).

Um ambiente catabólico que se inicia ainda durante o jogo, com liberação de cortisol e outro hormônio hiperglicemiante como GH, faz com que a concentração plasmática de amônia aumente (RICO-SANZ *et al.*, 1999; ROSTGAARD *et al.*, 2008), principalmente devido à desaminação dos ACRs (WILKINSON *et al.*, 2010), trazendo prejuízos do ponto de vista neuromotor, ao passo que afeta o metabolismo de neurotransmissores (NYBO *et al.*, 2005).

Essa adaptação aguda que ocorre durante o jogo surge para manter níveis glicêmicos, através da elevação do cortisol (HANEISHI *et al.*, 2007). Porém, esse caráter catabólico é arrastado para a fase de recuperação, sendo demonstrada

através da concentração de cortisol elevada ( $50.5 \pm 2.6$ ;  $63.6 \pm 3.0$  e  $80.5 \pm 9.1$  ng.ml, respectivamente, *baseline*, 24 h e 48 h) e que a razão T/C diminuída significativamente às 24 h e 48 h ( $9.9 \pm 0.9\%$  e  $8.3 \pm 1.5 \%$ ), sendo somente restabelecida, para valores próximos ao de *baseline* ( $12.5 \pm 0.6 \%$ ) após 72 h de recuperação pós-exercício ( $11.5 \pm 0.8 \%$ ) (SILVA *et al.*, 2013).

Dessa forma fica um pouco mais claro que uma compensação aos níveis mais elevados do cortisol no pós-jogo deve ocorrer. Estratégias nutricionais como, por exemplo, intervenções com bebidas esportivas com aporte de fontes de CHO [B(CHO)] ou BEC(CHO-E) durante momentos oportunos durante o jogo e, principalmente no intervalo, poderão aliviar a atuação deletéria do cortisol e/ou mesmo ampliar a liberação de testosterona (BISHOP *et al.*, 1999; BISHOP *et al.*, 2002; SARI-SARRAF *et al.*, 2011).

Outros estudos em jogadores de futebol (ISPIRLIDIS *et al.*, 2008; MALM *et al.*, 2004) confirmaram reduções (~24% e 51%, imediatamente pós e 6 h pós, respectivamente) ou mesmo quantidade circulante de testosterona inalterada (ISPIRLIDIS *et al.*, 2008), o que pode ocasionar menor eficiência no processo recuperativo. Os motivos especulados é que a testosterona poderia estimular o aumento do número de células satélite, modular a degradação das PRO celulares danificadas e dos processos inflamatórios (MALM *et al.*, 2004; VELDERS *et al.*, 2013).

A hipertrofia muscular ocorre apenas a partir do saldo de síntese de PRO, ou seja, quando a síntese proteica muscular excede a degradação proteica muscular (BURKE *et al.*, 2012; TIPTON *et al.*, 2004). Por isso, a ingestão de uma mistura de aminoácidos ou de um hidrolisado de PRO após uma sessão de exercício de força estimula a taxa de síntese proteica em músculo humano e promove balanço proteico muscular positivo (TIPTON *et al.*, 2004).

No momento pós-exercício, a ingestão concomitante de CHO-PRO, com quantidades próximas a 0,8 g/kg/h; 0,2-0,4 g/kg/h, respectivamente para CHO e PRO, tem sido adotadas, pois as mesmas parecem fornecer uma carga ótima que é essencial para estimular a síntese tecidual e síntese de glicogênio (BEELEN *et al.*, 2010; VAN LOON *et al.*, 2000a; VAN LOON *et al.*, 2000b). Nesse sentido, para

atender tais demandas, surgem as propostas multi-ingredientes contendo CHO e PRO com suplementação particulares como medidas potenciais de recuperação em atletas (NACLERIO *et al.*, 2015), assim como a experimentação de bebidas achocolatadas comerciais para intentos recuperativos pós-exercício (SPACCAROTELLA *et al.*, 2011).

Outras aplicações de ingestão pós-exercícios têm apontado para o uso de ACR que também tem potencial de modular o balanço nitrogenado. Por exemplo, a leucina influencia o controle de curto prazo da etapa de tradução da síntese proteica e este efeito é sinérgico com a insulina, que é um hormônio anabólico, com papel crítico na manutenção da síntese proteica muscular (ANTHONY *et al.*, 2000; ANTHONY *et al.*, 2001). Contudo, a insulina de modo isolado não é suficiente para estimular a síntese proteica muscular no estado pós-absortivo, sendo necessária a ingestão de PRO ou de aminoácidos para restaurar completamente as taxas de síntese proteica (GARLICK, 2005; ROWLANDS *et al.*, 2015).

É proposto que o efeito da insulina na síntese proteica muscular esteja relacionado ao papel desse hormônio em potencializar o sistema de tradução de PRO, ao invés de regular diretamente tal processo, ou seja, a insulina exerce um efeito permissivo sobre a síntese proteica na presença de aminoácidos (GARLICK, 2005; ROWLANDS *et al.*, 2015). Aliado a isto, cabe ressaltar que a administração oral de leucina produz ligeiro e transitório aumento na concentração de insulina sérica, fato este que age também de modo permissivo para a estimulação da síntese proteica induzida por este aminoácido (ANTHONY *et al.*, 2002; GROZIER *et al.*, 2005; WILKINSON *et al.*, 2013).

Os mecanismos pelos quais a leucina exerce os seus efeitos secretagogos da insulina variam (XU *et al.*, 2001). Leucina pode servir como uma fonte de combustível para a produção de ATP ou ser convertido em ácido  $\alpha$ -cetoisocaproato, um intermediário metabólico que por sua vez inibe a atividade do canal de de potássio dependente de ATP ( $K_{ATP}$ ), conduzindo à despolarização da membrana e desencadeando a secreção de insulina (BRÄNSTRÖM *et al.*, 1998). Da mesma forma, a leucina também regula a liberação de insulina agindo sobre o glutamato-desidrogenase, uma enzima chave para o ciclo do ácido tricarboxílico (CHENG *et al.*, 2015). Rotas adicionais de ações incluem a provocação das oscilações de



cálcio em células  $\beta$  pancreáticas (XU *et al.*, 2001) e regulação da expressão de alguns genes que são fundamentais para a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas (CHENG *et al.*, 2015).

Os efeitos de sinalização da leucina sobre a síntese proteica muscular ocorrem por mecanismos dependentes de insulina, que incluem a sinalização mediada pela proteína *mTOR* para a *4E-BP1* e a *p70S6k*, enquanto os efeitos independentes de insulina são mediados por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido, que envolve a fosforilação do eIF4G e/ou sua associação com o eIF4E (ANTHONY *et al.*, 2001; MILLWARD, 2012; ROGERO *et al.*, 2008).

Cabe ressaltar porém, que as taxas máximas de síntese de proteína durante a recuperação pós-exercício, provavelmente, exigem sinalização a partir dos aminoácidos, mas também a partir do sinal anabólico fornecido pelo exercício (CHURCHWARD-VENNE *et al.*, 2014; LAYMAN *et al.*, 2015).

### **2.6.3. Metabolismo de proteínas, aminoácidos e regulação da síntese proteica muscular**

As proteínas são polímeros de elevado peso molecular, compostos de nitrogênio, carbono, oxigênio e, algumas vezes, enxofre, fósforo, ferro e cobalto. São formadas por complexos de aminoácidos que podem estar ligados em formações peptídicas (MAUGHAN *et al.*, 2004). As proteínas atuam no crescimento e desenvolvimento do organismo e são responsáveis pela regulação do metabolismo, transporte de nutrientes, atuam como catalisadores naturais, na defesa imunológica, como receptores de membrana dentre outras funções (MAUGHAN *et al.*, 2004).

A digestão das PRO da dieta é um processo complexo que ocorre em etapas (DANGIN *et al.*, 2001). Os principais locais da digestão são: estômago, lúmen do intestino delgado e células da mucosa do intestino delgado. A digestibilidade das PRO alimentares depende da estrutura da proteína, da severidade do processamento térmico e de fatores não proteicos do alimento, por exemplo, interação com fibras (GRYSON *et al.*, 2014; KOOPMAN *et al.*, 2009).

O valor nutritivo de uma proteína depende principalmente da capacidade desta em suprir as necessidades do organismo de todos os aminoácidos dieteticamente indispensáveis. A qualidade proteica, quantidade e a digestibilidade são de extrema importância para a dieta, por serem indicadores do fornecimento de significativas quantidades de aminoácidos essenciais e retenção nitrogenada (PIRES *et al.*, 2006). Por contemplar esse escopo de atributos, a proteína isolada do soro do leite é a mais pura fonte proteica conhecida com concentração de proteínas superior a 90% (PIRES *et al.*, 2006).

Além disso, segundo o método *PDCAAS* (*Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*), a proteína de soro do leite tem a pontuação máxima para o cálculo do valor proteico corrigido em função de sua excelente digestibilidade e pelo fato de fornecer ou superar a quantidade recomendada de cada aminoácido essencial (GILANI, 2012). Seguindo essa linha, as PRO animais normalmente têm grande digestibilidade equivalendo a ordem de 90%. Já as PRO vegetais têm digestibilidade mais reduzida (BOS *et al.*, 2003; PIRES *et al.*, 2006).

O aquecimento dos alimentos, em geral, aumenta a digestibilidade das PRO, porque destrói a conformação espacial, facilitando o ataque das enzimas do trato digestivo. Esse processo de alteração da estrutura tridimensional de uma proteína é chamado de desnaturação. A desnaturação, na prática, pode ser reversível ou não. Assim, tanto na culinária, como na indústria de alimentos, a desnaturação é muito usada de forma intencional para vantagens tecnológicas ou nutricionais (KORHONEN *et al.*, 2007).

Em humanos saudáveis, nove aminoácidos são considerados essenciais, uma vez que não podem ser sintetizados endogenamente e, portanto, devem ser ingeridos por meio da dieta. Dentre os aminoácidos essenciais, incluem-se os três aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), ou seja, leucina, valina e isoleucina (LAYMAN *et al.*, 2015).

Em indivíduos adultos, ACR são relevantes para a manutenção da proteína corporal além de serem fonte de nitrogênio para a síntese de alanina e glutamina (ROGERO *et al.*, 2008). Existem evidências demonstrando o papel fundamental dos ACR – especialmente a leucina – na regulação de processos anabólicos envolvendo tanto a síntese quanto a degradação proteica muscular. Assim, devido à sua ação isolada, a

leucina é considerado não apenas um único aminoácido que constitui as proteínas, mas também um aminoácido com propriedades fisiológicas e farmacológicas que podem promover significativos efeitos anti-catabólico observados em *in vitro* e *in vivo* (NICASTRO *et al.*, 2011).

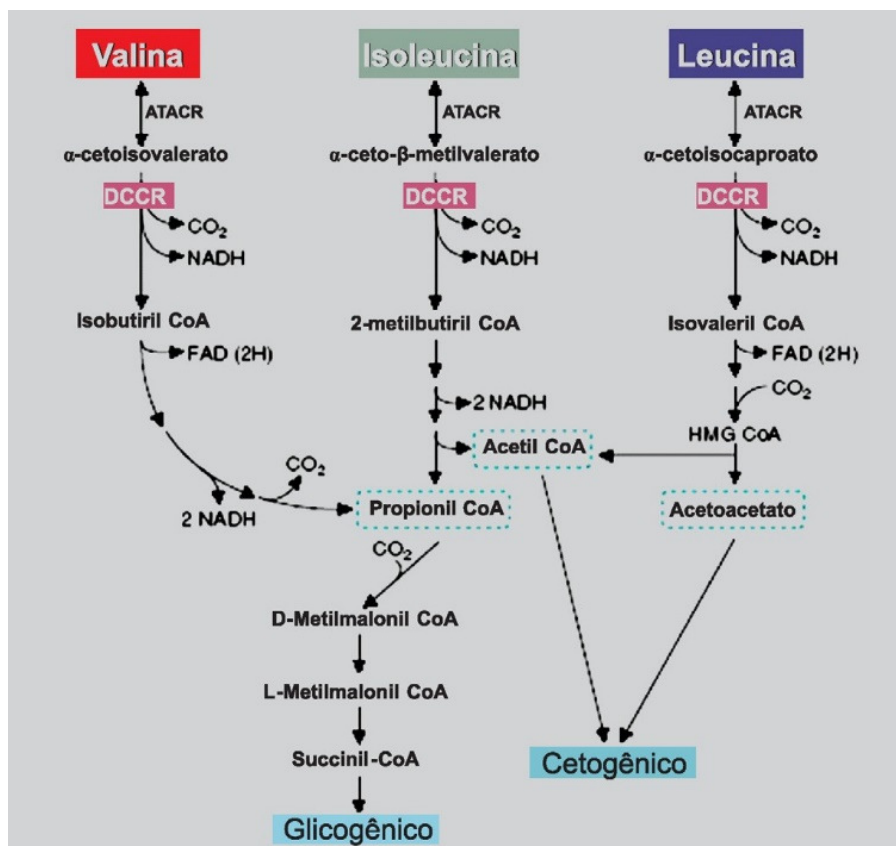
No que concerne a nutrição esportiva, os ACR são extensivamente utilizados por atletas baseado na premissa de que esses aminoácidos podem promover anabolismo proteico muscular, atuar em relação à fadiga central, favorecer a secreção de insulina, melhorar a imunocompetência, diminuir o grau de lesão muscular induzido pelo exercício físico e aumentar a performance de indivíduos que se exercitam em ambientes quentes (ROGERO *et al.*, 2008).

Diferentemente de outros aminoácidos, que são oxidados primariamente no tecido hepático, o sistema enzimático mais ativo para a oxidação dos ACR está localizado no músculo esquelético (ROGERO *et al.*, 2008). Apesar do fígado não poder diretamente catabolizar os ACR, o mesmo apresenta um sistema muito ativo para a degradação dos cetogênicos de cadeia ramificada oriundos dos correspondentes ACR (MAUGHAN *et al.*, 2004).

Praticamente não há armazenamento de aminoácidos no corpo. Eles são constantemente utilizados para formar e reformar outros componentes, pela quebra e ingestão de PRO, com a excreção dos excessos. Qualquer “armazenamento” dá-se na forma de PRO (ROGERO *et al.*, 2008). Entretanto, há um limite superior, após o qual os aminoácidos são degradados e utilizados como energia ou armazenados como gorduras.

Nesse sentido, chamam-se glicogênicos aqueles aminoácidos que podem contribuir para a síntese de glicose, por causa da natureza dos compostos de carbono que eles têm (piruvato ou intermediários do ciclo de *Krebs* que podem ser convertidos em glicose). Já os cetogênicos são os aminoácidos cujo catabolismo leva a acetil-CoA e/ou a acetoacetil-CoA, que são os precursores dos corpos cetônicos e não podem fornecer glicídios a síntese da glicose (MAUGHAN *et al.*, 2004). Na Figura 1 é demonstrado o catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada.

Figura 1 – Catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada.



Fonte: Modificado de Rogero *et al.* (2008).

Nota: Os aminoácidos valina e isoleucina formam propionil CoA, que pode ser convertido em succinil-CoA. Os aminoácidos leucina e isoleucina formam acetil-CoA. O aminoácido leucina pode formar acetoacetato.

As estratégias atuais de isolamento ou quebra de PRO do leite (i.e. *Whey Protein Caseínas*), para obtenção de fragmentos menores, tem despertado atenção de pesquisadores na Nutrição e Ciências do Esporte pelo seu apelo de digestibilidade (MARSHALL, 2004). Em certos tipos de processamentos de PRO, como aquecimento em meio alcalino, ou à temperatura muito elevada, pode ocorrer a isomerização dos aminoácidos, com transformação da forma L em D (AA podem existir como isômeros; os de ocorrência natural são quase todos L) (IMAFIDON *et al.*, 1997).

Isso tem importância nutricional, pois, vários aminoácidos D não são aproveitados pelo organismo ou o são em menor velocidade. A D-metionina e a D-fenilalanina, por

exemplo, são aproveitadas pelo organismo do homem, mas de forma menos eficientemente que nas formas L (FRIEDMAN, 2010; GROPPER *et al.*, 1993). A maior eficiência das formas em isômero natural L pode se dar pelo motivo de serem ativamente transportado através da mucosa, sendo esta transferência dependente da participação da vitamina B6 (piridoxal-fosfato) (GROPPER *et al.*, 1993).

Os aminoácidos absorvidos no intestino são levados pela circulação êntero-hepática até o fígado. Após uma refeição proteica, o teor de aminoácidos livres no sistema porta se eleva muito, porém, o sangue da circulação sistêmica, que sai do fígado, tem concentrações menores e um perfil diferente de aminoácidos livres, fato que indica o papel regulador do fígado. Como um grupo, os aminoácidos essenciais são mais bem absorvidos que os não essenciais (MAUGHAN *et al.*, 2004).

Portanto, além de incentivos na ampliação de seu uso na indústria alimentícia e até farmacêutica (MURO URISTA *et al.*, 2011), há um interesse crescente em desenvolver técnicas específicas para o isolamento desses componentes e fragmentos das PRO do soro de leite por enzimas ou fermentação, ou mesmos interações desses componentes, visando padronização, manutenção ou mesmo estímulo para suas propriedades bioativas e, por fim, a produção em larga escala (KORHONEN *et al.*, 2007).

A leucina exerce os seus efeitos em nível pós-transcricional e mais comumente durante a fase de iniciação da tradução do RNA-mensageiro em proteína. O mecanismo pelo qual a leucina estimula a tradução de PRO está relacionado ao fato do aumento da concentração intracelular desse aminoácido promover a ativação de uma proteína quinase denominado alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian Target of Rapamycin - mTOR*). O mTOR estimula a síntese proteica principalmente por meio de três PRO regulatórias chaves: a proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA (p70S6k); a proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E(4E-BP1); e o fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) (ANTHONY *et al.*, 2000; ANTHONY *et al.*, 2001).

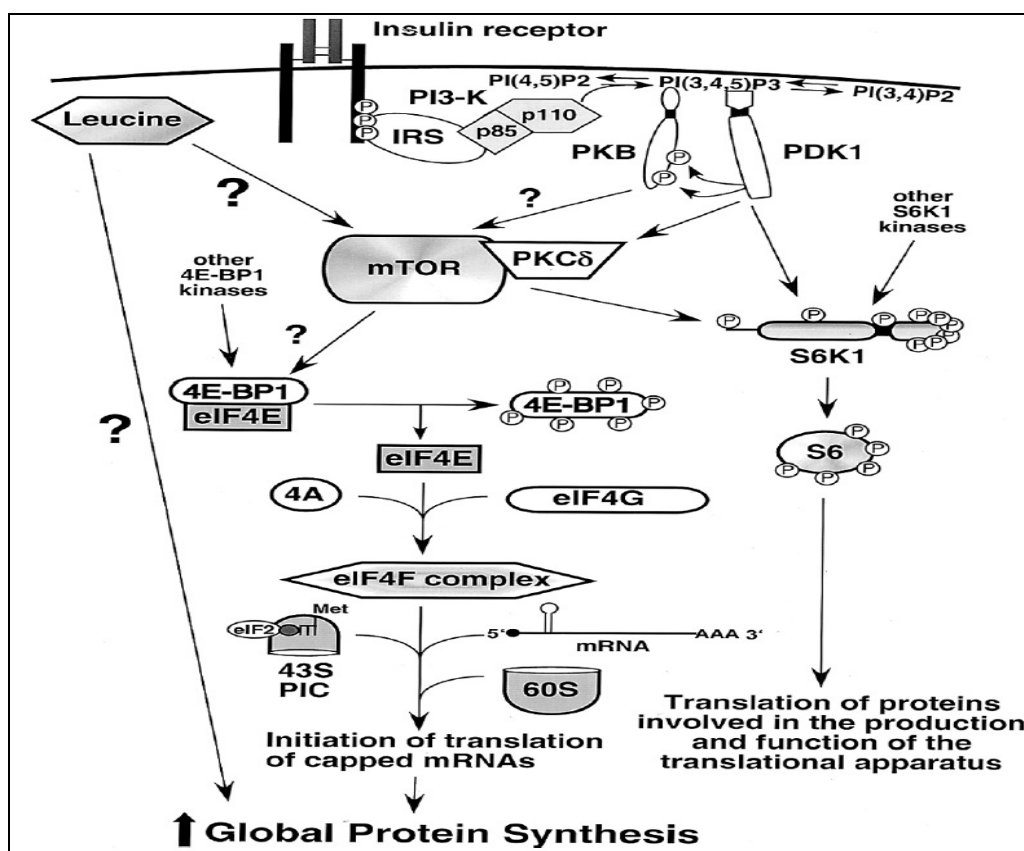
A 4E-BP1 é uma inibidora do fator de iniciação da tradução proteica conhecido como eIF4E. Quando a 4E-BP1 é fosforilada, o eIF4E é liberado e pode unir-se ao eIF4G – o qual está também sob o controle do mTOR – e ao eIF4A, o que forma o complexo

eIF4F. A montagem desse complexo é necessária para a continuação da etapa de iniciação da tradução do RNA-mensageiro em proteína. A mTOR também ativa a p70S6k, que estimula a iniciação da tradução bem como a elongação da síntese proteica por diferentes mecanismos. A p70S6k, quando ativada, fosforila e inativa a enzima quinase do fator de elongação 2 (eEF2K), fato este que permite que o eEF2 seja ativado, o que promove a elongação.

Consistente com esses fatos, a administração de leucina para ratos induz hiperfosforilação da 4E-BP1, promove formação do complexo eIF4F, causa hiperfosforilação da p70S6k e estimula a síntese proteica (BARBOSA *et al.*, 2012; KANDA *et al.*, 2013; KATO *et al.*, 2015). Similarmente, dietas para ratos contendo 40% de leucina e 60% de outros aminoácidos essenciais para ingestão, na ordem de 1 g/kg de massa corporal, estimulam a síntese proteica hepática e muscular, que é associada ao aumento da fosforilação da 4E-BP1 e à consequente redução da ligação do eIF4E para a 4E-BP1, além do aumento da formação do complexo eIF4F (KATO *et al.*, 2015).

Esses fatos permitem relacionar a resposta anabólica sobre a síntese proteica muscular induzida pela ingestão de PRO, por meio da capacidade do *mTOR* detectar alterações na concentração intracelular de leucina (ANTHONY *et al.*, 2000; ANTHONY *et al.*, 2001). Além desses mecanismos diretos, a ingestão de leucina também aumenta a síntese de PRO no músculo esquelético através de mecanismos dependentes e independentes de insulina (ANTHONY *et al.*, 2002). Todos esses eventos de sinalização da leucina podem ser observados na Figura 2 (ANTHONY *et al.*, 2001).

Figura 2 – Eventos de sinalização na estimulação de iniciação da tradução para síntese de proteínas por leucina.



Fonte: Adaptado de Anthony *et al.* (2001).

Apesar da adição de aminoácidos em bebidas esportivas terem resultados inconclusivos para a performance (SPACCAROTELLA *et al.*, 2011; WIŚNIK *ET AL.*, 2011), parece ser plausível sua adição nas propostas de recuperação, principalmente suplementadas com ACR, por fortes evidências de potencial anabólico (CHURCHWARD-VENNE *et al.*, 2014; ROWLANDS *et al.*, 2015). Da mesma forma, a suplementação com leucina poderá agregar potencial anabólico por vias não dependentes da insulina.

De todos os ACR, a leucina, provavelmente, tem as propriedades mais anti-catabólicas e pró-anabolizantes, e os seus efeitos são provavelmente mediados por *beta-hidroxi-beta-metilbutirato* (HMB), um derivado da leucina. Nesse sentido, a justificativa de sua suplementação, com intentos recuperativos de atletas, pode ser

observada pelas ações do HMB, tendo efeitos anabólicos que facilitam a recuperação após o treinamento de contraresistência, sendo uma adição recente à lista de agentes com potencial ergogênicos (MERO, 1999; WILKINSON *et al.*, 2013). O mecanismo pelo qual HMB pode funcionar ainda está para ser determinado, mas a leucina e seu análogo, o ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico, são reconhecidos por seus efeitos sobre as proteínas reguladoras do anabolismo durante condições de estresse metabólico (queimaduras, cirurgia, sepse e jejum) (MERO, 1999). Além disso, a leucina e ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico são estimulantes potentes da secreção de insulina (WILKINSON *et al.*, 2013).

#### **2.6.4. Estratégias nutricionais e síntese de glicogênio muscular**

Nos seres humanos, ~80% do glicogênio são armazenados nos músculos esqueléticos (80-150 mmol kg WW<sup>-1</sup>; ~500 g), com o fígado armazenando a quantidade de ~100 g (JENSEN *et al.*, 2011). Para perceber sua importância no futebol, basta notar que ambos os conteúdos de glicogênio muscular e hepático pré-exercício estão diretamente associados com o desempenho no futebol (BANGSBO *et al.*, 1992; EKBLÖM, 1986). Portanto, a reposição rápida dos estoques de glicogênio através da intervenção nutricional é potencialmente importante, pois rotinas de treinamentos e competições em jogadores de elite exigem que o glicogênio muscular tenha uma taxa de renovação eficaz para que, deste modo, possa ser mantida alta taxa de rendimento nesses compromissos.

Além do uso desse substrato para rendimento desportivo, tem sido sugerido que a presença de células inflamatórias na sequência a um EIDM pode causar concorrência para a glicose sanguínea dentro do músculo danificado, e que isso resultaria em aumento de utilização desse substrato, o que gera conseqüentemente diminuição de armazenamento de glicogênio muscular (TEE *et al.*, 2007). Estudos recentes têm indicado que fatores como o nível de glicogênio, o fornecimento de CHO ou disponibilidade e lesão muscular pode influenciar a recuperação, sendo está dependente da localização do glicogênio muscular após o exercício (KRUSTRUP *et al.*, 2011; NIELSEN *et al.*, 2011).

Uma intervenção eficaz também se faz necessária pelo fato de que no futebol, por exemplo, a incapacidade dos jogadores para manter os níveis normais de glicogênio



muscular, mesmo em repouso, provavelmente estão relacionados às intervenções pós-jogos e suas práticas alimentares em ambiente familiares (BURKE *et al.*, 2006; CLARK, 1994; JACOBS *et al.*, 1982; NÉDÉLEC *et al.*, 2013). Essa intervenção ganha ainda mais importância quando se verifica a taxa média de reposição de glicogênio que é de cerca de 5-6 mmol.h (ou 5-6%), o que ocasiona uma demora de pelo menos 24 h para normalizar os estoques após depleção substanciais (ORTENBLAD *et al.*, 2013; ZAWADZKI *et al.*, 1992).

As estratégias pontuais pós-jogo indicam a necessidade de consumo de 50 g ou 1g/kg nos primeiros 30 min e mais 1-2 g/kg a cada 30 min subsequentes (ou ainda consumirem uma refeição rica em CHO dentro de 2 h), pois tem sido evidenciado alcançar taxas superiores de síntese de glicogênio e melhorar o desempenho subsequente após tempo de recuperação limitada (por exemplo, entre 2 e 6 h) (BURKE *et al.*, 2004; CLARK, 1994; PHILLIPS *et al.*, 2011). Taxa muito alta de síntese de glicogênio durante a primeira 4-6 h de recuperação foi relatada quando grandes quantidades de CHO foram alimentadas em 15-30 min de intervalo, o que pode ser atribuído a um padrão de insulina e glicose mais elevada e sustentada durante o protocolo de alimentação (JENTJENS *et al.*, 2001; VAN LOON *et al.*, 2000b).

No entanto, evidências atuais sobre manipulação nutricional pós-exercício propõem que, para melhorar a síntese de glicogênio muscular, essa deva envolver a combinação de CHO-PRO (BERARDI *et al.*, 2006; BETTS *et al.*, 2010; HAWLEY *et al.*, 2006; TIPTON *et al.*, 2004), sendo as combinações com aproximadamente 0.8 g/kg/h de CHO as que permitiram taxas mais altas de síntese (BETTS *et al.*, 2010). A quantidade máxima absorvível de CHO ingerida está em aproximadamente 60 g/h ou 1,1 g/min (HARA *et al.*, 2011; JEUKENDRUP *et al.*, 2000; ORTENBLAD *et al.*, 2013), sendo que acima desses limiares a adição de PRO não fornece nenhum outro benefício (HARA *et al.*, 2011; ORTENBLAD *et al.*, 2013). No entanto, pode haver outros benefícios da PRO adicional, como o fornecimento de AA's para manter o equilíbrio proteico positivo e apoiar a síntese muscular.

Os alimentos de maior índice glicêmico também têm sido considerados como os mais efetivos para síntese de glicogênio muscular durante as primeiras 3 h de recuperação (BROWN *et al.*, 2013; CHRYSANTHOPOULOS *et al.*, 2004). Além

disso, pode ser esperado que ocorra também uma menor alteração pós-exercício na razão neutrófilo:linfócitos (um marcador de estresse imunológico), o que pode ser indicativo de menos stress no sistema imunitário e menor imunodepressão induzida por exercício (GLEESON, 2013; NIEMAN *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2011).

Portanto, com regra geral, pode ser adotado recomendações de consumo de CHO na ordem correspondente a 1 g/kg/h para maximizar o armazenamento de glicogênio nas primeiras duas horas pós-exercício (BETTS *et al.*, 2010; BURKE *et al.*, 2004; ORTENBLAD *et al.*, 2013). Além desses apontamentos, estudo de meta-análise da literatura também fornece evidências de que, quando a ingestão de CHO é inferior ao montante necessário supracitado para maximizar o armazenamento de glicogênio durante as primeiras 4 h de recuperação, a combinação de CHO-PRO com aproximadamente 20-25 g de proteína pode ajudar no reabastecimento (BETTS *et al.*, 2010). A partir desse intervalo temporal, considerada fase sensível para síntese de glicogênio, o padrão e horários das refeições e lanches devem priorizar àqueles ricos em CHO, podendo ser escolhidos de acordo com o que é prático e agradável e distribuídos ao longo de períodos mais longos de recuperação (i.e 24 h) (BURKE *et al.*, 2014).

Fisiologicamente, a síntese de glicogênio muscular pode ser regulada por múltiplos mecanismos, incluindo o aumento da sensibilidade à insulina, da expressão *glicogênio sintase*, a ativação alostérica da *glicogênio sintase* e atividade da *proteína fosfatase 1* (PP1)(JENSEN *et al.*, 2012; MANABE *et al.*, 2013). O papel especulado para a insulina é que ela desempenhe uma função importante na absorção e armazenamento de glicogênio, em especial, quando as concentrações de glicogênio muscular são maiores do que 30-35 mmol/L (conhecida como a fase de insulino-dependente de síntese de glicogênio) (PRICE *et al.*, 1994; PRICE *et al.*, 1999). Além dos papéis hipotetizados como mediadora da via PKB-GS (*proteína quinase-B*; *glicogênio sintase*), outro papel esperado é que a presença de glicose serve para aumentar a concentração intracelular de *glicose-6-fosfato* (G6P) que também ativa a *glicogênio sintase* (IVY *et al.*, 1998). Valores de concentrações de insulina na veia porta de aproximadamente 19-24 mU/L (130-170 pmol/L) também tem sido observados como de sinalização quase máxima para síntese de glicogênio hepático (RODEN *et al.*, 1996). Assim, tem sido sugerido que a taxa de síntese de glicogênio

muscular e hepático deve ser ainda mais elevada, quando uma bebida CHO-PRO [B(CHO-PRO)] ou bebida CHO-AA é consumida (DETKO *et al.*, 2013; FERGUSON-STEAGALL *et al.*, 2011; HARA *et al.*, 2011; IVY *et al.*, 2002; IVY *et al.*, 2008), hipotetizando a hiperinsulinemia sinérgica.

Outros mecanismos provocados pela contração do músculo também tem sido evidenciados por elevarem a absorção de glicose independentemente da insulina, a qual é mediada através de várias moléculas de sinalização, tais como quinase ativada por AMP (AMPK),  $Ca^{2+}$ /calmodulina-quinases dependentes de proteína (CaMK's), fígado quinase B-1 e a proteína quinase C (AOI *et al.*, 2013; JENSEN *et al.*, 2011; WRIGHT *et al.*, 2004). Mas cabe ressaltar que se ocorrer dano muscular severo, essa cascata positiva passa a ser prejudicada e a sensibilidade a insulina reduzida, que prejudica, por consequência, a síntese de glicogênio muscular (AOI *et al.*, 2013; KIRWAN *et al.*, 2003; TEE *et al.*, 2007).

Portanto, vale reforçar que equilíbrio entre estímulo e recuperação deve existir, já que essas evidências apontam para efeitos positivos e negativos após uma ou poucas sessões de EIDM. Assim, estratégias recuperativas eficazes pós-jogos devem sempre ser pensadas no sentido mais amplo do dano muscular, como efeito de prejuízo mecânico, de estresse oxidativo e inflamatório, afinal, em longo prazo, a direção de ampliação da sensibilidade a insulina pode ser melhorada por efeito acumulativo (TEE *et al.*, 2007).

Apesar de aplicação limitada para o contexto do futebol, por sua intensidade, duração e necessidade de recuperação rápida, é provável que os músculos reabasteçam autonomamente boa parcela de seus estoques de glicogênio (30-50%) mesmo na ausência de ingestão de alimentos a partir de fontes endógenas de carboidratos (BANGSBO *et al.*, 1991; BANGSBO *et al.*, 1997; FOURNIER *et al.*, 2002). Entre essas fontes estão o *pool* intramuscular de intermediários glicolíticos (incluindo, por exemplo, o lactato), glicerol liberado da desagregação de triglicerídeos e os aminoácidos gliconeogênicos derivados de proteólise (FOURNIER *et al.*, 2002). Na presença de altos níveis de lactato, a gliconeogênese de lactato pode ser responsável por até metade do glicogênio muscular sintetizada durante a recuperação em humanos (BANGSBO *et al.*, 1997), operando principalmente em fibras musculares de contração rápida envolvendo a conversão de lactato

intramuscular em glicogênio muscular numa taxa de 0,17-0,34 e 0,002 mmol<sup>-1</sup> de unidades de glicose min<sup>-1</sup> (kg wet wt)<sup>-1</sup> para os 10 primeiros e últimos 50 min de recuperação, respectivamente (BANGSBO *et al.*, 1991).

O ciclo de Cori em humanos, por outro lado, difere em muitos aspectos deste percurso de síntese endógena de glicogênio muscular supracitado em que, após a liberação de lactato a partir de músculo, gliconeogênese hepática converte este metabolito em glicose, o que por sua vez é liberado para a corrente sanguínea, antes de ser levado e armazenado pelo músculo como glicogênio (PALMER *et al.*, 1997), parecendo ser o precursor mais importante para a síntese de glicogênio muscular após o exercício intenso (BANGSBO *et al.*, 1997). O potencial de tal percurso pode ser ampliado com o oferecimento de CHO imediatamente após o exercício aproveitando o aumento de sensibilidade a insulina (IVY *et al.*, 1998; JENSEN *et al.*, 2011; JENSEN *et al.*, 2012), sendo demonstrado que oferecimentos superiores às 2 h não são desejados, pois podem comprometer a taxa de síntese do glicogênio em aproximadamente 50% (IVY *et al.*, 1988).

Durante o período de recuperação a um exercício, que leve ao empobrecimento do glicogênio, a síntese do mesmo tem sido sugerida ser também dependente da localização. Nielsen *et al.* (2012) mostraram que a síntese de glicogênio intramiofibrilar (69% vs. 54% intermiofibrilar e 59% em subsarcolemal; todos em relação a linha de base) foi preferencialmente realizada durante às 24 h iniciais de 120 h de recuperação em jogadores após um jogo de futebol. Nesse estudo supracitado também foi sugerido que o aumento inicial do glicogênio muscular ocorreu devido a um aumento no número de partículas e mais tarde por um aumento no tamanho das mesmas. Houve apontamentos de que a síntese de glicogênio intramiofibrilar é prejudicada durante o segundo dia de recuperação, enquanto que o mesmo continuar a ocorrer exclusivamente a partir do segundo para o quinto dia de recuperação (KRUSTRUP *et al.*, 2011).

Do ponto de vista de vias de sinalização, o padrão de síntese de glicogênio muscular após depleção em exercício ocorre em duas fases (JENTJENS *et al.*, 2003; PRICE *et al.*, 1994). Inicialmente, existe um período de síntese rápida que não requer a presença de insulina que perdura entre 30 a 60 min. Esta fase rápida da síntese de glicogênio muscular é caracterizada por uma translocação induzida pelo exercício na

proteína transportadora de glicose-4 (GLUT-4) à superfície das células, conduzindo a um aumento da permeabilidade da membrana muscular para a glicose (IVY *et al.*, 1998).

Após esta fase rápida, a continuidade da síntese de glicogênio muscular ocorre a uma taxa muito mais lenta e pode durar várias horas (JENTJENS *et al.*, 2003; PRICE *et al.*, 1994). Durante essa fase, a insulina inicia o seu efeito no músculo esquelético através da ligação ao receptor da insulina (IRS), seguido por auto receptor de fosforilação. Isto induz uma série de fosforilação e interações proteína-proteína mediando a sinalização da insulina, tendo como produto final a síntese de glicogênio (JENSEN *et al.*, 2011). Outro aspecto observado é que além da insulina (IVY *et al.*, 1998; KANDA *et al.*, 2012), a contração muscular (IVY *et al.*, 1998) também é eficiente para aumentar a atividade da *glicogenio sintase*, a enzima limitante na síntese de glicogênio. Portanto, pode ser esperada após atividade física, uma somação de fatores que estimulam a síntese de glicogênio intramuscular superior a linha de base, fenômeno conhecido como supercompensação de glicogênio (JENSEN *et al.*, 2012).

#### **2.6.5. Nutrição e imunocompetência**

Diversos mecanismos parecem estar envolvidos na imunodepressão em resposta ao exercício, dentre eles: a indução da liberação de hormônios estressores; a alteração da temperatura corporal; o aumento do fluxo sanguíneo e a desidratação (NIEMAN *et al.*, 2006). O exercício com intensidade acima de 70% do  $VO_{2máx}$ , de média a longa duração, ou mesmo àqueles com intensidade máxima e curta duração ou com pesos, pode ser considerado como um modelo para uma imunodepressão temporária, que ocorre após um estresse físico (PEDERSEN *et al.*, 1996; WALSH *et al.*, 2011). Além disso, exercícios associados a danos musculares podem servir de modelo de resposta da fase aguda no local da infecção (WALSH *et al.*, 2011).

O exercício intenso e prolongado como o futebol está associado com temporária imunossupressão que afeta macrófagos, neutrófilos e linfócitos (GRAVINA *et al.*, 2011; MALM *et al.*, 2004). Nesse sentido, uma intervenção nutricional específica

pode ter potencial imunomodulador e pode ser eficaz na tentativa de acelerar ou fortalecer as respostas imunes e antioxidantes do jogador de futebol na fase de recuperação (BISHOP *et al.*, 1999; GRAVINA *et al.*, 2012; SARI-SARRAF *et al.*, 2011). Por exemplo, tem sido demonstrado recentemente que oferta de B(CHO-PRO) imediatamente após 2 h de exercício extenuante evitou a redução da desgranulação de neutrófilos em comparação quando somente água foi consumida nesse mesmo período de recuperação (COSTA *et al.*, 2011). Além disso, a presença de CHO nessas bebidas tem ação de favorecimento de diminuir também os hormônios de estresse e citocinas anti-inflamatórias (IL-6 e IL-10)(GLEESON, 2013; WALSH *et al.*, 2011).

Uma possível associação entre o consumo de CHO com uma menor perturbação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), tem gerado evidências de menor alteração pós-exercício na razão neutrófilo:linfócitos (um marcador de estresse imunológico), o que pode ser indicativo de menor estresse no sistema imunitário e menor imunodepressão induzida por exercício (GLEESON, 2013; NIEMAN *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2011). Por esse fenômeno, associações entre o exercício agudo e risco de infecções, tal como a teoria da “janela aberta” (PEDERSEN *et al.*, 1996) e a “curva J” (NIEMAN *et al.*, 2006) são aceitos e são sugestivos para explicar a imunossupressão após um estresse físico excessivo.

Os ACR podem atuar como precursores da síntese de glutamina no tecido muscular (MAUGHAN *et al.*, 2004). Esses aminoácidos fornecem grupamentos amino em reações de transaminação, as quais acarretam na formação de glutamato que, posteriormente, na reação catalisada pela enzima glutamina sintetase, participa da síntese de glutamina (ROGERO *et al.*, 2008). Nesse contexto, alguns estudos têm avaliado a efetividade da suplementação com ACR para manter a concentração plasmática de glutamina e modificar a resposta imune frente ao exercício de endurance exaustivo (KOO *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2015). Desse modo, verifica-se que a manutenção da concentração plasmática de glutamina por meio da suplementação com ACR apresenta efeitos benéficos sobre a imunocompetência de atletas (FAVANO *et al.*, 2008; NIEMAN *et al.*, 2006; ROGERO *et al.*, 2008).

Todavia, estudos com suplementação de glutamina durante e após exercícios de endurance (KRZYWKOWSKI *et al.*, 2001) ou presente em composto multi-

ingredientes (NACLERIO *et al.*, 2015) indicam que essa intervenção nutricional não previniu a redução da imunocompetência induzida pelo exercício. Sendo assim, não está elucidado qual o mecanismo de ação da suplementação com ACR sobre a imunocompetência, ou seja, se é efeito decorrente da manutenção da concentração plasmática de glutamina, ou se é efeito direto dos ACR, ou ainda, das respostas insulinêmicas da ingestão dos mesmos (ROGERO *et al.*, 2008).

Encontra-se na literatura evidências sobre o efeito da ingestão de proteína do leite bovino (LÓPEZ-EXPÓSITO *et al.*, 2008; RUSU *et al.*, 2009; VOGEL, 2012) sobre a imunidade inata e da ingestão de leucina após o exercício sobre os efeitos na função dos neutrófilos durante a recuperação de exercício intenso e prolongado (NELSON *et al.*, 2013). Entre os pressupostos teóricos da suplementação estaria o fato da leucina ser um potente ativador e regulador translacionais da mTOR (ANTHONY *et al.*, 2000; CHENG *et al.*, 2015), que é um regulador central de diversas respostas celulares a estímulos ambientais. Em células do sistema imunológico, a mTOR modula a diferenciação e a função das células T em resposta a estímulos ambientais e demandas metabólicas celulares (POWELL *et al.*, 2010).

Elucidações de mecanismos e efeito dose-resposta poderão nortear suplementações especiais ou mesmo desenvolvimento de novos produtos para atletas quando alimentação convencional não for possível, visando suplantar a imunodepressão em atletas.

#### **2.6.6. Reposição de fluidos e eletrólitos pós-exercício**

A desidratação que acompanha o exercício prolongado, especialmente em ambientes quentes, pode ter implicações para a saúde, aumentando o risco de lesões e doenças relacionadas ao calor (CONVERTINO *et al.*, 1996). Em circunstâncias extremas (por exemplo, o exercício exaustivo em um ambiente quente e úmido) pode ocorrer endotoxemia grave, levando a inflamação aguda, sepse, choque e falência de órgãos, o que pode ser fatal em situações extremas (LIM *et al.*, 2009; SHEPHARD *et al.*, 1998).

Desta forma, quando a desidratação não pode ser evitada ou aliviada, como é o caso do futebol, o papel da reidratação pós-exercícios torna-se fundamental. Para minimizar os efeitos potencialmente negativos da desidratação, volume de fluido suficiente deve ser consumido para substituir o que foi perdido, o que é em grande parte afetada pela quantidade de suor produzido. Desta forma, recomendações mais específicas para ingestão de fluidos são difíceis de serem aplicados devido aos inúmeros fatores que podem influenciar como a massa corporal, a intensidade do exercício, as taxas individuais de suor e condições ambientais (PHILLIPS *et al.*, 2011).

Preferências ou aceitação de bebida pode representar um problema quando se considera a aplicação para reidratação em que a ingestão é voluntária. Recomendações atuais para adultos sugerem que um volume igual a 150 % das perdas de massa corporal é necessário para alcançar a restauração completa do equilíbrio de fluidos corporais (MAUGHAN *et al.*, 2008; SHIRREFFS *et al.*, 2006). No entanto, a realidade prática sugere que consumir o volume relativamente grande que se equivalha a 150% das perdas de fluido, dentro do prazo estabelecido, é difícil para muitos indivíduos. Além disso, o consumo de grandes quantidades de fluido em uma única ocasião, ou na ausência da substituição das perdas de eletrólitos, irá resultar em grandes perdas de urina (CONVERTINO *et al.*, 1996; SHIRREFFS *et al.*, 2006; SPACCAROTELLA *et al.*, 2011). Posteriormente a ingestão de BEC(CHO-E), as grandes flutuações da pressão osmótica (osmolalidade plasmática diminuída) ocorridas resultariam em taxas de depurações aumentadas nos rins, semelhantes aos observados por Shirreffs *et al.* (2007), o que resulta em um grande aumento da produção de urina.

Por isso, uma diretriz prática de recomendação é consumir 200-400 mL a cada 15-20 min pós-exercício durante a primeira hora e depois de realizar as práticas alimentares normais (se a próxima sessão é no mínimo 24 h de intervalo), ou continuar a beber 200-400 mL até a meta de 150% das perdas de fluidos se a recuperação é necessária no curto prazo (ou seja, de 4-6 h) (MAUGHAN *et al.*, 2008; MAUGHAN *et al.*, 2010). Outra estratégia para efetividade e aderência ao plano de reidratação é usar refeições com teor mais elevado de calorias podendo, assim, retardar a taxa de esvaziamento gástrico, o que é provável de melhorar a



capacidade de absorver e reter fluido a partir do intestino delgado (KWIATEK *et al.*, 2009).

Uma intervenção nutricional na forma líquida parece ser uma maneira mais eficaz para a recuperação hidroeletrolítica dos atletas em comparação com alimentos sólidos, apesar de que controle de osmolalidade deva ser mais pesquisado para evidências e apontamentos de formulações mais conclusivos (BETTS *et al.*, 2010). Além de atender o primeiro critério, a capacidade do leite para atuar eficazmente como uma bebida de reidratação provavelmente relaciona-se também com sua composição.

O leite, naturalmente, tem altas concentrações de eletrólitos (133 mg de Na<sup>+</sup> e 431 mg de K<sup>+</sup> em uma porção de 250 mL), o que ajuda na retenção de fluidos (JAMES, 2012; MARSHALL, 2004). Por ser um fluido altamente energético, um processo de esvaziamento mais lento do estômago acontece ocasionando absorção mais demorada para a circulação (MAUGHAN *et al.*, 2004). Esta absorção mais demorada atenua as grandes flutuações da osmolalidade do plasma que podem ocorrer com o consumo de grandes quantidades de água ou de BEC(CHO-E).

Portanto, a escolha de bebidas pós-exercício deve ser orientado por metas nutricionais gerais (necessidade de energia e outros nutrientes contidos), mas também para evitar características que possam interferir com o sono no período após uma sessão de treinamento (por exemplo, cafeína ou grandes volumes que irão estimular a necessidade de urinar) (BURKE *et al.*, 2014). Portanto, o sucesso das estratégias de reidratação depende da composição das bebidas ou suplementos em uso na fase de recuperação pós-exercícios e sobre o quanto desse líquido é retido e reequilibrado dentro de compartimentos de fluidos corporais (VOLTERMAN *et al.*, 2014).

## **2.7. Uso de bebidas achocolatadas na recuperação**

Entre as diferentes estratégias recuperativas, a alimentação é considerada fundamental. Isso, logicamente, tem impulsionado a indústria de alimentos ao desenvolvimento de uma variedade de novos alimentos objetivando atividades funcionais no organismo (KORHONEN *et al.*, 2007; SHIBY *et al.*, 2013). Nesse

sentido, os suplementos alimentares prontos para beber têm ganhado considerável importância nos dias atuais devido à praticidade e logística (PRITCHETT *et al.*, 2012; ROY, 2008). Os suplementos ou refeições líquidas também ajudam a solucionar problemas de apetite enfrentados por qualquer pessoa comum após atividade física vigorosa. Nesse sentido, reconhece-se que atletas possam sentir desconforto se comerem alimentos sólidos logo após o exercício (BURKE, 1997). Assim, fontes alimentares suplementadas são úteis quando os apetites são baixos, o intestino está cheio ou desconfortável, ou em contextos que não é prático preparar ou comer alimentos reais (BEELEN *et al.*, 2010).

Recuperação pós-treinamento e competição é um tema importante para as Ciências do Esporte e Nutrição Esportiva. Nesse sentido, há interesse na adoção de estratégias apoiadas em evidências visando otimizar a qualidade, a quantidade e o tempo de ingestão de alimentos, suplementos e líquidos após os treinos ou eventos competitivos, para assim aperfeiçoar processos, tais como reabastecimento energético, hidratação, reparação e adaptação. Embora alguns atletas considerem o fato de comerem qualquer coisa depois de cada treino ou competição como suficiente, a nutrição adequada pós-exercício pode envolver uma variedade de possibilidades de abordagens, tanto no aspecto qualitativo e quantitativo (NÉDÉLEC *et al.*, 2013).

A maior diferenciação na dieta de recuperação surge a partir da variação de perturbações fisiológicas encontradas em cada treino ou evento, sendo, portanto, uma abordagem específica. Desta forma, como tentativa viável, em virtude de um contexto desafiador para a proposição de um plano alimentar no que tange a recuperação de atletas, o uso de leite e bebidas achocolatadas têm ganhado respaldo científico nos últimos tempos (FERGUSON-STEGALL *et al.*, 2011; KARP *et al.*, 2006; POTTER *et al.*, 2015; SPACCAROTELLA *et al.*, 2011). Justificativas para seu uso advém pelo fato de podem contemplar os principais critérios energéticos e de cinética de absorção ao oferecer de proteína de boa qualidade (i.e, composição de aminoácidos) com diferentes taxas de solubilização (i.e, rápida, intermédia ou lenta) (BOS *et al.*, 2003).

Além disso, a presença de CHO, minerais e outros peptídeos podem desempenhar importantes papéis do ponto de vista antioxidante e imunomodulador (HAUG *et al.*,

2007; LÓPEZ-EXPÓSITO *et al.*, 2008; MARSHALL, 2004; MURO URISTA *et al.*, 2011). Dessa forma, alguns estudos originados primariamente com o próprio leite bovino têm observado vantagens do ponto de vista fisiológico aplicado ao esporte, sendo usado mais especificamente o leite pasteurizado homogeneizado semidesnatado (COCKBURN *et al.*, 2012; COCKBURN *et al.*, 2013), desnatado (SHIRREFFS *et al.*, 2007) e o leite tratado termicamente por *ultra high temperature* (UHT) (HARTMAN *et al.*, 2007) como eficazes em parâmetros de remodelação tecidual e reidratação que são comumente utilizados para monitoramento recuperativo em atletas.

Fazendo analogia, é fácil perceber em primeiro lugar que o leite bovino naturalmente contém CHO (lactose; ~4,9%) em quantidades semelhantes a muitas BEC(CHO-E) disponíveis que possuem glicose e maltodextrina (ROY, 2008). Além disso, o leite bovino contém as PRO caseína e soro em uma proporção aproximada de 3:1 (variando de acordo com a raça, alimentação, período da lactação) que ocasiona digestão e absorção mais lentas, resultando em aumentos prolongados e constantes na concentração de aminoácidos no sangue (BOS *et al.*, 2003). A caseína também tem o papel de carrear fósforo e cálcio formando uma massa no estômago, tornando a absorção de diversos minerais mais facilitada (HAUG *et al.*, 2007).

Embora já exista um número elevado de suplementos no mercado elaborados para contemplarem a razão CHO/PRO (~3:1) visando a melhoria de processos recuperativos de atletas, os principais diferenciais das bebidas achocolatadas está no fato de possuírem concentrações naturalmente elevadas de eletrólitos; PRO de alto valor biológico e serem mais acessíveis e mais bem aceitas em termos de palatabilidade (PRITCHETT *et al.*, 2009) e saciação (THOMAS *et al.*, 2009) pelos atletas.

Além disso, dadas às questões relacionadas com a contaminação potencial resultando em *doping* acidental (BURKE *et al.*, 2009), é uma opção mais segura para os atletas se eles utilizarem alimentos ou produtos que aproximem de uma refeição mista em vez de suplementos nutricionais convencionais (SOUSA *et al.*, 2013). Da mesma forma, a presença de outros nutrientes como antioxidantes, aminoácidos, vitaminas e minerais é uma vantagem quando se escolhe alimentos ou substituto parcial de refeições ao invés de suplementos concentrados ou isolados.

Assim, é possível apontar que o consumo de bebida achocolatada seja uma boa estratégia de suplementação pós-exercício, principalmente por atletas em ambientes de treino e em competição, pois tende a proporcionar uma recuperação orgânica mais rápida e eficaz.

Com as descobertas recentes do uso de bebidas achocolatadas nos EUA, Inglaterra e Nova Zelândia (i.e. *Chocolate Milk*, produto de perfil categórico diferente dos produtos brasileiros quanto a composição e leis sanitárias) visando recuperação (GILSON *et al.*, 2010; LUNN *et al.*, 2012; PRITCHETT *et al.*, 2012; SPACCAROTELLA *et al.*, 2011), acredita-se que poderá ocorrer em breve inovações de produtos, utilizando como base as diferentes formas de bebidas lácteas ou leites aromatizados de chocolate (i.e. fermentado, pasteurizado).

Entre os diversos estudos que utilizaram bebida achocolatada, demonstrados no Quadro 1, podem-se notar que uma maior atenção experimental tem sido dada para os protocolos em ergômetros de característica contínua (três estudos) e intermitente (três estudos), com treinamentos de futebol (dois estudos), treinamento contra resistência (um estudo) e protocolo de escalada (um estudo). A maioria (cinco estudos) utilizou monitoramento recuperativo por até 4 h, seguidos por 15-22 h (três estudos), 72 h (um estudo) e somente um estudo com característica crônica (10 dias).

**Quadro 1 – Estudos que utilizaram bebida achocolatada como ingestão nutricional recuperativa pós-exercício.**

Estudo	Amostra	Protocolo de indução a fadiga	Design, bebida experimental e protocolo de recuperação	Variáveis estudadas	Resultados e conclusão	Limitações
Wojcik <i>et al.</i> (2001)	Vinte e sete universitários (EUA) destreinados (27 ± 1 anos).	Trabalho contínuo em bicicleta para reduzir o glicogênio muscular 12 h antes da realização de 100 contrações excêntricas do quadríceps em 120% de 1-RM.	Delineamento em bloco casualizado. i) BAC Strawberry UHT (Nesquik® Ready-to-Drink, Nestlé Corp., San Francisco, CA; n=9) com baixo teor de GOR "1%" (0,875 g CHO/kg; 0,375 g PRO/kg); ii) BEC(CHO-E) (Gatorade, The Gatorade Co., Chicago, IL; n=8); iii) Placebo (Crystal Light, Kraft Foods Global, Inc. White Plains, NY; ; n=9) em quantidades isocalóricas (5Kcal/kg) oferecidas imediatamente e 2 h após protocolo de exercício de contração excêntrica de quadríceps. Proporção CHO-PRO de 2,33:1 na BAC. Recuperação monitorada por 72 h.	i) Síntese de glicogênio muscular; ii) CK; iii) IL-6, IL-1 e TNF; iv) insulina, glicose, testosterona, cortisol e GH; v) 3-methylhistidine (3MH) marcador de taxa fracional de remoção de proteína miofibrilar; vi) Percepção de dor muscular e vii) pique de torque isocinético.	Foram observados valores superiores de insulina para BAC e BEC(CHO-E) as 3h de recuperação. Tendência de inferioridade (p=0.08) para CK com a ingestão de BAC. Nenhuma diferença entre as bebidas nas demais variáveis estudadas.	Amostra de não treinados e nenhuma estratégia para homogeneização e estabilização do processo adaptativo. Nenhum controle de volume de ingestão com água <i>ad libitum</i> . Nenhuma abordagem quanto à blindagem de intervenção. Nenhuma tentativa de cegar quanto ao gosto das bebidas. Protocolo extenso (9 dias) e não usual para padronização de dieta.
Rankin <i>et al.</i> (2004)	Vinte e um universitários (EUA) destreinados (18 a 25 anos). Amostra final = 19.	Programa de treinamento de contra resistência durante 10 semanas com intensidade variando de 55% a 97% de 1RM. Houve progressão da intensidade com combinações de <i>sets</i> [3 a 4] e repetições [12 a 3].	Delineamento em bloco casualizado. i) BAC (The Kroger Co., Cincinnati, OH, USA) e ii) BEC(CHO-E) (Gatorade, The Gatorade Co., Chicago, IL) oferecidas em quantidades isocalóricas (5Kcal/kg) oferecidas imediatamente (5 min) após cada dia de treinamento para a composição dos dois grupos experimentais. Proporção CHO-PRO de 4,38:1 na BAC. Recuperação monitorada por 10 dias.	i) Força muscular; ii) Percentual de gordura corporal; iii) tecido Livre de Gordura (DEXA) e iv) hormônios IGF-1 e cortisol.	Resultados similares para as duas bebidas. Tendência superior para aumento da massa magra livre de gordura a favor da BAC.	Amostra de não treinados e nenhuma estratégia para homogeneização e estabilização do processo adaptativo. Nenhuma abordagem quanto à aleatorização da amostra sendo composta por critérios de ingestão calórica. Amostra com ingestão superior a IDR para proteínas. Nenhum controle de ingestão calórica no período experimental. <i>Single-blind</i> design e ausência de grupo controle e/ou placebo. Nenhuma tentativa de cegar quanto ao gosto das bebidas.
Karp <i>et al.</i> (2006)	Nove ciclistas universitários (EUA) altamente treinados (22 ± 2 anos).	Trabalho intermitente em bicicleta de 2 minutos de trabalho por dois minutos de recuperação, com intensidades decrescentes (90 até 50% P <sub>máx</sub> ) até que não se conseguisse mais manter a cadência de 85 a 100 RPM.	Delineamento em <i>cross-over</i> contrabalanceado. i) BAC (The Kroger Co., Cincinnati, OH, USA); ii) Repositor energético (Endurox R4, Pacific Health Laboratories, Woodbridge, NJ); iii) BEC(CHO-E) (Gatorade, The Gatorade Co., Chicago, IL) em quantidades isovolumétricas (1,0 g CHO/kg) oferecidas imediatamente e 2 h após protocolo de exercício.  Proporção CHO-PRO de 2,78:1 na BAC. Recuperação monitorada por 4 h.	i) Desempenho, FC e IPE ao pedalar a 70% VO <sub>2max</sub> até a exaustão após 4 h de recuperação; ii) Lactato medido às 2 h de recuperação; iii) MC e estado de hidratação; iv) medidas perceptivas de desconforto gastrointestinal e fadiga	Os tempos até exaustão e trabalho total foram significativamente maiores na situação BAC e BEC(CHO-E) não diferindo para a média de FC e índice de percepção de esforço.	Amostra pequena. Ausência de tratamento controle e/ou placebo. Disparidade de ingestão energética entre o BAC/repositor energético e BEC(CHO-E). Nenhuma tentativa de cegar quanto ao gosto das bebidas.

Quadro 1 – Continuação.

Pritchett <i>et al.</i> (2009)	Dez ciclistas e triatletas de nível regional (EUA; 27 ± 8 anos).	No primeiro dia de experimento foi realizado exercício em ciclo ergômetro em alta intensidade por 50 minutos. Um dia depois (15 a 18 h) compareceram novamente para exercício até fadiga voluntária em carga única a 85% VO2max no ciclo ergômetro.	Delineamento em <i>cross-over</i> contrabalanceado.i) BAC (The Kroger Co., Cincinnati, OH, USA); ii) bebida para recuperação de atletas comercial sabor chocolate (Endurox R4, Pacific Health Laboratories, Woodbridge, NJ) em quantidades isocalóricas (1.0 g CHO/kg) e isovolumétricas oferecidas imediatamente após e 2 h depois no primeiro dia de exercício. Houve pareamento isocalórico por CHO e conteúdo PRO. Proporção CHO-PRO de 2,78:1 na BAC. Recuperação monitorada através da performance entre as 15-18 h.	i) CK; ii) percepção de dor muscular (VAS); performance ao pedalar em carga única a 85% VO2max até fadiga voluntária; iii) conforto gastrointestinal e iv) palatabilidade	Nenhuma diferença para o tempo de exaustão e percepção de dor muscular. BAC reduziu o aumento de CK significativamente do primeiro para o segundo dia antes de realização do segundo protocolo de exercício até a fadiga voluntária. Problemas relatados a de desconforto gastrointestinal com a bebida de recuperação. Maior palatabilidade a favor da BAC.	Nenhum controle de volume de ingestão com água <i>ad libitum</i> . Nenhuma tentativa de cegar quanto ao gosto das bebidas. Limitações no protocolo quanto à indução de danos musculares.
Thomas <i>et al.</i> (2009)	Nove ciclistas treinados (25 ± 8 anos).	Trabalho intermitente de 2 minutos de trabalho por dois de recuperação (50% Pmáx), com intensidades decrescentes (90 até 60% Pmáx) até que não conseguia mais manter a cadencia em ciclo ergômetro.	Delineamento em <i>cross-over</i> contrabalanceado.i) BAC (Mars Refuel, UK); ii) Repositor energético (Endurox R4, Pacific Health Laboratories, Woodbridge, NJ); iii) BEC(CHO-E) (Gatorade, The Gatorade Co., Chicago, IL). Houve quantidades isovolumétricas equivalentes ao oferecimento de 1.0 g CHO/kg no repositorenergético. Quantidade isocalórica foi estabelecida entre essa última bebida e BAC. A ingestão ocorreu imediatamente e 2 h após protocolo de exercício. Proporção CHO-PRO de 4,35:1 na BAC. Recuperação monitorada por 4 h.	i) Lactato; ii) MC; iii) bioimpedância elétrica; iv) <i>endurance</i> capacidade a 70% Pmáx; v) percepção de sensações esforço (IPE), de humor e apetite.	Nenhuma diferença entre Lactato, FC, IPE e MC. Maior capacidade de <i>endurance</i> (tempo até a exaustão) para a BAC. Tendência de saciedade maior e menor sensação de fome com BAC.	Ausência de tratamento controle. Disparidade de ingestão energética entre o BAC/repositor energético e BEC(CHO-E). Nenhuma tentativa de cegar quanto ao gosto das bebidas. Nenhum controle de volume de ingestão com água <i>ad libitum</i> . Limitações no protocolo quanto à indução de danos musculares.
Gilson <i>et al.</i> (2010)	Vinte e dois jogadores de futebol da 1 Divisão NCAA (19 ± 0,3 anos). Treze jogadores completaram o estudo.	Em duas ocasiões, os indivíduos realizaram uma semana de treinamento normal (inter temporada) seguida imediatamente por quatro dias de maior duração do treinamento (ITD). O período de ITD foi concebido para aumentar a duração total do treinamento por > 25% durante quatro dias consecutivos de treinamento.	Delineamento em <i>cross-over</i> contrabalanceado.i) BAC (Shenandoah's Pride, Virginia, USA; 504 kcal; 84 g CHO; 28 g Pro; 7 g GOR; 672mL) <i>versus</i> ii) uma bebida de recuperação a base de CHO (504 kcal; 122 g CHO; 2 g GOR; 672mL). A ingestão ocorreu imediatamente após os treinamentos em ITD (4 dias). Proporção CHO-PRO de 3,75:1 na BAC. Recuperação monitorada por aproximadamente 18-22 h após treino do dia anterior durante o ITD.	i) Percepção de dores musculares; ii) agilidade ( <i>T-drill</i> ); iii) salto vertical; iv) Contração Máxima Voluntária (CMV); v) Avaliação de fadiga Mental e Física; vi) dano muscular (CK e Mb).	Foram observados valores inferiores de CK com a ingestão de BAC. Nenhuma diferença de desempenho foi detectada entre as duas bebidas para os testes <i>T-drill</i> , MCV, dor muscular, avaliação de fadiga mental e física e salto vertical.	Ausência de tratamento controle e/ou placebo. Protocolo de indução de fadiga não validado. Nenhuma tentativa de cegar quanto ao gosto das bebidas.
Spaccarotella <i>et al.</i> (2011)	Treze atletas universitários de futebol (8 mulheres e 5 homens; 19,5 ± 1,1 anos)	A intervenção ocorreu em dois dias durante o meio da pré-temporada separados por 2 dias <i>washout</i> . Nos dias de intervenção, os indivíduos completaram suas práticas regulares de treinamentos típicos do futebol na manhã e receberam as bebidas experimentais. Na parte da tarde houve, após treinamento regular, a aplicação do <i>20-m shuttle run test</i> até a fadiga (incapacidade para manter velocidades de corrida).	Delineamento em <i>cross-over</i> contrabalanceado.i) BAC (Ultimate Chocolate Milk, Tuscan Dairy, Union, NJ, USA) <i>versus</i> ii) uma BEC(CHO-E) (CHO-Eletrólitos; The Gatorade Company, Chicago, IL, USA). Entre as práticas da manhã e da tarde, os atletas receberam uma quantidade de BAC (1g CHO por quilograma de MC), ou um volume igual de CHO-Eletrólitos. A ingestão ocorreu imediatamente e 2 h após os treinamentos. Proporção CHO-PRO de 3,37:1 na BAC. Recuperação monitorada nas sessões de treinos da tarde após intervenção nutricional ao fim da sessão da manhã.	i) Percepção da sensação de esforço (IPE); ii) Tempo de fadiga no <i>20-m shuttle run test</i> .	Uma tendência no acréscimo de tempo de execução em teste de <i>Shuttle run</i> 20 m para os homens foi observada (p=0.03). Nenhuma diferença foi notada no IPE entre as bebidas.	Protocolo de indução de fadiga não validado. Ausência de tratamento controle e/ou placebo. Curto período de <i>washout</i> (2 dias). Disparidade de ingestão energética entre o BAC e BEC(CHO-E).

Quadro 1 – Continuação.

Ferguson-stegall <i>et al.</i> (2011)	Dez ciclistas e triatletas treinados (5 homens e 5 mulheres; 31.8 ± 1.6 anos)	Os atletas exercitaram por 1,5h a 70% VO <sub>2max</sub> seguido de intervalos alternados de 1 minuto a 45% e um minuto a 90% VO <sub>2max</sub> durante 10 minutos. Os indivíduos receberam 250 mL de água a intervalos de 15 minutos durante o passeio, e ventiladores de piso para circular o ar ao longo do indivíduo para minimizar o stress térmico. Após o período de recuperação, os indivíduos completaram 40 km o mais rápido possível.	Delineamento em <i>cross-over</i> contrabalanceado. i) BAC UHT com leite bovino, suco de cana de açúcar e cocoa orgânicos (2% GOR; Kirkland Organic Low-Fat, Costco Inc., Issaquah, WA, USA) <i>versus</i> ii) B(CHO) (dextrose e óleo de canola) e iii) placebo (água com Splenda não calórica e sabor Kool Aid). Houve pareamento isocalórico (BAC UHT= 1,9 g de CHO, 0,6 g PRO e 0,3 g de GOR por kg de MC; CHO= 2,5 g CHO e 0,3 g de GOR), porém por faixas de MC (<63,6kg; entre 63,6kg e 77,2kg; >77,2kg). A ingestão ocorreu imediatamente e 2 h após o protocolo de exercício. Proporção CHO-PRO de 3,11:1 na BAC UHT. Recuperação monitorada por 4 h.	i) Síntese de glicogênio muscular; ii) Mb, CK; iii) IL-6, IL-8, IL-10, IL-1ra, TNF; iv) insulina, glicose, lactato, ácidos graxos livres (AGL), glicerol, cortisol; v) marcadores de fosforilação para síntese de PRO; vi) desempenho (tempo) na prova de 40 Km.	Foi observado tempo de execução de 40 km menor com BAC UHT em relação a CHO e PLA. A síntese de glicogênio muscular foi maior com BAC UHT e no CHO do que no PLA. Além disso, foi notado que a fosforilação da <i>mTOR</i> , <i>rpS6</i> e <i>FOXO3A</i> foram maiores durante a recuperação com BAC UHT e CHO em relação a PLA. Insulina foi maior para BAC UHT e CHO a 45 minutos da recuperação. Nenhuma diferença detectada para cortisol, Mb, CK, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1ra, TNF entre os tratamentos.	Limitações no protocolo quanto à indução de danos musculares. Nenhum controle de volume de ingestão com água <i>ad libitum</i> . Não individualização da quantidade da suplementação. Nenhuma tentativa de cegar quanto ao gosto das bebidas.
Lunn <i>et al.</i> (2012)	Corredores masculinos. Estudo 1) FSR e glicogênio muscular (n=8; 23.7 ± 1.6 anos) Estudo 2) WBPTO e teste de exaustão em exercício (n =6; 21.3 ± 1.2 anos)	A intervenção ocorreu em dois dias separados por uma semana com estresse em um exercício de 45 minutos de corrida em esteira a 65% VO <sub>2pico</sub> seguido por um período de recuperação de 3h, durante o qual os indivíduos consumiram uma das duas bebidas experimentais.	Delineamento em bloco casualizado. i) BAC UHT (Nesquik® Ready-to-Drink, Société des Produits Nestlé S.A., Vevey, Switzerland) com baixo teor de GOR "1%" (480mL; 16g PRO; 58g CHO; kcal total=296) <i>versus</i> ii) B(CHO) isocalórica não nitrogenada preparadas em água engarrafada (480mL; 74g CHO; kcal total=296). A ingestão ocorreu imediatamente após o protocolo de exercício. Proporção CHO-PRO de 3,62:1 na BAC UHT. Recuperação monitorada por 3 h.	i) marcadores cinéticos celulares (FSR) de reciclagem de proteínas musculares; ii) <i>turnover</i> de proteína corporal; iii) Glicogênio muscular; iv) Desempenho (tempo) até exaustão voluntária na esteira (VO <sub>2pico</sub> ).	Maiores taxas de fosforilação de eIF4E-BP1, FOXO3a e menor atividade da caspase-3; maior sinalização de insulina (83% maior no plasma; 30 minutos após ingestão) e aumento do tempo em exercício (23%) em prova de resistência até exaustão voluntária na esteira com consumo de BAC. Não foram observados diferenças entre as bebidas na resíntese de glicogênio muscular, mas BAC foi eficaz para a manutenção em exercício subsequente até exaustão.	Limitações no protocolo quanto à indução de danos musculares e depleção de glicogênio muscular. Nenhuma tentativa de cegar quanto ao gosto das bebidas. Single-blind design e ausência de tratamento controle e/ou placebo. Protocolo extenso (14 dias) e não usual para padronização de dieta. <i>Time course</i> recuperativo curto. Nenhum controle de volume de ingestão com água <i>ad libitum</i> . Não individualização da quantidade da suplementação.
Potter <i>et al.</i> (2015)	Dez alpinistas do sexo masculino (22 ± 1 ano)	Subida em escalada Tredwall (Brewer Ledge M6) até a exaustão voluntária. O protocolo de exercício foi repetido 24 h após a subida inicial. A segunda condição foi completada 7 dias mais tarde.	Delineamento em <i>cross-over</i> contrabalanceado. i) BAC UHT (For Goodness Shakes) com LB desnatado (94%) (500mL; 17g PRO; 52g CHO; kcal total=330); ii) Água. Os participantes consumiram 20 minutos após a subida e depois novamente com a refeição da noite. Proporção CHO-PRO de 3:1 na BAC UHT. Recuperação monitorada em 24 h após protocolo de escalada do dia anterior.	i) frequência cardíaca; ii) taxa de percepção de esforço (RPE); iii) lactato sanguíneo; iv) dor muscular; v) medidas de desempenho na escalada (duração e distância da subida).	Desempenho melhorado na escalada com BAC (distância e tempo). Não houve diferenças na frequência cardíaca ou RPE. Escores de dor muscular foram menores três dias após o exercício com BAC.	Protocolo não validado. Limitações no protocolo quanto à indução de danos musculares e depleção de glicogênio muscular. Nenhuma tentativa de cegar quanto ao gosto das bebidas. Nenhum monitoramento de modulação inflamatório e de dano muscular.

Fonte: dados da pesquisa

Nota: BEC(CHO-E)= Bebida Esportiva Comercial contendo Carboidratos e Eletrólitos Pmáx: Power a Vo2máx; FSR: fractional synthetic rat; WBPTO: influence postexercise whole-body protein turnover; BAC: bebida achocolatada comercial.

Entre as principais limitações experimentais é possível destacar o tamanho amostral limitado, ausência de tratamento controle, disparidade de ingestão energética entre bebidas achocolatadas e outras bebidas comerciais usadas como controle experimental como, por exemplo, os repositores energéticos e BEC(CHO-E). As diferenças no tipo de carboidrato e a conseqüente diferença na taxa de absorção, correspondem a sérias limitações de alguns estudos que utilizaram tais bebidas em comparação. Por exemplo, a maioria das BEC(CHO-E) contém 6% de glicose e 4% de sacarose, o que é diferente das bebidas achocolatadas, e deve ser considerado ainda que a última tenha presença de galactose.

Essas características de composição e cinética absorptiva podem contribuir para diferentes taxas em processos fisiológicos de recuperação. Por exemplo, a oxidação da glicose exógena durante o exercício tem um máximo de 1,0-1,1 g/min, enquanto que a utilização de galactose é limitada a ~ 0,4 g/min (JEUKENDRUP *et al.*, 2000). Assim é possível que a galactose possa retardar o processo de oxidação e, assim, se ingerida num mix de carboidratos, colaborar como fonte de energia para sustentar a síntese de glicogênio durante a recuperação.

Também pode ser considerado como limitação o fato de não ocorrer nenhuma tentativa de cegar os tratamentos com as bebidas quanto ao gosto, nenhum controle ou pareamento do volume de ingestão das mesmas em relação às outras bebidas placebos ou controle, e com ingestão de água *ad libitum* durante os procedimentos experimentais. Outra importante limitação refere-se ao protocolo adotado para indução de danos musculares e depleção de glicogênio muscular, podendo ser considerado de leve a moderado para a maioria dos estudos, o que compromete generalizações da aplicabilidade das bebidas achocolatadas para contextos esportivos realísticos, onde a necessidade de modulação recuperativa possa ser ainda maior.

Os resultados indicam efeitos positivos para a utilização de bebidas achocolatadas, como a remodelação de tecido muscular e aumento da massa magra, bem como uma tendência para diminuir os marcadores de dano muscular e melhor desempenho. Além disso, houve apontamento de maior palatabilidade e saciedade a



favor da bebida achocolatada. Essa perspectiva de uso de bebidas achocolatadas poderá nortear formulações especiais objetivando a recuperação de atletas.

## **2.8. Lacunas para inovação em bebidas achocolatadas aplicada ao esporte e atividade física**

Bebidas achocolatadas são alimentos consumidos por pessoas de todas as idades e podem ser encontrados em todo o mundo. As suas características sensoriais e nutricionais, assim como sua conveniência e praticidade, fazem com que o produto seja bem aceito pelo consumidor (PRITCHETT *et al.*, 2012). Nesse sentido, como esses produtos vêm sendo amplamente consumidos e muitas indústrias têm o produzido, fazendo com que haja preços competitivos e oferta de grande variedade de produtos ao consumidor. O processamento, os ingredientes e as concentrações utilizadas não são os mesmos, fazendo com que ocorra grande variação nas suas composições nutricionais, tais como teor de GOR, PRO, CHO, teobromina e outros alcaloides (EDUARDO *et al.*, 2004).

Os preços cobrados fazem de produtos lácteos da linha *premium* um agregador de valor lucrativo para os fabricantes (MURO URISTA *et al.*, 2011). Desta forma, atualmente há um grande interesse na indústria de alimentos no desenvolvimento de novos produtos que ofereçam benefícios funcionais para a saúde do consumidor (KANEKANIAN, 2014).

Produtos lácteos são fundamentais para o setor alimentício, pois os mesmos são bons sistemas de entrega de alimentos funcionais (iogurtes e bebidas lácteas) e também são ricos em compostos que podem ser extraídos e utilizados como ingredientes funcionais em outros tipos de alimentos (KANEKANIAN, 2014).

Estudos sobre os benefícios do consumo de alimentos probióticos e prebióticos têm evidenciado alguns benefícios envolvendo a ingestão de produtos com algumas cepas microbianas específicas (PACHECO *et al.*, 2005), inclusive propositadas a disparar uma resposta específica após exercício físico (MORATO *et al.*, 2015).

O interesse de P&D em bebida achocolatada nasce das evidências de alguns estudos sobre as diversas aplicabilidades e as propriedades nutritivas de produtos à

base de leite bovino, principalmente dando foco na utilização de PRO como ingredientes funcionais (KANEKANIAN, 2014; MORATO *et al.*, 2015; MURO URISTA *et al.*, 2011; SHIBY *et al.*, 2013). Como resultado, existem hoje no mercado nacional e internacional, produtos lácteos contendo ingredientes com apelo funcional por conter peptídeos bioativos obtidos por fracionamento ou isolamento a partir das PRO do colostro ou do leite por diferentes técnicas. De tais processos de separação podemos encontrar a forma isolada, por exemplo, caseínas e suas subclasses, lactoferrina, imunoglobulinas, fatores de crescimento e PRO do soro (DUARTE *et al.*, 2011; HAUG *et al.*, 2007; KORHONEN *et al.*, 2007; RUSU *et al.*, 2010). Os resultados reportados após uso de PRO do leite bovino pós-exercício físico em condições controladas também são animadores na perspectiva do crescimento muscular (FARUP *et al.*, 2013; KANDA *et al.*, 2012; LOLLO *et al.*, 2011; LUIKING *et al.*, 2014; MORATO *et al.*, 2013; MORIFUJI *et al.*, 2009; MORIFUJI *et al.*, 2010).

Uma das preocupações iniciais do setor lácteo é fornecer formulações de leite e derivados com propriedade hipoalergênica, principalmente livre de lactose, sendo está uma importante limitação da popularização e incorporação de leite e produtos lácteos nas dietas pelo fato de boa parcela da população mundial sofrer de intolerância à lactose (ODEDRA, 2015). Por exemplo, a intolerância à lactose é prevalente no Brasil diferentemente para as etnias, sendo brancos: 57%; crianças índias Terenas: 89,3%; japoneses: 100%; mulatos: 57% e negros: 80% (MATTAR *et al.*, 2010).

É bem sabido que a produção de *lactase* pode persistir para a vida adulta em algumas pessoas, mas não em todos (INGRAM *et al.*, 2009). Por isso a alergia ao leite de vaca é comum em crianças e rara em adultos. As características clínicas da alergia ao leite de vaca são variadas e incluem anafilaxia, sintomas gastrointestinais e dermatite atópica (ODEDRA, 2015). Na maioria dos mamíferos, a atividade da enzima *lactase* diminui na parede intestinal após o desmame, caracterizando a hipolactasia primária que provoca sintomas de intolerância à lactose (INGRAM *et al.*, 2009). A maioria das pessoas intolerantes à lactose pode ingerir 12 g/d de lactose (equivalente a um copo de leite) sem apresentar sintomas adversos (VONK *et al.*, 2003).

Entre os sintomas da intolerância à lactose, estão de distensão, flatulência, dor abdominal e diarreia que variam em intensidade dos agravos dependendo da quantidade de lactose ingerida, aumentam com o passar da idade (SZILAGYI, 2015). Os fatores responsáveis por esta variabilidade incluem a osmolalidade e conteúdo de GOR do alimento no qual o açúcar é ingerido, o esvaziamento gástrico, a sensibilidade à distensão abdominal produzida pela carga osmótica da lactose não hidrolisada no intestino delgado superior, o trânsito intestinal e a resposta do cólon à carga de carboidrato (AROLA *et al.*, 1994; MATTAR *et al.*, 2010). De maneira geral, os alimentos com alta osmolalidade e conteúdo de GOR diminuem o esvaziamento gástrico e reduzem a gravidade dos sintomas induzidos pela lactose (MATTAR *et al.*, 2010).

Alguns autores também acreditam que a intolerância à lactose seja responsável por diversos sintomas sistêmicos, como dores de cabeça e vertigens, perda de concentração, dificuldade de memória de curto prazo, dores musculares e articulares, cansaço intenso, alergias diversas, arritmia cardíaca, úlceras orais, dor de garganta e aumento da frequência de micção (CHAUDHURI, 2000; ODEDRA, 2015; SZILAGYI, 2015).

A exclusão total e definitiva da lactose da dieta deve ser evitada, pois pode acarretar prejuízo nutricional de cálcio, fósforo e vitaminas, podendo estar associada com diminuição da densidade mineral óssea e fraturas (LAAKSONEN *et al.*, 2009; MADRY *et al.*, 2012). Portanto, saídas tecnológicas com foco em P&D tem ofertado produtos com propriedades específicas para pessoas alérgicas ao PRO do leite e a intolerantes a lactose. Por exemplo, incorporada durante processo produtivo, a enzima *lactase* hidrolisa a lactose em glicose e galactose que são absorvidas pela mucosa intestinal. A glicose entra para o *pool* de glicose do intestino, e a galactose é metabolizada no fígado para ser convertida em glicose, e entrar nesse *pool*. Caso a galactose não seja metabolizada no fígado, o é pelos eritrócitos, ou é eliminada na urina (AROLA *et al.*, 1994).

A doença celíaca é uma desordem auto-imune que ocorre em indivíduos geneticamente suscetíveis em quem a ingestão de glúten na dieta provoca indução de inflamação na mucosa intestinal (ALMEIDA *et al.*, 2012). Além disso, podem ocorrer complicações relacionadas as restrições alimentares como baixa estatura em

crianças, anemia, hipoplasia do esmalte, constipação, manifestação neurológica e osteoporose (SDEPANIAN *et al.*, 1999).

Para as Ciências do Esporte pode ser de grande interesse o uso de bebidas achocolatadas como potencial suplemento alimentar efetivo no período de recuperação. Além da formulação hipoalérgica, a adição de produto(s) ou ingredientes(s) alimentícios(s) ou suplementação de interesse com balanço de massa particular, dentro do que se permitem as normativas para formulação, aditivos tecnológicos e critérios de ordem sanitária e de conservação, podem originar novos produtos com base em inovação, ou mesmo o melhoramento funcional através da chamada inovação tecnológica incremental (TIDD *et al.*, 2015).

Por exemplo, a adição de ingredientes como o CPS ou IPS nas bebidas achocolatadas podem ter efeitos significativos na melhora da biodisponibilidade das mesmas (MORIFUJI *et al.*, 2009; MORIFUJI *et al.*, 2010). Tal perspectiva surge apoiada em estudos sobre os IPS obtidos a partir do soro do leite bovino mostrando que estes, por conter peptídeos de pequeno tamanho, como os dipeptídeos e os tripeptídeos, são absorvidos em maior velocidade no lúmen intestinal e em órgãos periféricos como os membros inferiores, em relação aos aminoácidos livres e às PRO intactas do soro. Sendo assim os IPS são mais eficientes em suas atividades fisiológicas (HAUG *et al.*, 2007; LÓPEZ-EXPÓSITO *et al.*, 2008) abrindo possibilidades de uso na suplementação alimentar de diversos produtos.

Processamentos de interesse do leite bovino na indústria de laticínios também podem fazer com que produtos derivados contenham níveis muito baixos de GOR total e de GOR saturada, permitindo, assim, a formulação de alimentos com concentrações desejadas de GOR, além de fornecer os tipos de GOR mais benéficos à saúde cardiovascular como os ácidos graxos monoinsaturados (KANEKANIAN, 2014; MORATO *et al.*, 2015). Um exemplo disso é o estudo de Fonollá *et al.* (2009) que observaram benefícios como aumento significativo no soro folato (58%) e na *High Density Lipoproteins* (HDL; 4%), com diminuição nos triacilgliceróis plasmáticos (10%), colesterol total (4%), e na *Low Density Lipoproteins* (LDL; 6%) após consumo (500 mL dia; durante um ano) de leite integral UHT comercialmente disponível (Puleva Omega 3<sup>®</sup>; Puleva Food S.A, Granada,

Espanha) contendo pequenas quantidades de ácido eicosapentaenoico e docosaenoico, ácido oleico, vitaminas A, B6, D, E e ácido fólico.

Outras evidências têm apontado o papel fisiológico e os efeitos benéficos de diversos constituintes lácteos, como PRO, peptídeos bioativos, ácido linoléico conjugado (CLA), ácidos graxos ômega 3, vitamina D e cálcio na saúde (KANEKANIAN, 2014). Estes componentes têm mostrado ação anticancerígena, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, hipocolesterolêmica, imunomoduladora e antimicrobiana (MURO URISTA *et al.*, 2011; SHIBY *et al.*, 2013). Alguns produtos contendo suplementações de peptídeos bioativos já foram lançados e são comercializados internacionalmente. Entre os exemplos desses produtos, pode ser citado o Calpis® para redução da pressão arterial; Biopure-GMP® para prevenção da cárie dentária, proteção contra vírus e bactérias; Capolac® para melhorar a absorção de minerais; PeptoPro® para melhorar o desempenho atlético de recuperação muscular; Vivinal Alpha® para relaxamento e melhora do sono; e Recaldent® para prevenção da cárie (KANEKANIAN, 2014).

Entre as diversas possibilidades de inovação, um importante apontamento para formulação de bebidas e compostos visando acelerar mecanismos fisiológicos de recuperação foi dado por diversos estudos utilizando suplementação com hidrolisados de leucina em combinação com *blends* proteicos tendo demonstrado ganho/e ou manutenção de massa muscular magra através do aumento da taxa sintético fracionário (FSR) da proteína miofibrilar esquelética (CHURCHWARD-VENNE *et al.*, 2014; KATO *et al.*, 2015; KOOPMAN *et al.*, 2005; ROWLANDS *et al.*, 2015). Além disso, evidências de combinação de *blends* proteicos, hidrolisados de leucina e CHO ampliaram a resposta insulínica (JENTJENS *et al.*, 2001; KAASTRA *et al.*, 2006; KOOPMAN *et al.*, 2005; ROWLANDS *et al.*, 2015) ou a estocagem de glicogênio muscular associada à hiperinsulinemia (DETKO *et al.*, 2013; JENTJENS *et al.*, 2001; KAASTRA *et al.*, 2006; VAN LOON *et al.*, 2000a; VAN LOON *et al.*, 2000b) e ação imunomoduladora de leucócitos, neutrófilos (NELSON *et al.*, 2013).

Outra afirmação favorável da suplementação é dada por Nelson *et al.* (2013) especulando a hipótese da efetividade da junção da *whey protein* e leucina, sendo observado que uma proposta leucina com PRO (LEU-PRO) aumentou a concentração de AA no plasma (glicina, arginina, glutamina, leucina) e diminuiu o

cortisol antes do exercício no sexto dia de experimentação. Outro estudo desse grupo de pesquisadores (NELSON *et al.*, 2012) observaram redução na CK (21-25%) após suplementação com uma bebida LEU-PRO durante seis dias de protocolos de exercício intensos (~3 h; 50 a 90%  $W_{max}$ ).

Uma justificativa metabólica de ação direta para uso de leucina como suplementação pós-exercícios é que a secreção de insulina induzida é mediada pela sua descarboxilação oxidativa, bem como pela sua capacidade para ativar alostericamente a *glutamato desidrogenase* (VETTERLI *et al.*, 2012). Tanto a produção de acetil-coenzima A e  $\alpha$ -cetoglutarato são necessárias para que a leucina estimule a atividade mitocondrial nas células  $\beta$  no pâncreas (VETTERLI *et al.*, 2012). Isso subsequentemente leva a exocitose da insulina, podendo ainda esse processo desencadear a ativação da *mTOR* (XU *et al.*, 2001), importante sinalizador de diversos processos celulares como remodelação tecidual por exemplo, fenômeno também desejado em recuperação de atletas.

Metabolicamente, a insulina pode ser considerada um hormônio anabólico que possui efeito sinérgico à ingestão de leucina no controle da síntese proteica muscular. Porém, vale ressaltar que a insulina de modo isolado não é suficiente para estimular a síntese proteica muscular no estado pós-absortivo, sendo necessária a ingestão de proteínas ou de aminoácidos para estimular as taxas de síntese proteica (SALTIEL, 2016).

Outras evidências de suplementação com leucina tem demonstrado vantagens metabólicas e fisiológicas que se inicia com sua rápida concentrações sérica logo após a sua ingestão (BURD *et al.*, 2012; DANGIN *et al.*, 2001; NELSON *et al.*, 2013; PENNINGGS *et al.*, 2011; REIDY *et al.*, 2013; TIPTON *et al.*, 2004), colaborando assim para toda cascata anabólica de tecido muscular (BORGENVIK *et al.*, 2012; BURD *et al.*, 2012; CHURCHWARD-VENNE *et al.*, 2012; FARUP *et al.*, 2013; KANDA *et al.*, 2013; REIDY *et al.*, 2013; REITELSEDER *et al.*, 2014), de tendão (FARUP *et al.*, 2013), e aumento da capacidade antioxidante (BOUNOUS *et al.*, 1989; BOUNOUS *et al.*, 1991).

Na perspectiva de desenvolvimento de novos produtos voltados a alimentação de atletas, suplementação particular visando modificar o perfil aminoacídico de bebida

achocolatada, por exemplo, pode abrir possibilidades de seu uso voltada à prática de atividade física e utilização de produtos com formulações especiais para casos de sarcopenia, osteoporose ou osteopenia. Na terceira idade, principalmente, a presença de altas doses de aminoácidos poderá auxiliar na dificuldade de síntese de tecido muscular (LUIKING *et al.*, 2014) ou absorção/utilização do cálcio (GONZÁLEZ SÁNCHEZ *et al.*, 2012).

É crescente o interesse do efeito causado pela ingestão de leite e derivados e modulação da fadiga do SNC (CHOI *et al.*, 2013). Isso abre uma oportunidade para manipular o oferecimento energético ao CNS através de mudanças na dieta ou suplementação com nutrientes específicos, incluindo AA (ACR, tirosina), carboidrato e cafeína (MEEUSEN, 2014). Além disso, a  $\alpha$ -lactalbumina, que é constituinte do soro do leite bovino, possui elevado teor de triptofano em sua estrutura e autores atribuíram efeitos comportamentais da ingestão dessa proteína no apetite, na saciedade, no humor, na percepção da dor e no ciclo de dormir e acordar (KANEKANIAN, 2014; SGARBIERI, 2004).

O alto conteúdo fenólico do cacau e chocolates rende a estes alimentos um interesse particular dos pontos de vista nutricional e farmacológico, tornando crescente o interesse nas atividades biológicas dos compostos fenólicos a eles associados (MASTROIACOVO *et al.*, 2015; NABAVI *et al.*, 2015). Desta forma, existe uma especulação de que dieta rica em polifenóis (presentes no cacau) poderia proteger o sistema cardiovascular devido à ação antioxidante direta por proteger os constituintes celulares dos danos oxidativos ou devido à ação anti-trombótica (LATIF, 2013; NABAVI *et al.*, 2015). Além disso, tem sido levantadas possibilidades quanto ao uso de flavonoides para melhorar atividades cognitivas (MASTROIACOVO *et al.*, 2015; MEEUSEN, 2014).

Sendo assim, bebida achocolatada apresenta-se com potencial para uso como suplementação alimentar pós-exercício objetivando a recuperação de atletas. Investigações objetivando composições mais específica para atletas, assim como melhorias no processo produtivo que favoreça a biodisponibilidade de seus nutrientes, poderão agregar valor a esse produto e o mesmo ser uma opção frente às bebidas esportivas convencionais utilizadas no período recuperativo.

### **3 HIPÓTESES**

#### **3.1. Geral**

A hipótese geral é de que uma formulação experimental de bebida achocolatada suplementada com L-leucina (BALL) promoveria um ambiente anabólico favorável, principalmente via resposta hiperinsulínica, desempenhando, então, importante papel no processo recuperativo pós-exercício. Nesse sentido, acreditou-se que o oferecimento da BALL durante o período de recuperação modularia respostas imunes, hormonais, de dano muscular e perceptivas à dor muscular e recuperação, benéficas ao processo recuperativo requeridos no futebol. Espera-se que essa matriz de bebida achocolatada também permita retenção mais eficaz de fluidos perdidos no exercício, pela presença de proteínas e seu efeito retentor hídrico. Pela característica sensorial esperada, comum a esse produto, acredita-se que a BALL terá bom escore de aceitação e não causará efeito de desconforto gástrico.

#### **3.2. Hipóteses estatísticas**

##### **Hipótese nula ( $H_0$ )**

Não há diferença na escala de aceitação e conforto gastrointestinal e nas variáveis de monitoramento recuperativo pós-simulação de partida entre BALL e bebida controle.

##### **Hipótese alternativa ( $H_1$ )**

Existe diferença na escala de aceitação e conforto gastrointestinal e nas variáveis de monitoramento recuperativo pós-simulação de partida entre BALL e bebida controle.



## **4 MATERIAIS E MÉTODO**

### **4.1. Cuidados Éticos**

O procedimento experimental proposto neste estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE:32153514.5.0000.5149), sendo aprovado com número do parecer: 799.259 e data da Relatoria: 19/09/2014, ANEXO 1). Todos os aspectos relacionados à biossegurança foram observados antes, durante e após as situações experimentais. Após realização dos experimentos, relatório final será encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa no final do estudo.

Diretrizes institucionais, apoiadas na Academia Brasileira de Ciências (ABC) e no Relatório da Comissão de Integridade de Pesquisa do CNPq para a integridade científica, foram cumpridas respeitando princípios e orientações para a condução da pesquisa científica e a comunicação de seus resultados.

### **4.2. Amostra de voluntários**

A amostragem foi não probabilística sendo do tipo por conveniência. Tal abordagem foi seguida para permitir acessibilidade ao pesquisador, atendimento de custo e logística (HULLEY *et al.*, 2013). Dessa forma, a amostra foi obtida na própria Universidade, seguindo triagem dos critérios de inclusão e exclusão entre integrantes do time de futebol da Liga Atlético Universitária. Considerou-se como critérios de inclusão para seleção de voluntários os fatores: sexo masculino, faixa etária entre 18 e 30 anos, com experiência prévia em treinamento sistematizado de futebol por pelo menos cinco (5) anos, serem jogadores de linha e que estivessem competindo regularmente nos últimos três meses. Todos deveriam ser considerados saudáveis na avaliação do estado de saúde prévio, aptos para a prática de exercícios físicos e não apresentar fator de exclusão (ver seção abaixo).

O tamanho da amostra foi determinado em G\*Power (versão 3.1.7; Franz Faul, Universität Kiel, Alemanha). As seguintes especificações do cálculo foram:  $\alpha = 0,05$ ;  $(1-\beta)=0,8$ ; tamanho do efeito  $f=0,4$ ; família test= teste F e teste estatístico= medidas ANOVA repetidas, inter e entre-sujeitos, com interação (2X3; 2x4; 2x5). O tamanho

da amostra mínima estimada de acordo com estas especificações determinou composição de 10 a 12 indivíduos para cada grupo experimental.

#### **4.3. Avaliação do estado de saúde e critérios de inclusão e exclusão de voluntários**

Todos os voluntários foram avaliados quanto à aptidão para participação na pesquisa, sendo considerados aptos quando todas as perguntas eram classificadas como “não” a um questionário de prontidão para a prática de atividade física – PAR-Q (CHISHOLM *et al.*, 1975), (ANEXO 2).

Todos os voluntários estavam familiarizados com a maioria dos procedimentos experimentais do presente estudo, devido ao fato de que todos os protocolos de teste e treinamento já fazem parte da rotina do condicionamento atlético e da avaliação dos mesmos dentro da proposta de treinamentos da Liga Universitária. Isto proporciona menor variação nas sensações de esforço, procedimentos de aprendizagem e habilidade motora.

Os critérios de exclusão foram: uso de medicamentos, ser fumante, utilizar suplementos alimentares no último mês, ter alergia a leite, estar lesionado e/ou doente no último mês antes do início do estudo, assim como indisposto ou com alegação de problemas de ordem médica durante o estudo.

#### **4.4. Delineamento experimental**

Após elegibilidade, voluntários visitaram o Laboratório de Performance Humana (LAPEH) da Universidade Federal de Viçosa para medidas de massa corporal (MC), estatura, percentual de gordura corporal e mensuração da capacidade de resistência especial para futebolistas através do *Yo-Yo Intermittent Recovery Test* (Yo-Yo IR Test) visando caracterização da amostra. A massa corporal medida foi utilizada como referência para a etapa de envase individualizado. Também nessas visitas ao laboratório, os voluntários foram familiarizados com o protocolo indução de fadiga através da simulação da demanda metabólica e mecânica do futebol (*soccer-specific*

*aerobic field test* adaptado, SAFT90+, descrito na seção 4.5.7), com as escalas de percepção de esforço e dor muscular no mesmo horário que foram testados com os tratamentos experimentais.

O consumo alimentar dos voluntários foi investigado por um nutricionista do LAPEH utilizando-se de recordatório alimentar (ANEXO 3) e instruídos a manterem seus hábitos alimentares durante 72 h que antecederam o dia experimental. Houve orientação para abster-se de cafeína e álcool por 72 h, assim como de atividade física extenuante por 48 h (4 METs, *American College of Sports Medicine*) (GARBER *et al.*, 2011). Houve refeição padronizada previamente ao protocolo de exercício.

O delineamento proposto para a etapa de testagem dos efeitos recuperativos da bebida experimental foi do tipo duplo-cego randomizado, pré/pós-teste com grupo com placebo, onde os voluntários receberam um dos dois tratamentos sendo bebida achocolatada experimental suplementada com L-leucina [BALL] e uma bebida placebo para controle experimental utilizando a mesma matriz, porém suplementada com colágeno bovino hidrolisado [BACH]. Desta forma, permitiu-se ingestão isovolumétrica, isonitrogenada e isoenergética entre os tratamentos. A não utilização de produtos de linha comercial como tratamento controle se deu pelas diferenças de macro e micronutrientes, densidade calórica e respostas glicêmicas, o que poderia tornar os julgamentos de efeitos da suplementação com L-leucina inconclusivos.

As bebidas para tratamentos experimentais foram produzidas por processo semi-industrial (detalhes na seção 4.5.2), envasadas de acordo com volumes de ingestão individualizados a partir de descrição das amostras e testadas quanto a segurança alimentar. Um técnico do laboratório fez o controle da casualização, programação e entrega das bebidas. As mesmas foram oferecidas nos momentos 0 min, 45 min e 75 min após SAFT90+, com os voluntários sendo orientados a beber o volume ofertado em 5 minutos. Tal abordagem pretendeu sustentar respostas insulínicas e não ultrapassar a taxa máxima de oxidação de CHO (i.e~60 g/h) (BEELEN *et al.*, 2010; VAN LOON *et al.*, 2000a; VAN LOON *et al.*, 2000b).

No dia experimental, os voluntários chegaram ao laboratório as 06h00min após 8 h de jejum sendo permitida a ingestão de água. Todos os participantes do estudo receberam um café da manhã padronizado. Após período pós-prandial de 1h30min,

medidas sanguíneas foram colhidas para estabelecimento de linha de base pré-exercício. Previamente ao início do protocolo SAFT90+, os voluntários fizeram 15 min de aquecimento e alongamentos padronizados. Uma representação esquemática do delineamento experimental é fornecida no Quadro 2, descrevendo desde etapa de amostragem, processo fabril das bebidas achocolatadas de tratamento, análises de segurança alimentar e protocolo experimental com respectivo plano de coleta de dados na testagem dos efeitos recuperativos pós-exercícios.

**Quadro 2 – Cronologia dos eventos do delineamento da pesquisa.**

Evento		Momento	Evento
Amostragem		Triagem, seleção, TCLE e caracterização da amostra	
Produção		Processamento das bebidas achocolatadas experimentais (BALL e BACH)	
Microbiologia alimentar		Análises de microbiologia para segurança alimentar (Tempo 1, pós-fabricação e Tempo 2, com 5 dias de prateleira)	
Experimentação dos efeitos recuperativos pós-exercícios	Pré-exercício	72 h	Abster-se cafeína, álcool; manter hábito alimentar; sono regular
		48 h	Abster-se de atividade extenuante, mais recomendações anteriores
		22h00min	Última refeição
		06h00min	Chegada ao LAPEH
		06h05min	Urina; MC; Desjejum (Café da Manhã); Pré-hidratação*
		07h25min	Sangue; MC; Urina; PDM; IPE; PGI; PS; ERP
		07h40min	Aquecimento;
	Exercício	08h00min	Protocolo SAFT90+ (1º tempo)
		08h45min	PDM; IPE; PGI; PS; ERP
		09h00min	Protocolo SAFT90+ (2º tempo)
		09h45min	Sangue; MC; Urina; PDM; IPE; PGI; PS; ERP;
	Recuperação	09h55min	Tratamento: Ingestão de BALL ou BACH (50% volume); EH
		10h40min	Tratamento: Ingestão de BALL ou BACH (30%); EH
		11h10min	Tratamento: Ingestão de BALL ou BACH (20%); EH
		11h55min	Sangue; PDM; IPE; PGI; PS; ERP;
13h55min		Sangue; MC; Urina; PDM; IPE; PGI; PS; ERP;	
24 h		Sangue; MC; Urina; PDM; IPE; PS; ERP;	

Fonte: dados da pesquisa

Nota: TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido; BALL=bebida achocolatada e L-leucina; BACH: bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; EH= Escala Hedônica; ERP= Escala de Recuperação Percebida; IPE= Índice de percepção do esforço; MC= Massa corporal; PDM= Percepção de dor muscular (Psicofísica; Visual Analogue Scale); PGI= Percepção gastrointestinal; PS= Percepção de sede; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); \*Pré-hidratação= 5 mL/kg de água. Para o participante hipohidratado (USG  $\geq$  1.020 g/mL), considerou-se um adicional de 2 mL/kg de água.

Durante o período de recuperação (pós-SAFT90+), os voluntários permaneceram dentro do laboratório, em ambiente climatizado, sendo autorizados a exercer

atividades simples da vida diária, incluindo assistir televisão, ouvir música, estudar ou ler um livro, assim como manipular *tablets*, celulares e *smartphones*. Nenhuma atividade extenuante foi realizada nesse período. Variáveis sanguíneas, urina, subjetivas de dor, esforço e recuperação foram monitoradas como pré-exercício, pós-exercício, 2 h, 4 h e 24 h pós-ingestão. A escala de aceitação sensorial das bebidas achocolatadas foi monitorada como pós-exercício, com 45 min e com 75 min (ANEXO 10). Tal abordagem para essa variável pretendeu medir os momentos de efeito imediato do tratamento. Retenção de fluidos foi medida como efeito global de todo volume ingerido durante a experimentação (refeição pré-exercício, hidratação e bebidas achocolatadas). Durante o SAFT90+ os atletas utilizaram *Polar Team System*<sup>®</sup> para registro da frequência cardíaca (FC) visando cálculo a intensidade do esforço (%FCM).

#### 4.5. Procedimentos

##### 4.5.1. Caracterização dos voluntários

A amostra foi caracterizada antropometricamente (MC, estatura e % gordura corporal) por um técnico especialista, seguindo as recomendações da *International Society for the Advancement of Kinanthropometry* (ISAK, 2001). No mesmo dia os voluntários realizaram o teste para medida de capacidade de resistência especial para o futebol (*Yo-Yo Intermittente Recovery Test Level 2 - Yo-Yo IR2*) (KRUSTRUP *et al.*, 2006), sendo os testes conduzidos por profissional de Educação Física especialista em futebol. Detalhes sobre medidas da massa corporal, estatura e composição corporal são descritos abaixo:

- **Massa corporal:** os voluntários foram medidos estando os mesmos descalços e somente vestidos com sungas utilizando uma balança digital (Welmy<sup>®</sup> W200/5, São Paulo, Brasil) com precisão de 0,005 kg, calibrada previamente.
- **Estatura:** foi medida com os voluntários descalços utilizando-se um estadiômetro com precisão de 0,5 cm, acoplado a uma balança (Sanny<sup>®</sup> Standart, São Paulo, Brasil).

- **Composição corporal:** dobras cutâneas do tríceps, peitoral, supra ilíaca, abdominal e da coxa foram aferidas utilizando-se um plicômetro (Cescorf®, Brasil), graduado em milímetros. Os valores de cada dobra foram utilizados para a obtenção do somatório das dobras ( $\Sigma$  dobras) e cálculo da densidade corporal através da Equação 1 (JACKSON *et al.*, 1978):

#### Equação 1 – Cálculo de densidade corporal

$$\text{Densidade Corporal} = 1,1093800 - 0,0008267(X1) + 0,0000016 (X1)^2 - 0,0002574 (X3)$$

Onde: X1=somatória das dobras peitoral, abdome e coxa; X2=somatória das dobras tríceps, supra-ilíaca e coxa, X3= idade em anos)

Na sequência das medidas de dobras cutâneas, o percentual de gordura corporal (%GC) foi calculado com os dados da densidade corporal calculada acima, utilizando-se da equação de Siri (SIRI, 1961):

#### Equação 2 – Equação de Siri

$$\%GC = [(4,95/\text{Densidade Corporal}) - 4,50] \times 100$$

Onde %GC= percentual de gordura corporal.

- **Teste de esforço progressivo para medida de capacidade de resistência especial em futebolistas:** seguiu-se os procedimentos de Krstrup *et al.* (2006) para realização do teste *Yo-Yo Intermittente Recovery Test Level 2* (Yo-Yo IR2), onde voluntários utilizam a mesma vestimenta do jogo de futebol e para realização em grama natural. Para emissão dos sinais sonoros foi utilizado áudio em CD que acompanha o *kit Yo-Yo tests* ([www.teknosport.com](http://www.teknosport.com), Ancona, Itália).

O Yo-Yo IR2 foi proposto como um teste de campo de fácil aplicação e de baixo custo (BANGSBO *et al.*, 2008; KRUSTRUP *et al.*, 2006; SVENSSON *et al.*, 2005). Fundamentado em corridas de ida e volta (20 m) com incremento de velocidade de deslocamento controlado por sinal sonoro, seu principal atributo de mensuração é a intermitência de ações, caracterizadas com paralisação de 10 s de recuperação entre os estímulos para novo deslocamento.

Os deslocamentos são conduzidos até a fadiga ou queda de rendimento do jogador, caracterizado pelo não acompanhamento dos sinais sonoros nas respectivas marcações. Devido a essa característica, o Yo-Yo IR2 tem sido recomendado como ótima medida de avaliação para o futebol (BANGSBO *et al.*, 2008; CURRELL *et al.*, 2008). O consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ) foi estimado pela Equação 3, abaixo:

#### **Equação 3 – Cálculos do consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ )**

$$VO_{2max} \text{ mL} \cdot (\text{min} \cdot \text{kg})^{-1} = \text{distância IR2 (m)} \times 0.0136 + 45.3$$

Onde:  $VO_{2max}$  = consumo máximo de oxigênio; distância IR2=performance do voluntário em metros

#### **4.5.2. Formulação e processamento das bebidas experimentais**

Para a formulação considerou-se a escolha dos ingredientes foi baseada em evidências na literatura considerando necessidade e cinética de absorção para recuperação, particularmente atletas de futebol (BURKE *et al.*, 2006; HAWLEY *et al.*, 2006; NÉDÉLEC *et al.*, 2013; REILLY, 1997). Referenciais sobre composição de ingredientes de bebidas achocolatadas comerciais utilizados em estudos sobre recuperação também foram considerados (EL-KHAIR, 2009; PRITCHETT *et al.*, 2012; SPACCAROTELLA *et al.*, 2011). Outro aspecto foi considerar o intento de obter uma bebida isenta de lactose e glúten, já que boa parcela da população

mundial sofre de intolerância à lactose (ODEDRA, 2015) ou das desordens advindas da ingestão do glúten (SDEPANIAN *et al.*, 1999).

Para a escolha do achocolatado comercial como ingrediente, foi considerado o teor de cacau (40%) e principalmente pelo fato de ser isento de lactose. Além disso, a opção pelo chocolate para aromatizar se deu em função das propriedades sensoriais e antioxidantes que uma proteína à base de cacau pode fornecer (MCBRIER *et al.*, 2010). Outra vertente para seleção e inclusão desse ingrediente diz respeito ao rol de micronutrientes presentes no achocolatado em pó utilizado, onde há ingredientes típicos na formulação incluindo maltodextrina, vitaminas e sais minerais como suplementos (EDUARDO *et al.*, 2004).

Na BALL, o perfil aminoacídico contemplou um aporte de leucina isolada (L-Leucine All Chemistry® do Brasil, Jabaquara, SP, Brasil). Na bebida BACH, a quantidade equivalente, porém diferenciada de perfil aminoacídico para placebo no controle experimental da L-leucina foi a presença de colágeno bovino hidrolisado - CBH (Galena Química e Farmacêutica, Campinas, SP, Brasil).

O colágeno é a proteína mais abundante no organismo animal representando aproximadamente 25% de toda proteína corporal. Os aminoácidos não essenciais: aspártico, glutâmico, prolina, glicina e alanina representaram aproximadamente 92% do total de aminoácidos do CBH, sendo 26,6% para a glicina, 12,3% prolina, 8,9% alanina, 18,2% para os ácidos aspártico e glutâmico, e o restante por hidroxiprolina e a hidroxilisina (ZIEGLER *et al.*, 2009).

A composição aminoácídica do colágeno é bastante atípica sendo deficiente em todos os aminoácidos considerados nutricionalmente essenciais, com o agravante de não apresentar triptofano em sua composição e, dessa forma, seu valor nutritivo, com base no escore de aminoácidos essenciais (EAE), poderá ser considerado zero (ZIEGLER *et al.*, 2009). Assim, acreditou-se que o CBH seria um placebo para controle experimental para a L-leucina, sendo a BALL, então, possuidora de um alto escore para valor nutritivo em relação a BACH.

Somando-se a isso, e justificando ainda a adoção do CBH como controle a L-leucina, também se dá por uso tradicional desse ingrediente por sua função



tecnológica, pois é uma proteína natural que não altera o sabor e o odor do produto acabado, mesmo quando utilizado em altas concentrações. Suas principais características são: fácil manuseio, partículas homogêneas, excelentes propriedades de fluidez, alta absorção, dispersão rápida, solubilidade instantânea em líquidos frios e quentes, resistente a variações de temperatura e *pH* (LIU *et al.*, 2015).

Para o estabelecimento quantitativo dos ingredientes e cálculo da informação nutricional, utilizaram-se as informações contidas nas embalagens das matérias-primas utilizadas. A concentração peso por volume (%p/v) utilizada pode ser visto na Tabela 1.

**Tabela 1 – Concentração peso por volume (%p/v) dos ingredientes para produção das bebidas experimentais.**

<b>Categoria</b>	<b>BALL</b>	<b>BACH</b>
L-leucina isolada	1.5%	0%
Açúcar	2%	2%
Achocolatado	14%	14%
Colágeno bovino hidrolisado	0%	1.5%

Fonte: dados da pesquisa.

Ingredientes adicionados ao leite, compreendendo a adição de vitaminas, minerais e carboidratos presentes no achocolatado de maneira relativizada conforme rótulo da embalagem.

Para a fase de processamento das bebidas experimentais, foi utilizada as instalações da Plataforma Tecnológica de Leite e Derivados (INOVALEITE; Figura 3) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) que tem estrutura laboratorial para a simulação de processos em escala piloto e semi-industrial de produtos lácteos com o rigor científico e tecnológico necessários à produção de alimentos seguros e confiáveis para consumo humano. Acordos institucionais aconteceram – UFMG/UFV – apontando contrapartidas tecnológicas e consultoria para desenvolvimento desta etapa do projeto (ANEXO 4).

**Figura 3 – Plataforma Inovaleite da Universidade Federal de Viçosa.**

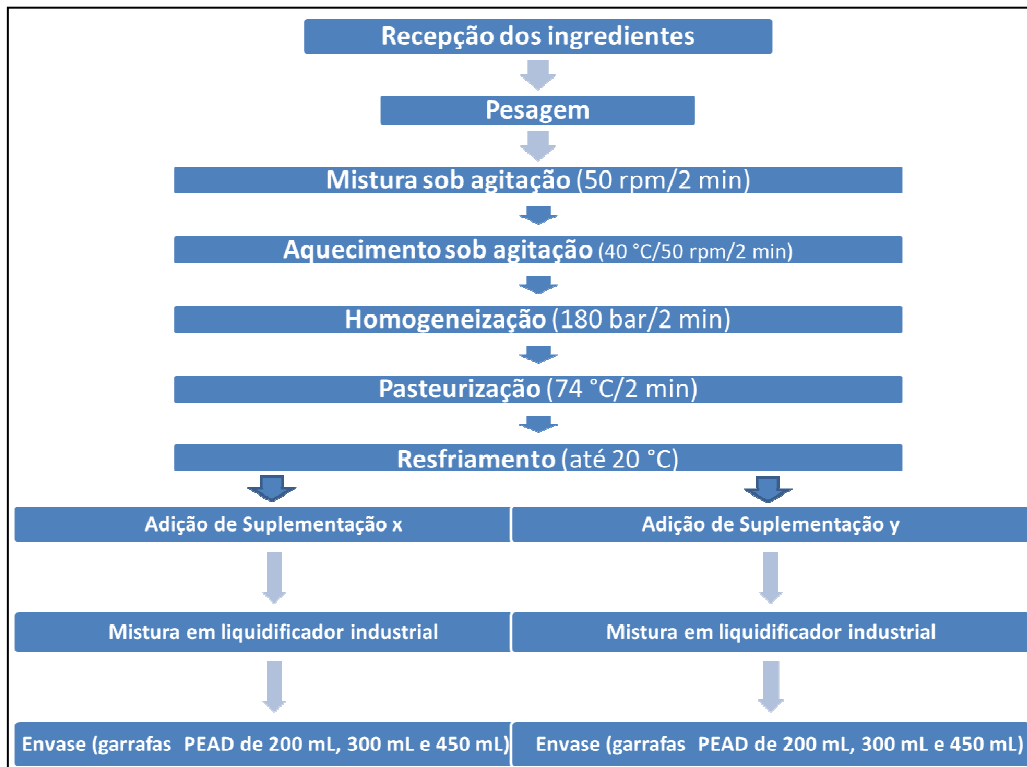


Fonte: dados da pesquisa.

Foram realizados testes preliminares para a definição do processamento, binômio tempo/temperatura de tratamento térmico e fluxograma de fabricação ideal para a produção dos protótipos das duas bebidas achocolatadas para tratamento experimental. A partir da definição dos parâmetros produtivos, foram elaborados 30 L de cada bebida.

A Figura 4 apresenta o fluxograma adotado para processamento das bebidas achocolatadas.

Figura 4 – Fluxograma de processamento das bebidas experimentais.



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: Após a etapa do resfriamento, há redirecionamento para a suplementação dos diferentes perfis aminoacídicos (x e y, L-leucina e colágeno bovino hidrolisado), compondo assim a bebida experimental suplementada de L-leucina (BALL) e bebida placebo como controle suplementada de colágeno bovino hidrolisado (BACH).

Após recepção e pesagem dos ingredientes, conforme Tabela 1, anteriormente apresentada, para atendimento das necessidades e concentrações específicas da bebida achocolatada suplementada, a batelada de processamento iniciou com a mistura dos ingredientes básicos: leite bovino; açúcar (leite bovino semidesnatado UHT, zero lactose, NoLac<sup>®</sup>, Itambé Alimentos S/A Pará de Minas/MG, Brasil; Açúcar Refinado União<sup>®</sup>, Camil Alimentos S/A, Araguari/SC, Brasil) e, achocolatado em pó (New Choco Dark, Lightsweet<sup>®</sup>, Marialva/PR, Brasil) para aromatizar a bebida. Essa etapa foi realizada em tanque de mistura, em *triblender* sob agitação de 50 rpm. Posteriormente, procedeu-se a termização do leite, a 40°C, entre dois a três minutos, continuando o processamento de mistura. Na sequência, houve homogeneização (180 bar), seguida de pasteurização (74 °C) por dois minutos. A adoção da pasteurização teve como finalidade a redução da carga microbiana transitória e eliminação de 99,99% da carga microbiota patogênica presente, sem que o produto

tenha grandes alterações físico-químicas ou prejuízos de seus elementos bioquímicos, além de suas propriedades sensoriais, assegurando e mantendo estável a conservação das bebidas achocolatadas para tratamento experimental com ingestão pós-exercícios.

Após esse momento houve arrefecimento em tanques (20 °C), onde foram adicionados os suplementos para hidratação prévia. Tal arrefecimento oferece vantagens na tentativa de diminuir a carga microbológica. Além da vantagem tecnológica que foi intentar para manter a biodisponibilidade das suplementações. Na sequência, houve novamente mistura em liquidificador industrial (~11.000 rpm). Seguiu-se, após essa mistura, para o envase. As embalagens utilizadas para envase foram garrafas com tampas rosqueadas e lacradas, descartáveis (polietileno de alta densidade - PEAD). As garrafas e tampas foram esterilizadas por imersão em água fervente durante 10 segundos. O enxágüe final das garrafas foi feito por aspersão de água a 50°C durante 7 segundos.

Dos 30 L de bebida achocolatada processados, metade do lote foi designada, em etapas finais do fluxograma de produção, para cada uma das bebidas para tratamento experimental pós-exercício (BACH e BALL). O envase foi realizado em duplicatas de acordo com os volumes de ingestão individualizados para os voluntários e os respectivos momentos de ingestão tomando como referência a ingestão de leucina em 0,150 g/kg para a BALL, fazendo correspondência volumétrica para a BACH. O envase ocorreu em duplicatas, visando aleatorização para composição dos grupos experimentais. Houve codificação aleatória de três dígitos como tentativa de blindagem para controle duplo-cego durante a experimentação.

Do lote final produzido foram retiradas 20 amostras de cada bebida, sendo a metade direcionada para as análises microbiológicas de segurança alimentar e a outra metade retida para contraprovas. Periodicamente, nos tempos T1 (1 dia após fabricação) e T2 (5 dias após fabricação, período estimado para consumo na para uso na fase experimental dos efeitos recuperativos, foram realizadas análises microbiológicas para avaliar a sua qualidade e estabilidade durante o armazenamento sob refrigeração a 5 °C ± 1 °C. O restante do lote foi também refrigerado a 5 ± 1 °C aguardando tomada de decisão das análises microbiológicas e

segurança alimentar para liberação ou não para o consumo humano. A condição de acondicionamento supracitado atende a Instrução Normativa MAPA n.º 16/2005 (BRASIL, 2005) que regulamenta que a bebida láctea deve ser envasada em materiais adequados para as condições de armazenamento e que confirmam uma proteção apropriada contra a contaminação, devendo as mesmas ser conservadas e comercializadas em temperatura não superior a 10°C (dez graus Celsius).

As bebidas (BALL e BACH) foram idênticas no balanço de massas, razão CHO/PRO= $\sim$ 3:1, razão essa comumente citada na literatura, atingindo caracterização de baixo teor de GOR, o que a colocaria numa razão CHO/PRO/GOR= $\sim$ 3:1:11. No entanto, BALL e BACH são diferentes pela suplementação de dois perfis aminoacídicos em estágios finais da batelada. Tais abordagens buscaram atender controle experimental, colocando condições igualitárias sobre a quantidade de todos macronutrientes e micronutrientes entre elas (i.e tratamentos isocalóricos, isonitrogenado). Com isso também se alcançou um volume de ingestão idêntico relativos a MC (volume isovolumétrico entre tratamentos), sendo uma tentativa de controle experimental através de equivalência nas taxas de esvaziamentos gástricos.

#### **4.5.3. Enquadramento legal das bebidas experimentais**

O produto de referência mais próximo é a bebida láctea pasteurizada. De acordo com a Legislação, a bebida láctea tecnicamente é normatizada pela Instrução Normativa MAPA n.º 16/2005 (BRASIL, 2005), sendo definida pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Bebida Láctea (RTIQ) como “um produto resultante da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto (s) ou substância (s) alimentícia (s), gordura vegetal, leite (s) fermentado (s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos”. A base láctea representa pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto, sendo no mínimo 2% de matéria gorda e 1% de proteína (BRASIL, 2005). Portanto o leite acrescentado de achocolatado não é

classificado como bebida láctea não fermentada, porém, é alimento semelhante à BALL suplementada formulada no presente estudo.

No que tange à segurança microbiológica da formulação para oferta aos voluntários da pesquisa, foram considerados os parâmetros para bebida láctea pasteurizada segundo Instrução Normativa n.º 16/2005 (BRASIL, 2005), produto de semelhança como já citado, comparando os valores de análises realizadas com os valores estabelecidos. Além disso, medida adicional para atendimento de segurança alimentar dos demais ingredientes ocorreu observando o estabelecimento dos padrões microbiológicos sanitários para alimentos especificados e assim determinar os critérios para a conclusão e interpretação dos resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano especificados de acordo com a Resolução RDC n.º 12/2001 (BRASIL, 2001).

Para interpretação dos resultados, comparou-se os resultados das análises com os valores estabelecidos na legislação. De acordo com essa comparação temos (i) produtos em condições sanitárias satisfatórias, sendo aqueles cujos resultados analíticos estão abaixo ou igual aos estabelecidos para amostra indicativa ou amostra representativa, conforme especificado; (ii) produtos em condições sanitárias insatisfatórias, que são aqueles cujos resultados analíticos estão acima dos limites estabelecidos para amostra indicativa ou amostra representativa, conforme especificado ou ainda podem ser aqueles cujos resultados analíticos demonstram a presença ou a quantificação de outros microrganismos patogênicos ou toxinas que representem risco à saúde do consumidor.

Desta forma, segundo a Resolução RDC n.º 12/2001 (BRASIL, 2001), poderíamos concluir das duas seguintes formas: que o "produto ou lote (se amostra indicativa ou representativa, respectivamente) está de acordo com os padrões legais vigentes" ou "produto ou lote (se amostra indicativa ou representativa, respectivamente) impróprio para o consumo humano por não apresentar resultado(s) analítico(s) e o(s) parâmetro(s) não atendido(s) para as situações enquadradas ou por presença microrganismo patogênico ou toxina que representa perigo severo a saúde do consumidor.

#### 4.5.4. Plano de amostragem e segurança alimentar

Para atendimento de segurança alimentar, as práticas de higiene para elaboração do produto buscaram atender a Portaria n.º 368/1997, que aprovou o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos (BRASIL, 1997). Inicialmente, houve cumprimento dos critérios macroscópicos e microscópicos atendendo que o produto não continha substâncias estranhas de qualquer natureza.

Considerando que a análise microbiológica do produto todo ou de um lote inteiro de produtos é impraticável, por razões de custo e pelo caráter destrutivo deste tipo de análise, analisam-se amostras retiradas do alimento ou do lote. A determinação do número de amostras a serem analisadas e os critérios de decisão (sua aceitação ou rejeição) compõem o plano de amostragem. Nesse sentido, para avaliar as condições microbiológicas de segurança alimentar do lote das bebidas produzidas, foram considerados critérios microbiológicos de avaliação estabelecidos em nível internacional pela *Comissão do Codex Alimentarius* (FAO/WHO) (BRASIL, 2006). Segundo a ICMSF - *The International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 2002). Nela, os diferentes planos de amostragem podem pertencer a 15 categorias distintas, de acordo com o grau de risco que os microrganismos contaminantes nos alimentos oferecem ao consumidor.

A classificação das bebidas, em função dos critérios microbiológicos, já pertencentes aos ingredientes, tratamento térmico projetado para a sua elaboração e da forma de conservação pós-envase, é a seguinte: i) - *sem risco direto à saúde: Inclui microrganismos que causam apenas alterações nos alimentos. Exemplos: fungos, bactérias aeróbias mesófilas [Categoria 1];* ii) - *risco indireto à saúde do consumidor: Inclui os microrganismos indicadores. Exemplo: Coliformes [Categoria 4].* Desta forma, foi considerado o seguinte plano de amostragem:  $n= 5$  e  $c= 3$  (categoria 1 e 4), onde “n” é o número de unidades retiradas de um lote que serão analisadas independentemente (unidades amostrais) e “c” é o número máximo aceitável de unidades do lote em que as contagens microbianas estão acima do limite mínimo (m) e abaixo do limite máximo tolerado (M) para o microrganismo investigado (unidades defeituosas). Desta forma, os parâmetros foram obtidos no produto imediatamente após sua fabricação (T1) e com cinco dias após (T2).

Quanto aos critérios microbiológicos, os valores encontrados nas amostras das bebidas foram comparados com os padrões exigidos para os grupos alimentares de semelhança no produto final e para os ingredientes constituintes, como: i) bebida láctea pasteurizada de acordo com a Instrução Normativa n.º 16/2005 (BRASIL, 2005); e ii) outros produtos lácteos [sobremesas lácteas pasteurizadas refrigeradas, com ou sem adições] e iii) chocolates, balas, produtos para confeitaria, gomas de mascar e similares [chocolates e produtos similares, em pó, granulado ou flocados e outros produtos de cacau e similares] de acordo com a Resolução RDC n.º 12/2001 (BRASIL, 2001).

O microrganismos (i) aeróbios mesófilos/mL(ou /g) [n=5 c=2; m=  $7,5 \times 10^4$ ; M=  $1,5 \times 10^5$ ; (ii) coliformes/mL (ou/g) (30/35°C) [n=5 c=2; m=5 M=10; coliformes/mL (ou/g) (45°C) [n= 5 c=2; m=2 M=5] foram considerados microrganismos de interesse para estabelecimento de segurança alimentar das bebidas, considerando a Instrução Normativa n.º 16/2005 (BRASIL, 2005). Adicionalmente, segundo a Resolução RDC n.º 12/2001 (BRASIL, 2001) foram observados os valores das análises microbiológicas com o valor estabelecido para coliformes 45°C (E. Coli; UFC/mL) [ $5 \times 10^3$  (NMP/mL) e 5 (NMP/mL); e *Salmonella sp*/25g, tolerância indicativa “ausente”, sendo especificado, para esse fim, os ingredientes, considerando chocolates e produtos similares e sobremesas lácteas pasteurizadas, respectivamente.

#### **4.5.5. Avaliações microbiológicas e segurança alimentar**

As contagens microbiológicas foram realizadas utilizando as metodologias Petrifilm 3M™ (3M Company, St. Paul/MN, EUA). Seguindo as recomendações do fabricante, alíquotas de 25 g de cada amostra de alimento foram assepticamente pesadas em sacos plásticos estéreis e homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% esterilizada durante 1 min (*Seward Stomacher 400 lab System*, Inglaterra). Diluições decimais a partir da diluição  $10^{-1}$  foram preparadas em tubos contendo 9,0 ml de água peptonada 0,1%. Placas Petrifilm 3M™ (*Petrifilm Aerobic Count Plate*, 3M Company, St. Paul/MN, EUA; *Petrifilm E.coli/Coliform Count Plate*, 3M Company, St. Paul/MN, EUA) foram inoculadas com alíquotas de 1,0 mL das diferentes diluições dos alimentos.



Seguindo normativas do Método Oficial AOAC 991.14 (AOAC, 1990) para coliformes, placas inoculadas foram incubadas por  $24 \pm 2$  h a  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  e para *E. Coli* houve incubação de  $48 \pm 2$  h a  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após incubação, colônias azuis e vermelhas com bolhas são consideradas colônias de *E. Coli* e coliformes totais, respectivamente. O resultado foi obtido pela contagem das colônias sendo expresso em UFC/g.

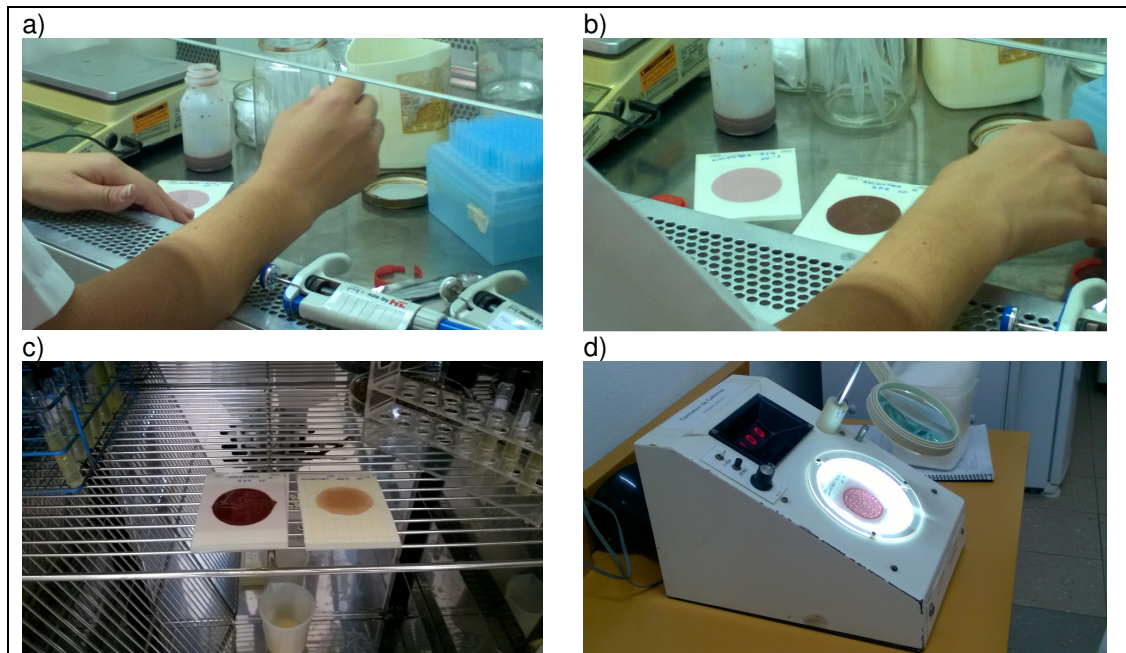
Para a análise de *Salmonella sp.* foi utilizado o kit *3M™ Petrifilm™ Salmonella Express* (3M Company, St. Paul/MN, EUA). Seguindo normativas do Método Oficial AOAC-2014.01 (BIRD *et al.*, 2014), considerando as etapas: i) enriquecimento de suplemento com amostra (25 g) com 225 mL de *3M™ Salmonella* base de enriquecimento pré-aquecido; ii) matrizes foram homogeneizadas durante 2 min e incubadas a  $41,5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  para 18-24 h; iii) culturas obtidas a partir do enriquecimento seletivo ou enriquecimento primário (baixa carga microbiana) são riscadas em duplicado em placas de *3M™ Petrifilm™ Salmonella* e incubadas a  $41,5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  h. Para identificação após incubação, colônias de tons do vermelho ao marrom com zonas amarelas discretas e/ou bolhas de gás foram consideradas como presuntivas para *Salmonella sp.* O resultado foi obtido pela contagem das colônias sendo expresso em UFC/g.

O sistema Petrifilm *3M™* foi adotado pela sua praticidade, por ser mais eficiente e prático em relação às técnicas dos tubos múltiplos, sendo um método alternativo adequado para a enumeração de coliformes totais e *E. Coli* em alimentos (SILVA *et al.*, 2006).

Outros autores consideram as placas de Petrifilm *3M™* uma boa alternativa para a detecção de bactérias mesófilas aeróbias em leite (FREITAS *et al.*, 2009; JORDANO *et al.*, 1995). O kit *3M™ Petrifilm™ Salmonella Express* foi considerado igualmente válido em comparação com métodos validados da USDA/FSIS-MLG ou FDA/BAM (BIRD *et al.*, 2014).

As análises microbiológicas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFV. Na Figura 5, abaixo, está ilustrado algumas etapas dos procedimentos de análises microbiológicas para segurança alimentar segundo as metodologias *Petrifilm 3M™* (3M Company, St. Paul/MN, EUA).

**Figura 5 – Ilustração de etapas das análises microbiológicas de segurança alimentar.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: Na figura a e b, pipetagem e preparação das placas Petrifilm 3M™. Na figura c, equipamento B.O.D para incubação. Em d, leitora automatizada de colônias.

#### **4.5.6. Levantamento dietético e refeição pré-exercício**

A avaliação dos hábitos alimentares, seu cumprimento e a prescrição dietética foram realizadas por uma nutricionista. As dietas foram calculadas de acordo com os hábitos alimentares de cada voluntário por meio de questionário e de recordatório habitual da dieta (ANEXO 3). A necessidade energética foi calculada considerando-se a “necessidade estimada de energia” (*Estimate Energy Requirement - EER*), segundo o gênero, idade, peso, estatura e nível de atividade física de cada voluntário (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001). Adotou-se o nível de atividade física de acordo com o resultado de cada indivíduo, obtido pelo questionário *International Physical Activity Questionary* (IPAQ; na versão curta) (MATSUDO *et al.*, 2001). O teor energético da dieta atendia de 90 a 110% da EER.

A adequação do percentual de macronutrientes em relação ao valor energético total (VET) foi calculada com base nas “faixas de distribuição aceitáveis de macronutrientes” (*Acceptable Macronutrients Distribution Ranges – AMDR*) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001), de acordo com idade e sexo. É preconizado que

45 a 65% das calorias totais ingeridas sejam provenientes de CHO, 10% a 35 % de PRO e 20% a 35% de GOR (AMDR).

As dietas foram calculadas utilizando-se o programa AVANUTRI 4.0 (Avanutri & Nutrição Serviços e Informática Ltda, Três Rios/RJ, Brasil). No software, selecionou-se a Tabela de Composição Química de Alimentos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

A refeição pré-exercício foi padronizada para atender a 18% de energia da EER de cada voluntário. Desta forma, os participantes do estudo receberam um café da manhã individualizado (aproximadamente= 380 kcal, 68 g de CHO, 11 g de PRO, 7 g GOR) as 02h00min antes do protocolo exercício que simula o futebol (SAFT90+). Durante e após a refeição (1h30min), os voluntários permaneceram acomodados sentados em uma sala com temperatura ambiente considerada termoneutra ( $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ;  $60 \pm 1$  UR).

Na Tabela 2, está representada a composição do café da manhã em valores proximais ao que tem sido adotado para mesmo perfil de amostra no LAPEH, UFV. A opção por essa composição se deu também pela mesma ter assegurada resposta glicêmica durante a atividade aeróbica (FARIA *et al.*, 2011).

**Tabela 2 – Composição e informação nutricional da refeição pré-exercício.**

Alimento	Quantidade	Marca	CHO (g)	PRO (g)	GOR (g)	Kcal
Maçã Fuji	90 g		13.7	0.3	0	55.8
All Bran	15 g	Kellogg's	6.7	1.8	0.4	37.8
Activia 0% Gordura	100 g	Danone	11	5	0	64
Pão Integral	1 fatia	Seven Boys	13.3	4	0.4	73.3
Suco de Caju	150 mL	Bela Ischia	24	0	0	96
Margarina	7,5 g	Qualy	0	0	6	54
<b>Total</b>			<b>68.7</b>	<b>11.1</b>	<b>6.8</b>	<b>380.9</b>

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: Quantidade de referência individualizada por massa corporal de cada voluntário.

Os diários alimentares foram devolvidos aos voluntários e eles foram instruídos a ficarem o mais próximo possível da quantidade, tipo e tempo de ingestão dos alimentos e bebidas habituais que tinham consumido durante o período de 72 h prévias ao tratamento experimental. Os voluntários também foram orientados

adicionalmente a não ingerir bebidas à base de leite durante o intervalo pós-experimento (4 h até às 24 h da fase de recuperação) do estudo, assim como manterem suas atividades físicas habituais inferiores a 4 METs.

#### **4.5.7. Protocolo de exercício que simula partida de futebol (SAFT90+)**

Após aquecimento padronizado e típico do futebol (10 min), os voluntários seguiram para o protocolo SAFT90+. O objetivo principal dessas simulações é controlar os padrões de movimento, homogeneizar as demandas fisiológicas e mecânicas simulando àquelas requeridas em uma partida oficial, e mantendo assim, o controle experimental. Devido à grande variabilidade existente no jogo, inferências significativas de intervenções ou medidas de desempenho são difíceis de serem verificadas durante partida real pelas mesmas mostrarem baixa confiabilidade (GREGSON *et al.*, 2010).

O protocolo SAFT90 original foi desenvolvido com análise tempo-movimento de jogos obtidos a partir do Campeonato Inglês da primeira divisão (Prozone®) (LOVELL *et al.*, 2008; LOVELL *et al.*, 2008; SMALL *et al.*, 2010). O SAFT90 foi validado e tem se mostrado capaz de simular as demandas fisiológicas (LOVELL *et al.*, 2008), a fadiga (LOVELL *et al.*, 2013; NÉDÉLEC *et al.*, 2013; SMALL *et al.*, 2009; SMALL *et al.*, 2009; SMALL *et al.*, 2010) e as respostas mecânicas (RAJA AZIDIN *et al.*, 2015) de uma partida de futebol. Outros pesquisadores usaram esse protocolo com o objetivo de estudar efeitos da fadiga e intervenção nutricional (HARPER *et al.*, 2015; MARSHALL *et al.*, 2014) ou impacto físicos e metabólicos de diferentes tipos de superfícies do campo de jogo (NÉDÉLEC *et al.*, 2013).

No entanto, alguns estudos têm demonstrado insuficiência dos níveis de dano muscular resultantes da falta de ações de contato, saltos, chute e disputas de bola (NÉDÉLEC *et al.*, 2013; RAJA AZIDIN *et al.*, 2015). Da mesma forma, somente ações de corridas, nas mais diversas velocidades de deslocamentos, como se dá na versão original do protocolo, não poderá ser sensível o suficiente para provocar a indução de fadiga semelhante a partida de futebol (ARRUDA *et al.*, 2015).

Desta forma, visando ampliar a aplicação do protocolo SAFT90, inclusões de atividades com bola como condução e chute (juntamente com atividades de trote), passe (juntamente com caminhada) e saltos (também juntamente com caminhada)

ocorreram, sem, no entanto, descaracterizar a frequência, ordem e ritmo das atividades originais. Assim como na versão original, os voluntários percorram um percurso de agilidade 20 m de modo intermitente como atividade de permanência parada (0 km/h), a caminhada (~5,5 km/h), trote (*jogging*) (~10,7 km/h), correndo (~15 km/h) ou em *sprint* (esforço máximo individual).

A inclusão das atividades de envolvimento com bola está apoiada em dados da *English Football Association - Premier League* (BLOOMFIELD *et al.*, 2007) e saltos no estudo de Dellal *et al.* (2010). Alternância das mudanças de direção à direita e à esquerda em desaceleração ao ponto de 10 m também foram incluídas, considerando que no protocolo original havia somente atividade dessa natureza de forma unilateral. Assim, com esta adaptação, o protocolo SAFT90 (nomeadamente SAFT90+) passou a ter característica quantitativa aditiva (descrita no Quadro 3) que o aproxima de outros estudos de análise tempo-movimento no futebol (DI SALVO *et al.*, 2007; MOHR *et al.*, 2003), além dos saltos e das atividades de envolvimento com bola (BLOOMFIELD *et al.*, 2007; DELLAL *et al.*, 2010).

**Quadro 3 – Comparativo entre o protocolo de exercício para simulação de partida de futebol original SAFT90 e o adaptado para o presente estudo (SAFT90+).**

TIPO DE MOVIMENTO/ATIVIDADE	SAFT90	SAFT90+
<b>Deslocamentos (km)</b>		
Parado (0 km/h)	0.00	0.00
Caminhada (~5.5 km/h)	3.36	3.36
Trote (~10.7 km/h)	5.58	5.34
Trote + condução de bola (~10.7 km/h)	-	0.24
Corrida (~15 km/h)	1.50	1.50
<i>Sprinting</i> (~20 km/h)	0.34	0.34
Total	10.78	10.78
<b>Demais movimentos e ações (número de execuções)</b>		
Trocas de velocidade	1269 (a cada 4.3 s)	1269 (a cada 4.3 s)
Trocas de direção desaceleração (180°)	888	888
Trocas de direção em agilidade	444 (unilateral)	222 (Direita) 222 (Esquerda)
Saltos	-	6 (Direita) 6 (Esquerda)
Passes	-	24
Chutes	-	18

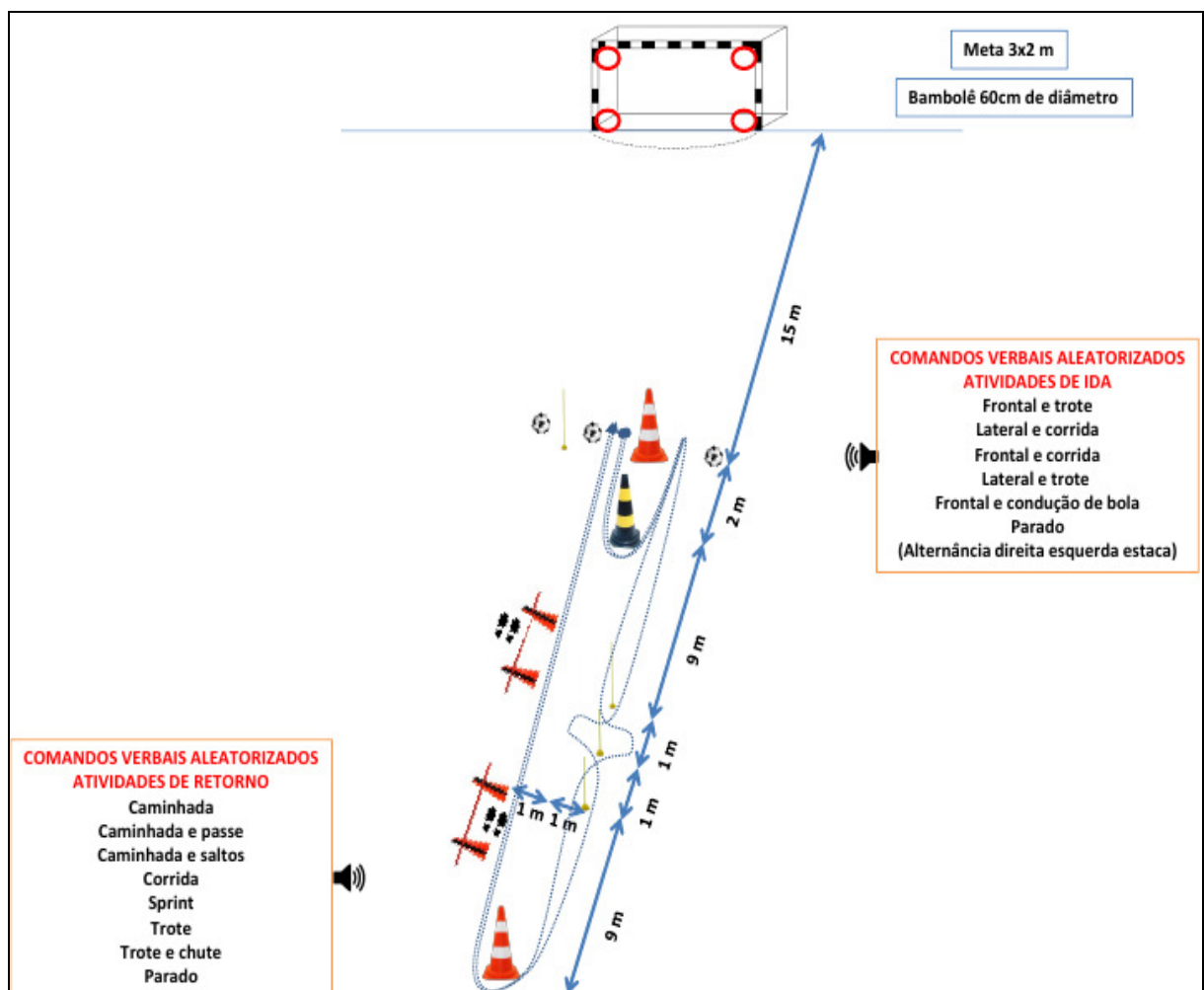
Fonte: SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovel *et al.* (2008).

Para execução do protocolo, foi utilizado equipamento de áudio (CD player) pelo qual são sinalizados e verbalizados atividades e movimentos. Tais atividades e

movimentos são separados por blocos de 15 minutos, os quais são repetidos seis vezes (três blocos, 1º tempo regulamentar; 15 minutos de intervalo; três blocos, 2º tempo regulamentar) para simular uma partida completa de 90 minutos de futebol. Tendo em vista o impacto de condições ambientais e risco a saúde, foi verificado indicações de conforto térmico no índice de estresse térmico para evitar valores extremos (KATCH *et al.*, 2008).

Para monitoramento das condições ambientais, usou-se equipamento portátil termo-Higro-Anemômetro Digital (THAL-300, Instrutherm®, São Paulo Brasil). Utilizou-se campo de futebol de grama natural e materiais acessórios como cones, bolas, estacas e bombolês para montagem da estrutura necessária a execução do protocolo (Figura 6, abaixo).

**Figura 6 – Ilustração esquemática do protocolo de exercício que simula partida de futebol SAFT90+.**



Fonte: SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test, adaptado de Lovel *et al.* (2008).

#### **4.5.8. Protocolo de hidratação pré- e durante exercício**

Logo após a chegada ao laboratório para a sessão experimental, cada participante foi convidado a esvaziar sua bexiga e fornecer uma amostra de urina, que foi utilizada para determinar o estado de hidratação de acordo com a gravidade específica da urina (GEU). Os participantes, em seguida, receberam 5 mL/kg de água para consumirem *ad libitum* antes do protocolo SAFT90+ (VOLTERMAN *et al.*, 2014). Para àqueles participantes classificados em estado “hipohidratados” na chegada ao laboratório ou na fase pré-exercício (USG  $\geq$  1.020) (CASA *et al.*, 2000), considerou-se um adicional de 2 mL/kg de água (VOLTERMAN *et al.*, 2014).

Durante o protocolo SAFT90+, foi estabelecida uma hidratação programada a cada 15 min, com consumo de 2 mL/kg, seguindo proposta metodológica aplicada previamente por Saat *et al.* (2005) e Murray *et al.* (1987). A ingestão ocorreu até os 75 min do protocolo, não ingerindo mais água a partir daí até o final. Os voluntários foram instruídos a não molharem a cabeça com sua água nem a jogar fora. Tal estratégia visou padronizar o *status* de hidratação dos voluntários, tendo em vista que diferentes condições nesse parâmetro poderiam alterar a taxa de absorção de nutrientes e líquidos das bebidas achocolatadas oferecidas.

#### **4.5.9. Abordagem de ingestão das bebidas experimentais**

O tratamento experimental com ingestão das bebidas foi pensado para atender requisitos de não ultrapassar a taxa de oxidação máxima de CHO-PRO, ampliar a resposta insulínica após sua ingestão e não provocar desconforto gástrico. Desta forma, considerando evidências sobre ingestão concomitante de CHO-PRO, quantidades próximas a 0,8 g/kg/h; 0,2-0,4 g/kg/h, respectivamente para CHO e PRO, foram adotadas pois as mesmas forneciam uma carga ótima que é essencial para estimular a síntese tecidual e síntese de glicogênio (BEELEN *et al.*, 2010; VAN LOON *et al.*, 2000; VAN LOON *et al.*, 2000b). Assim, alíquotas de ingestão (50% volume a 0 min, 30% volume a 45 min e 20% volume a 75 min pós-exercício [SAFT90+]) foram consideradas para essa investigação.

Todas as alíquotas das bebidas foram servidas refrigeradas ( $\sim 4$  °C) com os voluntários permanecendo sentados em sala climatizadas ( $23 \pm 1$  °C e  $60 \pm 1\%$  UR).

Todos os tratamentos foram fornecidos em recipientes de plástico transparentes. Tal abordagem serviu para orientar a espeção macroscópica das mesmas. No entanto, o fator expectativa pode ser minimizado pelo fato dos dois tratamentos serem semelhantes em cor, cheiro e gosto, afinal são constituídos de uma mesma matriz. Cada participante recebeu sua garrafa e consumiu o conteúdo ofertado no prazo de até 5 min. Volumes de 500 a 700 mL são comumente aplicados a voluntários em estudos com oferecimento de bebidas achocolatadas comerciais (GILSON *et al.*, 2010; KARP *et al.*, 2006; LUNN *et al.*, 2012; SPACCAROTELLA *et al.*, 2011), B(CHO-PRO) (BETTS *et al.*, 2007; JAMES *et al.*, 2011) e leite bovino (COCKBURN *et al.*, 2012; COCKBURN *et al.*, 2013).

Devido a possibilidade de intoxicação pelo acúmulo de aminoácidos e os seus metabólitos no plasma e na urina, a presente proposta de tratamento experimental com ingestão das bebidas considerou como estabelecimento de risco a BALL, pois trata-se de suplementação com AA isolado e que poderia ampliar o risco de toxicidade. No entanto, a quantidade de ingestão esteve aproximadamente 70% abaixo do limite máximo de ingestão tolerável, acima do qual pode aumentar o risco de toxicidade (ELANGO *et al.*, 2012; PENCHARZ *et al.*, 2012). Assim, a quantidade de leucina suplementada (livre e em ligação às proteínas) durante o procedimento experimental com BALL (~11 g/d para um indivíduo de 70 kg) não ultrapassou a quantidade limite da ingestão segura (LIS) de leucina estipulada como medida cautelosa (500 mg/kg/d ou ~ 35 g/d) sob condições dietéticas agudas (ELANGO *et al.*, 2012; PENCHARZ *et al.*, 2012).

Um aspecto novo do estudo seria a coingestão de proteína e aminoácidos com CHO e GOR como parte de uma bebida mista de macronutrientes como a BALL. Estudos anteriores (CHURCHWARD-VENNE *et al.*, 2012; CHURCHWARD-VENNE *et al.*, 2014) mostram que doses maiores de LEU (5,0 g) pós-exercícios eram necessárias para atingir picos de concentrações sérica de leucina em comparação quando proteínas e aminoácidos isolados eram ingeridos. Além disso, foi reportado anteriormente, que a coingestão de proteína com macronutrientes adicionais atenuou o aumento nas concentrações pós-prandial de aminoácidos no sangue (BURKE *et al.*, 2012; STAPLES *et al.*, 2011).



Desta forma, a quantidade de ingestão de BALL no presente estudo visou uma suplementação aproximada daquelas em que tem sido demonstrado saturar a síntese da proteína muscular pós-exercício correspondendo a uma ingestão de leucina na ordem de 0,150 g/kg; ~10 g/h, atingindo também as recomendações para EAA (6-20 g) (ARETA *et al.*, 2013; ROWLANDS *et al.*, 2015).

#### **4.5.10. Avaliações bioquímicas sanguíneas**

Amostras de sangue foram feitas previamente ao início dos procedimentos de aquecimento para o exercício em protocolo SAFT90+, imediatamente ao seu término, assim como no seguimento de 2 h, 4 h e 24 h pós ingestão das bebidas experimentais.

Cuidados na fase pré-analítica, na obtenção das amostras sanguíneas, no processamento e transporte, descartes seguros de resíduos foram feitas seguindo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC, 2010). Amostras de sangue foram colhidas (~15 mL) da veia antecubital com os participantes na posição sentada com cateter tipo “scalp”. Cinco (5) mL de sangue foram coletados em dois tubos *vacutainer* (EDTA) para análise de leucócitos, suas subclasses e dez (10) mL sendo colocadas em tubos *vacutainer* contendo gel separador para análise bioquímica.

O plasma resultante foi colocado em *Eppendorf Tubes* em alíquotas múltiplas separadas e congelado a -80°C para posteriores análises de marcadores de danos musculares, marcadores imunológicos e marcadores hormonais. Para análises do hematócrito foi separado um mL de sangue a cada coleta e transferidas imediatamente para *eppendorfs*, de onde foram retirados 100 µL de sangue por meio de uma pipeta automática.

Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo profissional especializado em técnicas de punctura. Aspectos relacionados à biossegurança foram rigorosamente observados durante a obtenção das amostras sanguíneas e seu processamento. Técnicas de higienização, esterilização e assepsia foram respeitadas e previamente treinadas. Todos os materiais relacionados aos parâmetros sanguíneos foram

descartáveis, sendo o lixo hospitalar devidamente armazenado e, quando necessário, tratados por especialistas para descarte no meio ambiente.

Estes analisadores foram calibrados diariamente para controles e precisão de medidas de acordo com as recomendações do fabricante e diretrizes federais para os laboratórios de diagnóstico clínico. Teste da confiabilidade para os ensaios variou de 2 a 6% para tendo os ensaios individuais uma variação média de  $\pm 3\%$ .

Resumo dos parâmetros sanguíneos, faixa de normalidade, equipamento e detalhes dos procedimentos bioquímicos das técnicas laboratoriais segue no Quadro 4, abaixo. Para valores de normalidade clínica foram adotados os critérios segundo Henry (2013) e Nicoll *et al.* (2013).

**Quadro 4 – Metodologia da análise bioquímica.**

Parâmetro	Faixa de Normalidade	Equipamento	Kit	Método	%CV
Glicose	60 - 110 mg/dL	BS 2200 (Bioclin)	Bioclin Quibasa	Enzimático colorimétrico	1.5% - 2.6%
CK	24 - 195 U/L	BS 2200 (Bioclin)	Bioclin Quibasa	Cinético UV	1.2% - 2.2%
Cortisol	6,7 - 22,6 µg/dL	Unicel DXI 800 (Beckman Coulter)	Access Cortisol	Quimioluminescência	4.4-6.7%
Mb	menor ou igual 80 ng/mL	BNI (Dade Behring)	Flex® reagent cartridge MMB	Nefelometria	4% - 9.7%
Testosterona	175 – 781 ng/dL	Unicel DXI 800 (Beckman Coulter)	Access Testosterona	Quimioluminescência	3% - 9%
Insulina	1,9 – 23 µUI/mL	Unicell DXI 800 (Beckman Coulter)	Access Ultrasensitive Insulin	Quimioluminescência	2%-4.2
Leucócitos	4.500 - 11.000/mm <sup>3</sup>	Coulter T890	-	Impedância	<1.7%
Linfócitos	1.000 - 5.000/mm <sup>3</sup>	Contagem Manual	-	Impedância	<1.7%
Neutrófilos	1.800 - 7.000/mm <sup>3</sup>	Contagem Manual	-	Impedância	<1.7%
Hematócrito	41 - 53%	Coulter T890	-	Impedância	<1.9%

Nota: Faixa de normalidade para glicose sérica considerando faixa de valores para medidas casuais, segundo Nicoll *et al.* (2013). Faixa de normalidade para os demais parâmetros apoiados em Henry (2013). Coeficientes de variação intra-insaios (%CV) mostrado através do intervalo obtido pelos fabricantes nos ensaios de imprecisão.

Alterações no volume plasmático (delta,  $\Delta PV$ ) foram estimadas a partir da concentração de hemoglobina no sangue e hematócrito, descritos nos relatórios de exames clínicos, utilizando critérios propostos por Dill e Costill (1974) através da Equação 4:

**Equação 4 – Cálculo das alterações no volume plasmático**

$$\Delta VP = [(Hb1/Hb2) * (100 - HTC2/100 - HTC1) - 1] * 100$$

Onde Hb1, HTC1 são valores pré-exercício e Hb2, HTC2 são valores correspondentes a cada tempo da fase de recuperação.

**4.5.11. Avaliações da urina e de retenção hídrica**

A urina imediatamente antes, durante e imediatamente após o protocolo SAFT90+, e durante as quatro horas de recuperação foi coletada em bolsa própria com capacidade de 2000 mL. Com essa amostra foi aferido o volume, retenção de líquidos e a gravidade específica da urina (GEU). A GEU foi avaliada com sub-amostras de (50 mL) de urina, por um refratômetro óptico (LF Equipamentos, modelo 107/3, São Paulo, Brasil), calibrado com água destilada a cada leitura. A estimativa do grau de desidratação pela GEU seguiu a proposta de Casa *et al.* (2000), que aponta os seguintes níveis descritos na Tabela 3.

**Tabela 3 – Gravidade específica da urina e graus de desidratação.**

<b>Unidade Arbitrária</b>	<b>Classificação</b>
< 1.010	Bem hidratado
1.010 – 1.020	Desidratação mínima
1.021 – 1.030	Desidratação significativa
> 1.030	Desidratação grave

Fonte: Adaptado de Casa *et al.* (2000).

O potencial de reidratação de cada bebida foi determinado examinando-se a fração (%) do volume de fluidos retidos do total de líquidos ingeridos durante todo o intervalo experimental, calculado pela Equação 5 (DESBROW *et al.*, 2014; VOLTERMAN *et al.*, 2014):

#### **Equação 5 – Cálculo de retenção de fluidos**

$$\text{Retenção de fluidos \%} = \left[ \frac{\text{volume de líquido total consumido} - \text{produção de urina total}}{\text{volume de líquido total consumido}} \right] \times 100$$

#### **4.5.12. Avaliações subjetivas de monitoramento recuperativo**

Para atender o escopo de monitoramento das percepções de esforço, dor muscular, recuperação e sede foram monitoradas como pré-exercício, pós-exercício, 2 h, 4 h e 24 h pós-ingestão, adotando-se os seguintes instrumentos:

- Escala de BORG (BORG, 1982), (ANEXO 5);
- Para a percepção da dor muscular total do corpo e percepção da recuperação, os voluntários responderam:
  - i. Escala *Psicofísica de dor* (IMPELLIZZERI *et al.*, 2007), (ANEXO 6);
  - ii. *Visual Analogue Scale* (VAS)(GIFT, 1989), (ANEXO 7);
  - iii. Escala de Recuperação Percebida (LAURENT *et al.*, 2011), (ANEXO 8);
- Escala de sensação de sede (ENGELL *et al.*, 1987), (ANEXO 9).

#### **4.5.13. Análise sensorial e conforto gastrointestinal**

Buscando verificação da aceitação sensorial da bebida experimental, os procedimentos foram seguidos obtendo medidas nos momentos pós-ingestão das alíquotas programadas individualmente (imediatamente pós-exercício, 45 min e 75 min pós-exercício).

A análise sensorial é a disciplina científica que evoca, mede, analisa e interpreta reações das características de alimentos e materiais como são percebidas pelos

órgãos da visão, olfato, gosto, tato e audição (ABNT, 1993). Portanto, para atender o escopo de avaliação sensorial, foi utilizado o método afetivo quantitativo para se verificar a aceitabilidade das bebidas achocolatadas pelos voluntários da presente pesquisa. Essa abordagem visou aproximar do mercado consumidor potencial (faixa etária, sexo) em uso específico (esporte, pós-exercício), sendo estes não relacionados com treinamento para habilidades sensoriais discriminatórias entre amostras e seus atributos (MINIM, 2006). Porém, foi reconhecido que tal amostra não foi representativa de uma população maior e não obedeceu aos critérios de seleção e treinamento de provadores como pede a ciência da análise sensorial (ABNT, 1993).

Conceitualmente, as provas afetivas consistem na manifestação subjetiva do “juiz consumidor” sobre o produto testado, demonstrando se tal produto agrada ou desagrade, se é aceito ou não (ABNT, 1993). A análise sensorial é a percepção global obtida pela interação dos sistemas sensoriais: olfativo, gustativo, tátil, auditivo e visual (DUTCOSKY, 2013). Esses sistemas avaliam os atributos dos alimentos, ou seja, suas propriedades sensoriais. Os atributos das bebidas achocolatadas escolhidos para a análise, segundo ABNT (1993), foram:

- **impressão geral e aparência:** quando o produto possui uma aparência e uma cor esperadas que são associadas às reações pessoais de aceitação, indiferença ou rejeição. A forma geralmente está relacionada à forma natural, ou a uma forma comercial consagrada culturalmente.
- **consistência:** componente da textura que pode ser considerada o conjunto de todas as propriedades reológicas e estruturais (geométricas e de superfície) de um alimento, perceptíveis pelos receptores mecânicos, táteis e eventualmente pelos receptores visuais e auditivos. A textura se manifesta quando o alimento sofre uma deformação (quando é mordido, prensado, cortado, etc), e é através dessa interferência na integridade do alimento que se pode ter noção da resistência, coesividade, fibrosidade, granulabilidade, aspereza, crocância, entre outras.
- **sabor:** é um atributo complexo, definido como experiência mista, mas unitária de sensações olfativas, gustativas e táteis percebidas durante a degustação. O sabor é influenciado pelos efeitos táteis, térmicos, dolorosos e/ou sinestésicos, e essa inter-relação de características é o que diferencia um alimento do outro.

O grau de aceitação do produto, pelo método afetivo quantitativo, ocorreu pela escala hedônica intervalada e estruturada de nove pontos, numérica e verbal, sendo também bipolar por possuir escala com descrições opostas nas extremidades (ABNT, 1998). A escala estruturada utilizada seguiu modelo de Meilgaard *et al.* (2007, ANEXO 10).

Além do objetivo principal da análise sensorial na presente investigação supracitado, um objetivo secundário foi medir a aceitação afetiva quantitativa das bebidas achocolatadas na linha de tempo de ingestão com três momentos de avaliação no consumo pós-exercício. Tal abordagem visou aproximar das condições práticas reais quanto ao uso recomendado de consumo da BALL como o adotado no presente estudo (~700 mL).

Para o cálculo do Índice de Aceitabilidade do produto foi adotada a Equação 6, abaixo, segundo Dutcosky (2013):

**Equação 6 – Cálculo do Índice de Aceitabilidade (IA):**

$$IA(\%) = A \times 100/B$$

onde A = nota média obtida para o produto, e B = nota máxima dada ao produto.

Como ponto de corte para o IA foi adotado o escore  $\geq 70\%$ , sendo o mesmo considerado como de boa repercussão (DUTCOSKY, 2013).

Visando observar surgimento de sintomas gastrointestinais com o exercício e a ingestão de bebidas achocolatadas, como inchaço, náusea, flatulência e refluxo, foi utilizado a escala de sensação de conforto gastrointestinal (JEUKENDRUP *et al.*, 2000), (ANEXO 11). A escala é intervalada e estruturada de 10 pontos, numérica e verbal, sendo considerado sintomas “não grave” quando uma pontuação inferior a 5 foi observada (JEUKENDRUP *et al.*, 2000).

Ambas aplicações dos instrumentos e realização dos testes foram realizadas após consumo das alíquotas, simulando o uso real, após exercício físico, em sala reservada preparada com questionário para respostas.

#### **4.6. Orientações adicionais aos voluntários**

No primeiro contato com os voluntários e sempre que possível eles foram orientados verbalmente sobre as seguintes recomendações: i) evitar o uso de qualquer tipo de medicamento ou suplemento durante a participação na pesquisa e, caso utilizem, que avisem aos responsáveis pelo estudo com antecedência; ii) abster-se do uso de tabaco, álcool ou cafeína, 48 h antes de qualquer situação experimental; iii) comunicar aos pesquisadores responsáveis sobre imprevistos como doenças, lesões e demais problemas; iv) manter hábito alimentar e de atividade física; e v) manter a boa qualidade de sono durante a pesquisa.

#### **4.7. Análise estatística**

Os dados foram apresentados como média e desvio-padrão. Normalidade da distribuição para todas as variáveis foi verificada com o teste de *Shapiro-Wilk*. Teste *t* foi utilizado para comparar as variáveis pré-exercícios como as antropométricas, ingestão nutricional, e as pós-exercícios como a intensidade de esforço durante protocolo de indução de fadiga e retenção de fluidos entre os tratamentos. Anova de *design* misto (Anova fatorial 2x3; 2x4 e 2x5, intra e inter sujeitos; tratamento × tempo de amostragem) foram utilizados para as variáveis com múltiplos pontos temporais. O teste de *Mauchly* foi consultado e correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada caso esfericidade tenha sido violada.

Efeitos de interação (tratamento x tempo) e efeitos principais foram investigados usando comparações de pares com ajuste do intervalo de confiança por Bonferroni. Para mensuração do “tamanho do efeito” foi adotado *Eta-squared statistic* ( $\eta^2$ ), com posterior classificação de sua força segundo os valores de 0,01, 0,06 e maior que 0,15, como de pequena, média e grande força, respectivamente (COHEN, 1988).

Quando oportuno, cálculo delta foi utilizado sobre as respostas pré e pós-exercício, subtraindo das respostas subsequentes.

Para complementar a inferência quando houve diferença significativa entre os tratamentos nas variáveis bioquímicas, as probabilidades de significado clínico ou prático (delta percentual  $\bar{x} \div \pm 90\% \text{ IC}$ ) foram avaliados qualitativamente como se segue: <1% quase certamente não, 1-5% muito improvável, 5-25% improvável, 25-75% possivelmente, 75-95% provavelmente, 95-99% “muito provavelmente”, > 99% quase certamente (HOPKINS *et al.*, 2002). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software IBM SPSS® 21 for Windows (Chicago, IL, EUA). Significância estatística foi fixada em  $p < 0,05$ .

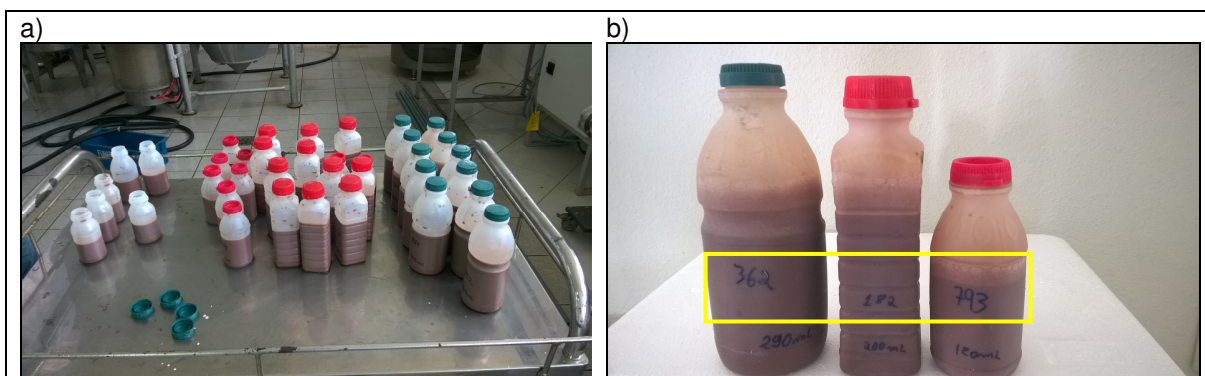


## 5 RESULTADOS

### 5.1. Processo piloto das bebidas achocolatadas

Houve cumprimento dos critérios macroscópicos e microscópicos em inspeção visual, atestando assim que o produto não continha substâncias estranhas de qualquer natureza. A formulação intentada de BALL apresentou problemas na saturação formando “corpo de fundo” em vida de prateleira de dois dias. Possivelmente tal fato ocorreu em virtude da quantidade de solutos (achocolatado em pó, açúcar e proteínas), principalmente pela baixa solubilidade da L-leucina. No entanto, o “corpo de fundo” formado foi passível de correção com a proposta “agite antes de beber”. Na Figura 7 nota-se a etapa de envase das bebidas achocolatadas para tratamento experimental pós-exercício na planta industrial INOVALEITE da UFV, assim como o produto final envasado em três diferentes volumes.

**Figura 7 – Etapa de envase na fabricação das bebidas achocolatadas.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: Na figura a, etapa de envase. Em b, produto final acabado, envasado em três diferentes volumes (50%, 30% e 20%, da esquerda para direita, respectivamente). Nota-se, em detalhe destacado por retângulo amarelo, a codificação aleatória de três dígitos como tentativa de blindagem para controle duplo-cego durante a experimentação.

### 5.2. Segurança alimentar

No Brasil, não há legislação de risco microbiológico específico para a bebida proposta quando se considera sua categorização pela RDC n.º 18/2010 (BRASIL, 2010). Nessa Resolução, em seu Art. 13, há direcionamento para outros Regulamentos e Resoluções no que tange os requisitos técnicos para aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia; contaminantes; características macroscópicas, microscópicas e microbiológicas; rotulagem geral de alimentos

embalados; de rotulagem nutricional de alimentos embalados; informação nutricional complementar, quando houver, e embalagens e equipamentos.

Na Tabela 4, estão expressos os resultados das análises microbiológicas das bebidas no T1 e T2 e respectivas referencias para padrão microbiológico da legislação brasileira.

**Tabela 4 – Análise microbiológica das amostras de lote das bebidas achocolatadas.**

Tempo	Amostra	Mesófilos (UFC/mL)	Coliformes (UFC/mL)	Coliformes 45°C ( <i>E. Coli</i> ; UFC/mL)	<i>Salmonella sp/25g</i>
T1	174 (BACH)	1,2x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	112 (BACH)	1,3x10 <sup>2</sup>	0	Ausente	Ausente
	473 (BACH)	1,2x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	174 (BACH)	1,1x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	310 (BACH)	1,3x10 <sup>2</sup>	0	Ausente	Ausente
	386 (BALL)	1,3x10 <sup>2</sup>	1,6x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	427 (BALL)	1,4x10 <sup>2</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	464 (BALL)	1,1x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	427 (BALL)	1,2x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	441 (BALL)	1,1x10 <sup>2</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
T2	193 (BACH)	1,0x10 <sup>2</sup>	1,2 x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	395 (BACH)	0,8x10 <sup>2</sup>	0	Ausente	Ausente
	134 (BACH)	1,0x10 <sup>2</sup>	0	Ausente	Ausente
	337 (BACH)	0,8x10 <sup>2</sup>	1,0 x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	354 (BACH)	0,7x10 <sup>2</sup>	0	Ausente	Ausente
	421 (BALL)	1,2x10 <sup>2</sup>	0,8 x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	467 (BALL)	1,0x10 <sup>2</sup>	0,7 x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	367 (BALL)	1,1x10 <sup>2</sup>	1,3 x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	122 (BALL)	1,0x10 <sup>2</sup>	0,6 x10 <sup>2</sup>	Ausente	Ausente
	226 (BALL)	0,9x10 <sup>2</sup>	0	Ausente	Ausente
<b>Padrão*</b>		<b>1,5x10<sup>5</sup> (UFC/mL)</b>	-	<b>10 (NMP/mL)</b>	-
<b>Padrão**</b>		-	-	<b>5x10<sup>3</sup> (NMP/mL)</b>	<b>Ausente</b>
<b>Padrão***</b>		-	-	<b>5 (NMP/mL)</b>	<b>Ausente</b>

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: T1= tempo imediatamente após fabricação; T2=tempo com cinco dias; BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; \*Instrução Normativa n.º. 16, de 23 de agosto de 2005, Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea; \*\* Resolução RDC n.º. 12, de 02 de janeiro de 2001, Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos; \*\*\* Resolução RDC n.º. 12, de 02 de janeiro de 2001, Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. T1=tempo de amostragem imediatamente após sua fabricação e T2= com cinco dias após fabricação.

Os resultados evidenciam que a BALL atende aos parâmetros exigidos pela legislação para bebida láctea pasteurizada Instrução Normativa MAPA n.º 16/2005

(BRASIL, 2005), produto considerado como referência por semelhança na ausência de legislação específica para “leite com chocolate suplementado”, resultando em um produto com boa qualidade higiênico-sanitária sendo indicativa para consumo humano por possuir condições sanitárias satisfatórias. Segundo a Resolução RDC n.º 12/2001 (BRASIL, 2001), poderemos concluir que o "produto ou lote processado de BALL e BACH estavam de acordo com os padrões legais vigentes".

### 5.3. Categorização alimentar frente a legislação brasileira

Como a intenção do protótipo formulado é atender necessidades alimentares de atletas, a Resolução de referência é a RDC n.º 18/2010 (BRASIL, 2010). Nela está estabelecida a classificação, designação, requisitos de composição e de rotulagem da categoria “Alimentos para Atletas”. Assim, ambas bebidas achocolatadas podem ser categorizadas como “suplemento para substituição parcial de refeições” de atletas (Quadro 5, abaixo).

**Quadro 5 – Bebidas achocolatadas experimentais e constituição regulamentar de suplementos para substituição parcial de refeições de atletas segundo RDC n.º 18/2010.**

<b>Categoria</b>	<b>BACH (200 mL)</b>	<b>BALL (200mL)</b>	<b>RDC18/2010 (Limites)</b>
Valor Energético	204 kcal	204 kcal	300 kcal por porção
Carboidratos	68%	68%	50-70% kcal total
Proteínas	23%	23%	12-30% kcal total
Gorduras totais	14%	14%	Até 30% kcal total
Gorduras saturadas	9%	9%	Até 10% kcal total
Gorduras trans	0%	0%	Até 1% kcal total
Fibra Alimentar	P	P	NE
PDCAAS	NA	NA	Maior que 0,9
Minerais	P (>15%)	P (>15%)	*
Vitaminas	P (>15%)	P (>15%)	*

Fonte: dados da pesquisa

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; para o cálculo da informação nutricional, utilizaram-se as informações contidas nas embalagens das matérias-primas utilizadas. P=presente; NE=não especificado; NA; não analisado. PDCAAS deve estar de acordo com a metodologia de avaliação recomendada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO); \*=não especificado na RDC n.º 18/2010, havendo apontamento para Portaria n.º 31, de 13 de janeiro de 1998 (é permitida, também, a adição de vitaminas e de minerais desde que 100 mL ou 100g do produto, pronto para o consumo, forneçam no mínimo 7,5% da IDR de referência, no caso de líquidos e 15% da IDR de referência, no caso de sólidos).

Na Tabela 5 é apresentada a informação nutricional das bebidas produzidas, considerando a informação nutricional esperada a partir da estimativa obtida na rotulagem de cada ingrediente utilizado na formulação.

**Tabela 5 – Informação nutricional das bebidas achocolatadas experimentais.**

	<b>BACH</b>	<b>%VD (*)</b>	<b>BALL</b>	<b>%VD (*)</b>
Valor Calórico (kcal)	204	10%	204	10%
Carboidratos (g)	35	12%	35	12%
*Glicose (g)	9	0%	9	0%
*Lactose (g)	0	0%	0	0%
*Galactose (g)	5	0%	5	0%
*Maltodextrina (g)	21	7%	21	7%
Proteínas (g)	12	13%	12	12%
*L-Leucina (g)	0.5	-	3.5	-
*Colágeno Hidrolisado (g)	3	-	0	-
Gorduras Totais (g)	3.3	7%	3.3	7%
Gorduras Saturadas (g)	2	9%	2	9%
Gorduras Trans (g)	0	0%	0	0%
Fibra Alimentar (g)	3.2	13%	3.2	13%
Sódio (mg)	154	6%	154	6%
Cálcio (mg)	218	22%	218	22%
Vitamina A (mcg)	491	81%	491	81%
Vitamina D (mcg)	4.06	81%	4.06	81%
Vitamina B1 (mg)	1.008	81%	1.008	81%
Vitamina B2 (mg)	1.064	84%	1.064	84%
Vitamina B6 (mg)	1.064	81%	1.064	81%
Ácido Fólico (mcg)	196	49%	196	49%
Vitamina B12 (mcg)	1.96	81%	1.96	81%

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; Valores estimados para 200 mL; (\*) valores diários de referencia com base em uma dieta de 2.000 kcal.

Não foram realizados estudos bromatológicos da composição centesimal bem como avaliação nutricional, tais como: quociente de eficiência protéica e quociente líquido de eficiência proteica, nitrogênio excretado nas fezes, digestibilidade proteica verdadeira, com posteriores cálculos dos escores de aminoácidos essenciais corrigidos pelas digestibilidades verdadeiras (PDCAAS), o balanço de massas da

BALL e por sua base láctea, indica, provavelmente, que a formulação atendeu completamente às recomendações quanto aos aminoácidos essenciais da Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO/UNU, 2002).

Para possibilidades de inovação no mercado brasileiro, poderá ser considerada na BALL:

- i) produto final pronto para beber (refeição parcial líquida);
- ii) maior teor de L-leucina (~2x produto comercial convencional) e proporção (3:1) ideal entre CHO/PRO capazes de promover uma recuperação mais rápida e eficaz no pós-treino;
- iii) maior biodisponibilidade de cálcio (via vitamina D e caseinatos-caseinafosfopeptideo);
- iv) baixo teor de gordura;
- v) isenta de lactose;
- vi) não contém glúten; e
- vii) alto teor de cacau (40%).

#### **5.4. Caracterização pré-exercício e pós-exercício dos grupos experimentais**

Para o estudo foram recrutados 20 voluntários, estando dentro do estimulado para cálculo amostral. A intenção com esse tamanho amostral é que fosse possível atingir tamanho amostral calculado e equalizar possíveis perdas amostrais. Após assinatura de termo de consentimento, os procedimentos experimentais seguiram o planejado. Houve perda amostral de dois voluntários, um para cada tratamento, para as medidas de 24 h.

As etapas de caracterização das amostras, assim com a verificação do efeito hipotético da BALL na recuperação pós-exercício foram realizadas em duas etapas (agosto e dezembro de 2015), de forma contrabalanceada, nos meses de agosto e dezembro de 2015, utilizando as instalações do Laboratório de Performance Humana (LAPEH) no Departamento de Educação Física da UFV.

Nenhum problema foi relatado e identificado no recordatório para manutenção dos hábitos alimentares nos três dias antecedentes e nas 24 h que sucedeu o dia experimental. Na etapa de jejum, cada participante recebeu a mesma composição de alimentos quantificadas em relação a sua MC.

Essa refeição pré-exercício foi correspondente a 18% da adequação do percentual de macronutrientes em relação ao valor energético total (VET), sendo esta calculada com base nas faixas de distribuição aceitáveis de macronutrientes (AMDR). A porcentagem e quantidade de cada macronutriente da refeição pré-exercício (café da manhã) foi respectivamente:  $17 \pm 1\%$  ( $11 \pm 1$  g) de proteínas,  $54 \pm 0,2\%$  ( $35 \pm 0,3$  g) de carboidratos,  $24 \pm 1,2\%$  ( $7 \pm 0,5$  g) de gordura, correspondendo a um conteúdo calórico total de  $254 \pm 3$  kcal para cada voluntário.

Os participantes foram designados aleatoriamente por um técnico do laboratório após o protocolo de exercício e indução de fadiga similar ao futebol (SAFT90+) para composição de um dos grupos de tratamento experimental (BACH ou BALL). O SAFT90+ foi realizado com caracterização climática em  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $50 \pm 2\%$  UR na primeira etapa, e com  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $76 \pm 1\%$  UR na segunda etapa de coletas de dados, representando média de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $63 \pm 1\%$  UR, estando dentro da faixa de conforto térmico e baixo risco (KATCH *et al.*, 2008).

Os participantes possuíam necessidade estimada de energia média de  $1943 \pm 334$  kcal, distribuídos nos macronutrientes CHO ( $280 \pm 43$  g/d), PRO ( $84 \pm 28$  g/d) e GOR ( $54 \pm 11$  g/d), não havendo diferenças significativas entre os voluntários que compuseram os dois de tratamentos experimentais ( $p > 0,05$ , TABELA 6, abaixo).

Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para idade, MCI, %GC, estatura, distância percorrida no Yo-Yo Test IR2 e  $\text{VO}_{2\text{max}}$  entre os grupos BACH e BALL (Tabela 6). Houve também similaridade ( $p > 0,05$ , Tabela 6) no estado de hidratação através da Gravidade Específica da Urina (GEU) para entrada em protocolo de indução de fadiga (SAFT90+).

**Tabela 6 – Característica pré-exercício e pós-exercício dos grupos experimentais.**

	<b>BACH (n=10)</b>	<b>BALL (n=10)</b>	<b>p valor</b>
<b>Característica pré-exercício</b>			
Idade (anos)	23 ± 2	23 ± 3	0,580
Massa corporal inicial (kg)	74 ± 14	73 ± 7	0,798
% Gordura Corporal (%GC)	12 ± 5	12 ± 4	0,993
Estatura (cm)	174 ± 5	176 ± 5	0,383
YoYo IR (m)	578 ± 142	610 ± 180	0,625
VO <sub>2max</sub> (ml.kg.min <sup>-1</sup> )	53 ± 2	54 ± 2	0,210
Requerimento energético (kcal)	1919 ± 512	1967 ± 398	0,818
Ingestão de Carboidratos (g)	278 ± 80	282 ± 60	0,908
Ingestão de Gorduras (g)	50 ± 10	59 ± 14	0,118
Ingestão de Proteínas (g)	90 ± 46	78 ± 14	0,445
Gravidade Específica da Urina	1009 ± 5	1008 ± 8	0,902
<b>Característica pós-exercício (SAFT90+)</b>			
Intensidade de Esforço (%FCM)	86 ± 6	85 ± 6	0,927
Esforço percebido (Borg)	17 ± 3	17 ± 2	0,931

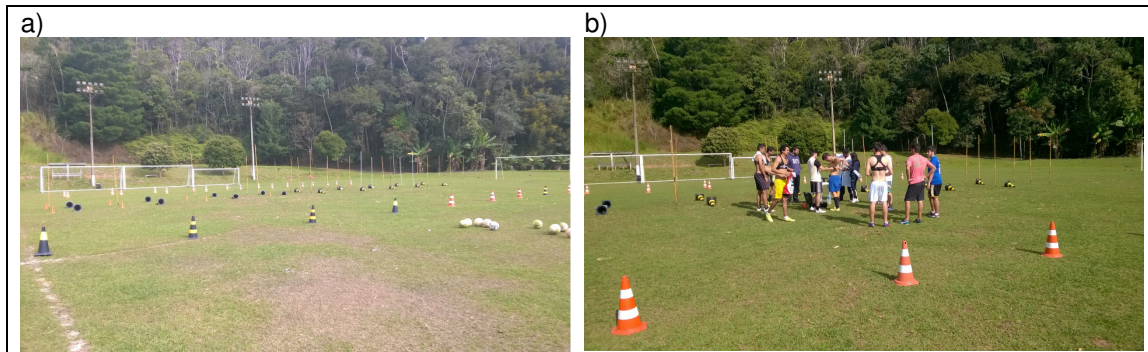
Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovel *et al.* (2008); os valores são apresentados como média ± DP. VO<sub>2max</sub> estimado pelo YoYo IR2 segundo Krustup *et al.* (2006).

A intensidade de esforço (%FCM) e esforço percebido no SAFT90+ também foi similar entre os voluntários que compuseram os grupos experimentais ( $p > 0,05$ , Tabela 6).

Na Figura 8, pode ser verificado registro fotográfico do layout e preparação para execução do SAFT90+. Nota-se que, a média geral da intensidade de esforço observada ( $85 \pm 6\%$  FCM) é similar a jogos de futebol (DELLAL *et al.*, 2012), reforçando a validade do protocolo como instrumento de simulação de carga metabólica e indução de fadiga correspondente uma partida oficial de futebol.

**Figura 8 – Ilustração do protocolo de exercício que simula partida de futebol (SAFT90+).**



Fonte: dados da pesquisa.

Na figura “a” layout para aplicação do protocolo. Em “b”, voluntários em preparação para o protocolo. SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovel *et al.* (2008).

Após SAFT90+, os voluntários fizeram a ingestão das bebidas de tratamento (BACH e BALL) consumidas conforme descrito na seção 4.5.9. O volume de ingestão total médio foi de  $630 \pm 80$  mL, sendo  $315 \pm 40$  mL imediatamente após indução de fadiga (pós-exercício),  $189 \pm 24$  mL no tempo 45 min e  $126 \pm 16$  mL no tempo 75 min. A média total calórica de ingestão foi de  $659 \pm 74$  kcal. Na Figura 9 é demonstrado o registro fotográfico da ingestão de BALL.

**Figura 9 – Voluntário fazendo ingestão de bebida acholada experimental durante a fase de recuperação pós-exercício.**



Fonte: dados da pesquisa.



## 5.5. Análise sensorial

Na Tabela 7, é apresentado o índice de aceitabilidade (IA) verificado para as bebidas formuladas para tratamento experimental. Nota-se que o IA esteve entre 84% e 90%, em cada atributo avaliado da escala de aceitação (impressão geral, aparência, consistência e sabor).

**Tabela 7 – Índice de aceitabilidade das bebidas achocolatadas na ingestão pós-exercício.**

Atributos	Notas		Índice de Aceitabilidade (%)	
	BALL	BACH	BALL	BACH
Impressão geral	8	8	86	90
Aparência	8	7	86	84
Consistência	8	8	88	87
Sabor	8	8	84	84

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; valores obtidos a partir da média de todos momentos de ingestão. BACH, n=10; BALL, n=10.

Quantitativamente, considerando os descritores da escala de aceitação, as bebidas alcançaram escores de percepção que as classificaram com maioria das respostas entre “gostei muito” e “gostei extremamente” para os atributos impressão geral, aparência e consistência (Tabela 8).

Para sabor, a BALL obteve a maioria da classificação em “gostei muito” (50%), ao passo que a BACH obteve classificação como “gostei moderadamente” (60%) para a maioria dos voluntários.

**Tabela 8 – Avaliação da preferência global das bebidas achocolatadas experimentais na ingestão pós-exercício.**

<b>Atributos Aceitação</b>	<b>Avaliação Qualitativa</b>	<b>BALL</b>	<b>BACH</b>
Impressão Geral	Gostei extremamente	30%	0%
	Gostei muito	50%	80%
	Gostei moderadamente	20%	10%
	Gostei ligeiramente	0%	10%
Aparência	Gostei extremamente	30%	30%
	Gostei muito	40%	40%
	Gostei moderadamente	0%	10%
	Gostei ligeiramente	30%	10%
	Desgostei ligeiramente	0%	10%
Consistência	Gostei extremamente	30%	20%
	Gostei muito	40%	50%
	Gostei moderadamente	20%	20%
	Gostei ligeiramente	10%	10%
Sabor	Gostei extremamente	10%	20%
	Gostei muito	50%	20%
	Gostei moderadamente	30%	60%
	Gostei ligeiramente	10%	0%

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; valores apresentados como percentual relativo obtidos a partir da mediana de todos momentos de ingestão. BACH, n=10; BALL, n=10.

Objetivando a análise de aceitação na linha de tempo, foi realizado Anova Fatorial 2x3 (tratamento recebido= BACH ou BALL; momento de ingestão= imediatamente pós, 45 min e 75 min) observados para cada atributo compreendido da escala de aceitação afetiva na escala hedônica de nove pontos.

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito grande para “impressão geral”,  $F(2,32)=0,290$ ,  $p=0,673$ ,  $\eta^2=0,16$ ; com tamanho do efeito pequeno para “aparência”,  $F(2,32)=0,218$ ,  $p=0,805$ ,  $\eta^2=0,012$ ; com tamanho do efeito pequeno para “consistência”,  $F(2,32)=0,186$ ,  $p=0,831$ ,  $\eta^2=0,01$ ; e com tamanho do efeito pequeno para “sabor”,  $F(2,32)=0,053$ ,  $p=0,948$ ,  $\eta^2=0,003$ . Tais resultados demonstram comportamento de respostas similares entre

as bebidas na linha do tempo para todos critérios da escala de aceitação. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* em “impressão geral e sabor” ( $p=0,010$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicado para interpretação.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni não demonstraram diferenças significativas inter e intra-sujeitos para todos os critérios da escala de aceitação afetiva ( $p>0,05$ ; Tabela 9).

**Tabela 9 – Escores da aceitação afetiva dos atributos das bebidas achocolatadas de tratamento experimental na linha de tempo de ingestão pós-exercício.**

Atributos	Tempo de Ingestão	BALL	BACH	F	p valor	$\eta^2$
Impressão Geral	Imediatamente pós	7.9±0.6	8.2±0.6	1,246	0,279	0,07
	45 min	7.8±0.8	8.1±0.7	0,771	0,391	0,04
	75 min	7.7±0.7	7.8±0.4	0,158	0,696	0,01
Aparência	Imediatamente pós	7.8±1	7.7±1.6	0,028	0,868	0,00
	45 min	7.7±1.3	7.5±1.8	0,085	0,775	0,00
	75 min	7.6±1.2	7.6±1.3	0,000	1,000	0,00
Consistência	Imediatamente pós	8±0.7	7.9±0.9	0,083	0,777	0,00
	45 min	7.9±1	7.7±1.1	0,189	0,669	0,01
	75 min	7.9±1	7.9±0.9	0,000	1,000	0,00
Sabor	Imediatamente pós	7.9±0.7	7.8±0.9	0,072	0,791	0,00
	45 min	7.6±0.8	7.6±1	0,000	1,000	0,00
	75 min	7.7±0.9	7.6±0.8	0,062	0,806	0,00

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; os valores são apresentados como média ± DP. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni intra-sujeitos ( $p<0,05$ ). BACH, n=10; BALL, n=10.

## 5.6. Sensação de conforto gastrointestinal

Abaixo segue a descrição dos resultados estatísticos obtidos através de Anova Fatorial 2x4 (tratamento recebido= BACH ou BALL; e tempo= pré- e pós-exercício, pós-ingestão 2 h e 4 h) observados para cada critério compreendido como sensação de conforto gastrointestinal (inchaço, náusea, flatulência e refluxo).

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito médio para “náusea”  $F(3,51)=2,928$ ,  $p=0,071$ ,  $\eta^2=0,15$ ; com tamanho do efeito pequeno para “flatulência”  $F(3,51)=0,681$ ,  $p=0,496$ ,  $\eta^2=0,03$ ; e com tamanho do efeito médio para “refluxo”  $F(3,51)=1,651$ ,  $p=0,189$ ,  $\eta^2=0,08$ . Isso demonstra comportamento de respostas similares entre os tratamentos desde fase pré-exercício até fase final do tratamento com as bebidas na linha do tempo para esses critérios. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* para “náusea” e “refluxo” ( $p=0,001$ ) e “flatulência” ( $p=0,005$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicado para interpretação.

Para “inchaço”, houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito grande,  $F(3,51)=5,049$ ,  $p=0,004$ ,  $\eta^2=0,23$ , demonstrando comportamento de respostas diferentes entre os grupos experimentais na linha do tempo.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas entre os grupos experimentais na linha de tempo para o momento pós-exercício para o critério “inchaço” com tamanho de efeito grande ( $p<0,05$ ;  $\eta^2=0,27$ ), assim como diferenças intra-sujeitos na linha de tempo para BALL ( $p<0,05$ ;  $\eta^2=0,49$ ; Tabela 10).

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni não demonstraram diferenças significativas inter e intra-sujeitos para “náusea” e “refluxo” ( $p>0,05$ ; Tabela 10). Houve diferenças significativas entre os grupos experimentais na linha de tempo para o momento pós-exercício para o critério “flatulência” com tamanho de efeito grande ( $p<0,05$ ;  $\eta^2=0,26$ ; Tabela 10).

Considerando que o ponto de corte de cinco pontos não foi extrapolado em nenhum dos critérios de conforto gastro-intestinal, os escores observados não comprometeram a sensação de conforto gastro-intestinal sendo classificados como sintomas “não graves” (JEUKENDRUP *et al.*, 2000).

**Tabela 10 – Percepção gastro-intestinal após ingestão das bebidas achocolatadas.**

<b>Critério</b>	<b>Tempo</b>	<b>BALL</b>	<b>BACH</b>	<b>F</b>	<b>p valor</b>	<b>η<sup>2</sup></b>
Inchaço	Pré-exercício	1.2±0.4 <sup>a</sup>	2.1±1.7	2,345	0,144	0,12
	Pós-exercício	1.4±0.7 <sup>b</sup>	3±1.7	6,447	0,021*	0,27
	2 h pós-ingestão	3.8±2.5 <sup>a,b</sup>	2.7±1.8	1,174	0,294	0,06
	4 h pós ingestão	2.4±1.6	2.2±1.8	0,097	0,760	0,00
Náusea	Pré-exercício	1.2±0.4	1.7±1.3	1,041	0,322	0,06
	Pós-exercício	1.1±0.3	3±2.8	3,942	0,063	0,19
	2 h pós-ingestão	2.4±2.4	1.7±1.1	0,822	0,377	0,05
	4 h pós ingestão	1.6±0.7	1.5±1	0,020	0,890	0,00
Flatulência	Pré-exercício	1.2±0.4	2.3±1.7	3,382	0,083	0,17
	Pós-exercício	1.2±0.7	2.9±1.9	6,218	0,023*	0,27
	2 h pós-ingestão	1.7±0.9	2.8±1.9	2,612	0,124	0,13
	4 h pós ingestão	1.6±0.9	2.3±1.8	1,300	0,270	0,07
Refluxo	Pré-exercício	1.2±0.4	1.2±0.4	0,013	0,912	0,00
	Pós-exercício	1±0	1.7±1.3	2,798	0,113	0,14
	2 h pós-ingestão	1.8±1.6	1.5±0.7	0,238	0,632	0,01
	4 h pós ingestão	1.2±0.4	1.2±0.4	0,013	0,912	0,00

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; valores apresentados como média ± DP. Letras iguais=diferença significativa na comparação pareada por ajustamento de Bonferroni (a, *p value*=0,007; b, *p valor*=0,018). \* diferença significativa entre tratamentos (*p*<0,05). Exercício= SAFT90+, Soccer-specific aerobic field test, adaptado de Lovel *et al.* (2008). BACH, n=10; BALL, n=10. N=9 para cada tratamento no momento 4 h pós-ingestão.

Durante o tratamento experimental pós-exercício com as bebidas achocolatadas foi observado percentualmente que maioria das respostas (70-80%) classificaram a sensação gastrointestinal com escores entre 1 e 2 para ambas as bebidas. Como apontado pela estatística inferencial para diferenças entre tratamentos (*p*<0,05), a representação percentual observada para “inchaço” apontou 40% das respostas entre os escores 4 a 6 para a BALL. Da mesma forma, houve representação de 30% para respostas entre os escores 3 a 6 para “flatulência” para a BACH.

### **5.7. Escalas subjetivas de esforço, dor e recuperação**

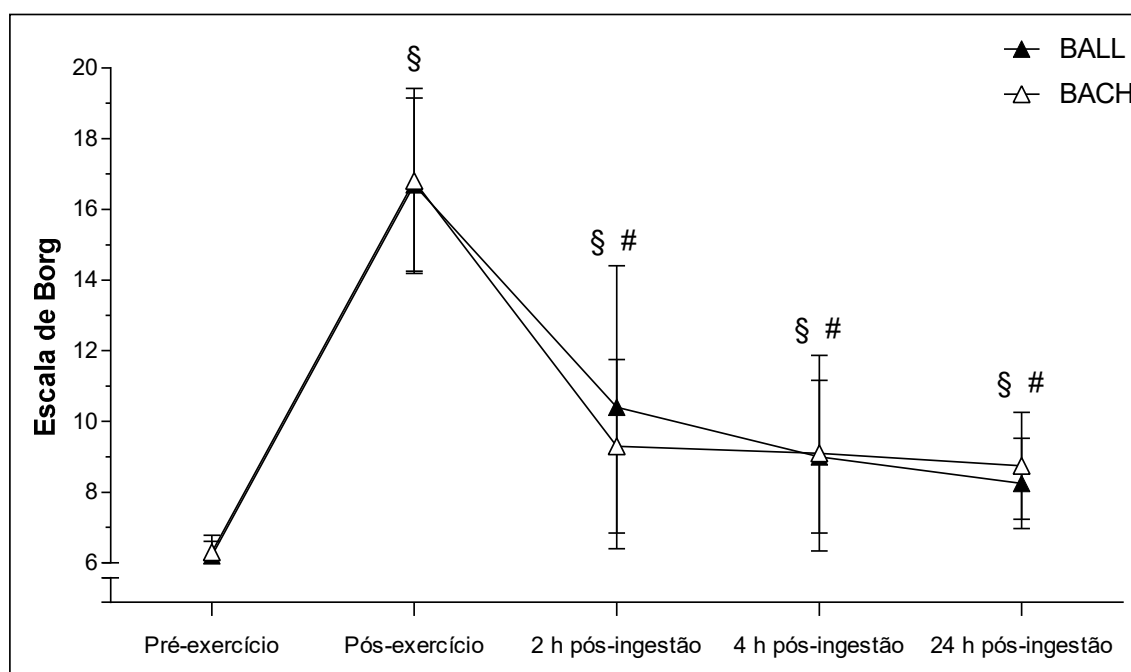
Abaixo segue a descrição dos resultados estatísticos obtidos através de Anova Fatorial 2x5 (tratamento recebido= BACH ou BALL; e tempo= pré- e pós-exercício, pós-ingestão 2 h e 4 h) observados para escalas subjetivas de esforço (Escala de Borg), dor (VAS e Psicofísica) e recuperação percebida.

### a) Intensidade de esforço percebido (escala de Borg)

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito pequeno,  $F(4,72)=0,387$ ,  $p=0,730$ ,  $\eta^2=0,021$ , demonstrando comportamento de respostas similares entre os grupos experimentais na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,001$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas do pós-exercício em relação ao pré-exercício, assim como do 2 h, 4 h e 24 h pós-ingestão em relação ao pós-exercício para ambos grupos experimentais ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 1). Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p>0,05$ ; GRÁFICO 1).

**Gráfico 10 – Escala de esforço percebido (escala de Borg) durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

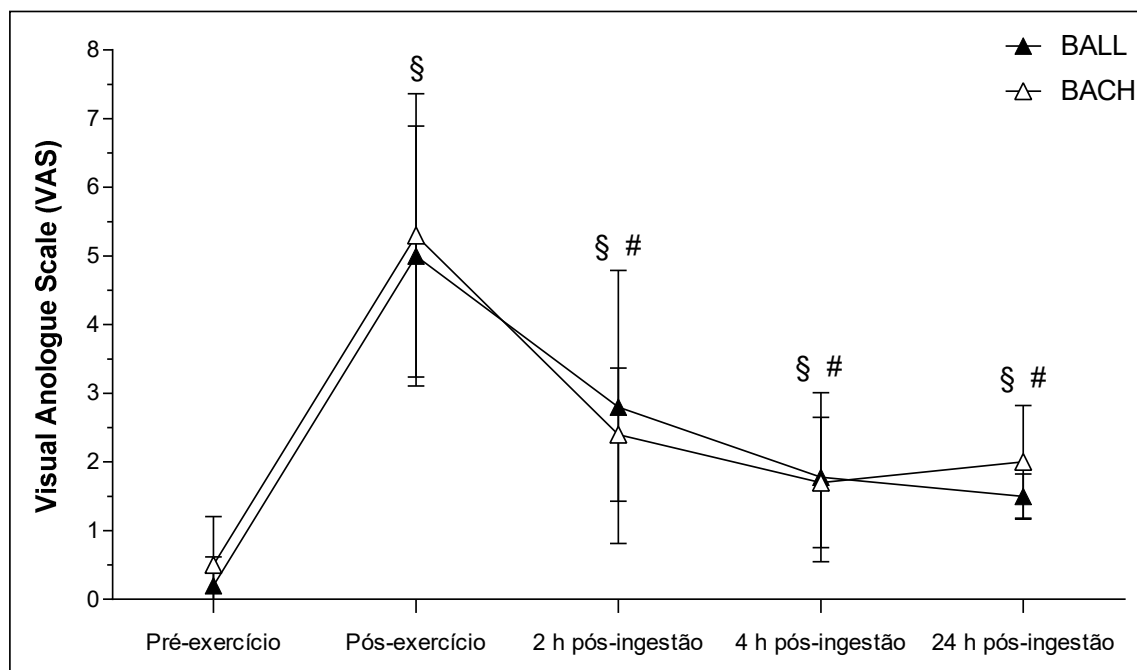
Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); § diferença significativa do pré-exercício, ambas as bebidas. # diferença significativa do pós-exercício, ambas as bebidas. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Valores apresentados como média  $\pm$  DP.  $p<0,05$ .

## b) Visual analogue scale (VAS)

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito pequeno,  $F(4,72)=0,545$ ,  $p=0,627$ ,  $\eta^2=0,03$ , demonstrando comportamento de respostas similares entre os grupos experimentais na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,001$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas do pós-exercício em relação ao pré-exercício, assim como do 2 h, 4 h e 24 h pós-ingestão em relação ao pós-exercício para ambos grupos experimentais ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 2). Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p>0,05$ ; GRÁFICO 2).

Gráfico 2 – Visual analogue scale (VAS) durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.



Fonte: dados da pesquisa.

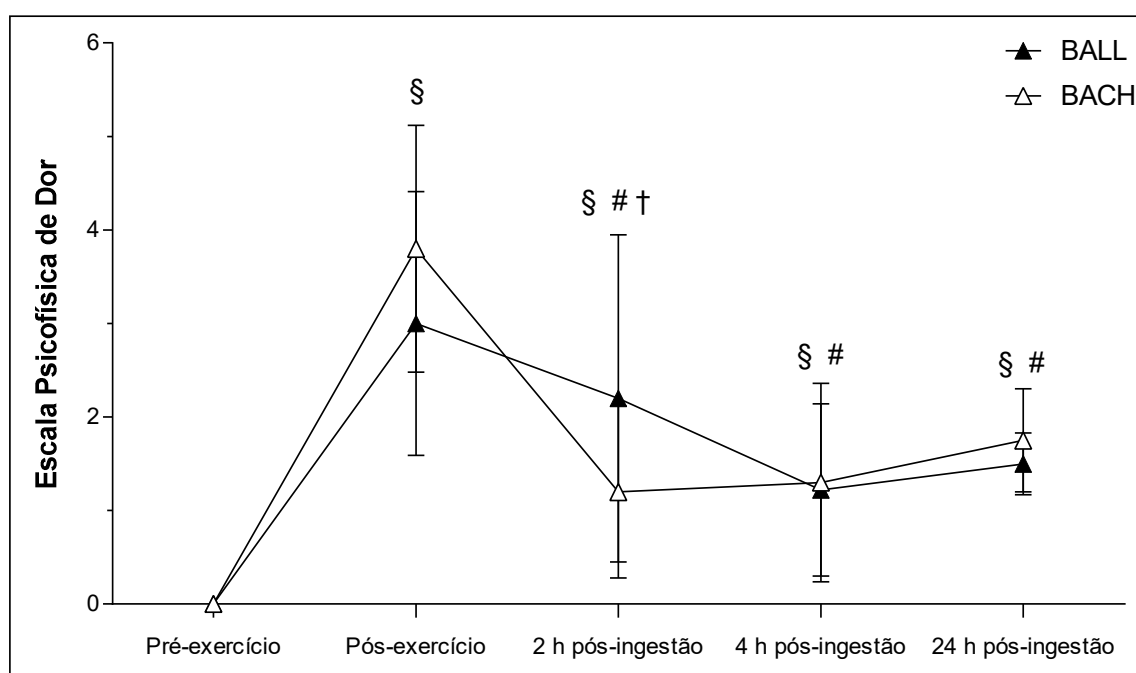
Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); § diferença significativa do pré-exercício, ambas as bebidas. # diferença significativa do pós-exercício, ambas as bebidas. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Valores apresentados como média ± DP.  $p<0,05$ .

### c) Dor psicofísica

Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito médio,  $F(4,72)=2,905$ ,  $p=0,049$ ,  $\eta^2=0,14$ , demonstrando comportamento de respostas diferentes entre os grupos experimentais na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,001$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas do pós-exercício em relação ao pré-exercício para ambas as bebidas, assim como do 2 h, 4 h e 24 h pós-ingestão em relação ao pós-exercício para BACH ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 3). Não houve diferença significativa em relação ao pré-exercício para BALL no pós-exercício. Não houve diferenças significativas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p>0,05$ ; GRÁFICO 3).

**Gráfico 311 – Escala psicofísica de dor durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); § diferença significativa do pré-exercício, ambas as bebidas. # diferença significativa do pós-exercício, ambas as bebidas. † diferença significativa do pós-exercício, BACH. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Valores apresentados como média  $\pm$  DP.  $p<0,05$ .

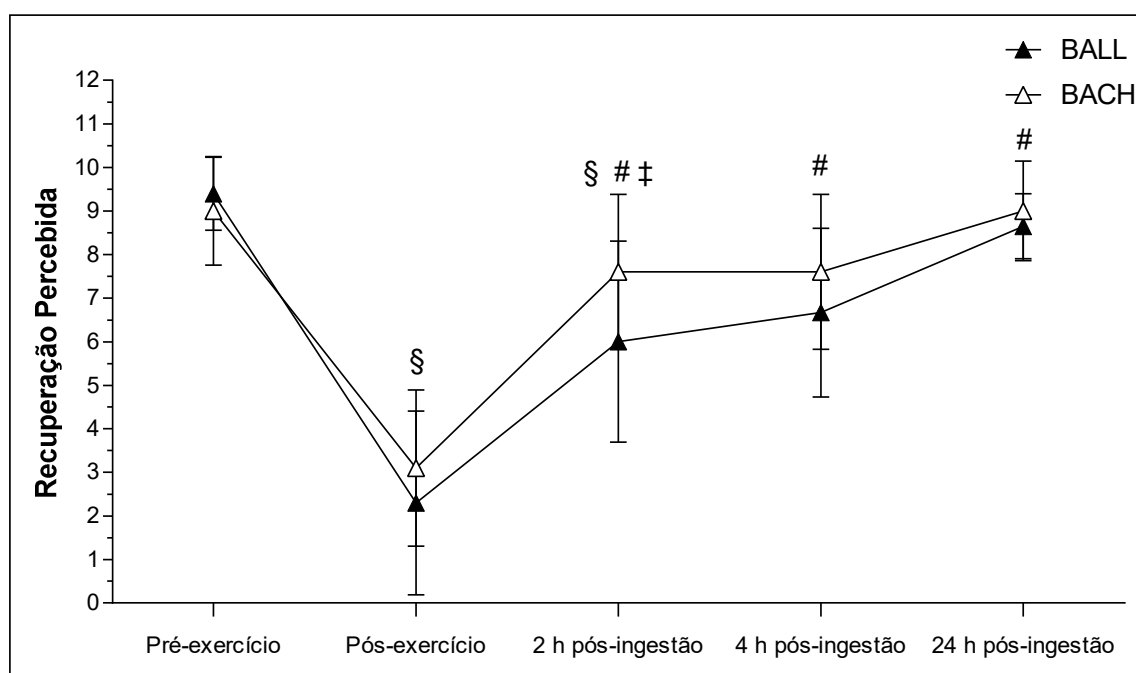


#### d) Recuperação percebida

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito médio,  $F(4,72)=1,280$ ,  $p=0,291$ ,  $\eta^2=0,07$ , demonstrando comportamento de respostas similares entre os grupos experimentais na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,003$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas do pós-exercício em relação ao pré-exercício para ambas as bebidas ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 4). Os escores às 2 h, 4 h e 24 h pós-ingestão são maiores em relação ao pós-exercício para ambas as bebidas ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 4). No momento 2 h pós-ingestão foi observado diferença significativa em relação ao pré-exercício para BALL ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 4). Não houve diferenças significativas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p>0,05$ ; GRÁFICO 4).

**Gráfico 4 – Escala de recuperação percebida durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); § diferença significativa do pré-exercício, ambas as bebidas. # diferença significativa do pós-exercício, ambas as bebidas. ‡ diferença significativa do pré-exercício, BALL. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Valores apresentados como média ± DP.  $p<0,05$ .

## 5.8. Respostas hormonais

Na sequência segue a descrição dos resultados estatísticos obtidos através de Anova Fatorial 2x5 (tratamento recebido= BACH ou BALL; e tempo= pré- e pós-exercício, pós-ingestão 2 h e 4 h) observados para insulina, testosterona, cortisol e razão testosterona/cortisol (T/C).

### a) Insulina

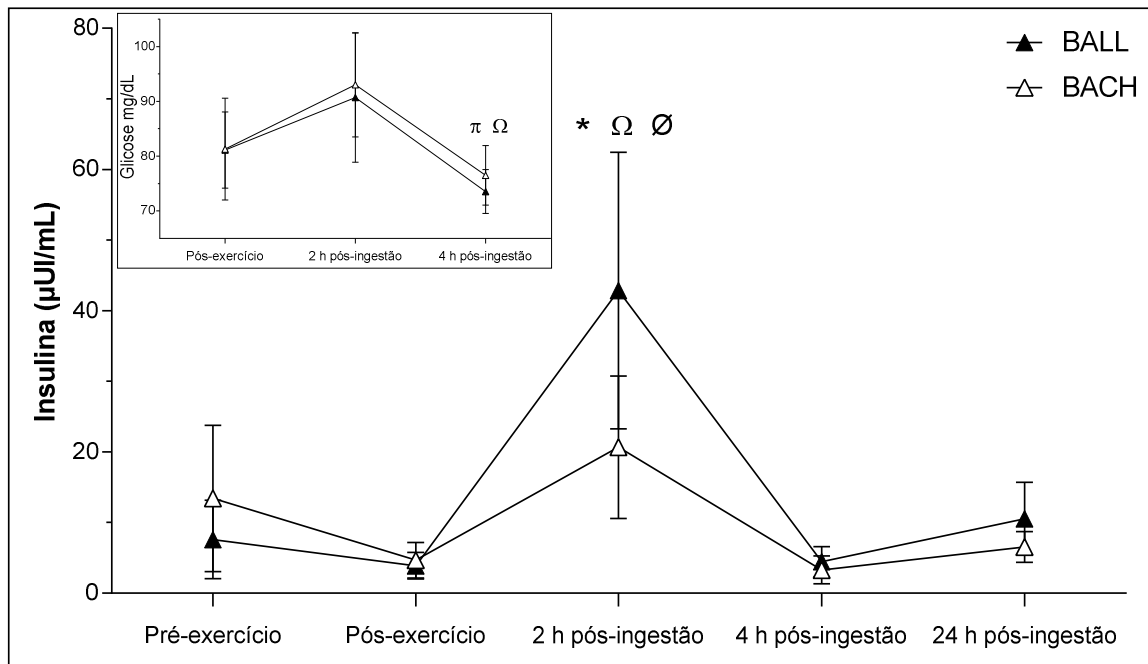
Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito grande,  $F(4,72)=8,828$   $p=0,002$ ,  $\eta^2=0,33$ , demonstrando comportamento de respostas diferentes para a insulina sérica entre as bebidas na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,001$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Houve efeito principal para o fator tratamento com tamanho do efeito grande,  $F(1,18)5,522$   $p=0,030$ ,  $\eta^2=0,24$ . Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas entre as bebidas às 2 h pós-ingestão (BALL=  $43 \pm 20$   $\mu\text{UI/mL}$  vs. BACH=  $21 \pm 10$   $\mu\text{UI/mL}$ ;  $p<0,05$ ; Gráfico5). A probabilidade de significado clínico ou prático dessa diferença foi observado como “muito provavelmente” (95%;  $2,1 \times / \div \pm 1,7$  [90 % IC]).

Comparações na linha do tempo revelaram diferenças estatisticamente significativas do 2 h pós-ingestão em relação ao pré-exercício para BALL ( $43 \pm 20$   $\mu\text{UI/mL}$  vs.  $8 \pm 6$   $\mu\text{UI/mL}$ ;  $p<0,05$ ; GRÁFICO 5) ultrapassando o limite clínico superior. Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p>0,05$ ).

O comportamento das concentrações de glicose foram iguais em ambos os grupos na linha de tempo,  $F(1,18)0,841$   $p=0,371$ ,  $\eta^2=0,05$ . Às 4 h pós-ingestão, a concentração foi inferior significativamente em relação ao momento pós-exercício em ambas as bebidas ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 5).

**Gráfico 5 – Insulina sérica durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); \* diferença significativa entre BALL e BACH. Ω diferença significativa dos demais pontos, BALL. Ø Diferença significativa de 4 h pós-ingestão, BACH. π diferença significativa dos demais pontos, BACH. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Retângulo inserido mostra a concentração de glicose sérica. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Valores apresentados como média ± DP.  $p < 0.05$ .

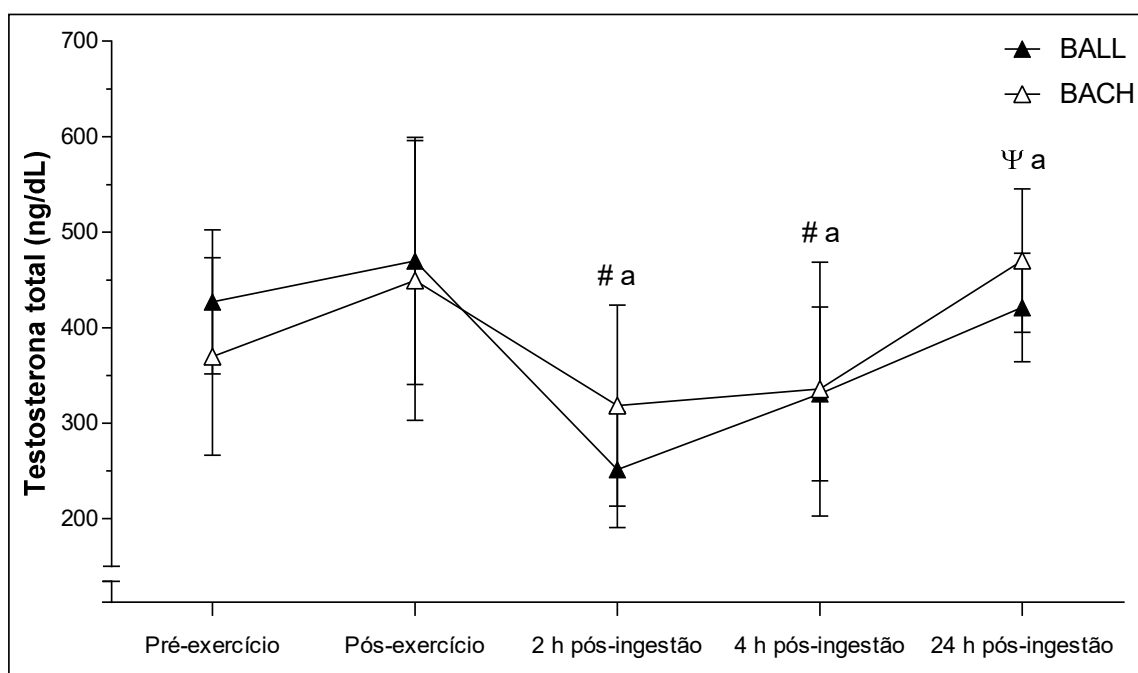
## b) Testosterona

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito médio,  $F(4,72)=2,805$   $p=0,058$ ,  $\eta^2=0,135$ , demonstrando comportamento de respostas similares de testosterona sérica entre as bebidas na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,015$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas, com valores inferiores às 2 h pós-ingestão e 4 h pós-ingestão, para ambas as bebidas, em relação ao pós-exercício ( $p < 0,05$ ; GRÁFICO 6). Houve diferença significativa, com valores crescentes, entre as comparações 4 h pós-ingestão vs. 2 h pós-ingestão e 24 h pós-ingestão vs. 4 h pós-ingestão para ambas

as bebidas ( $p < 0,05$ ; GRÁFICO 6). Da mesma forma, comparações na linha do tempo revelaram diferenças estatisticamente significativas, com valores superiores às 24 h pós-ingestão em relação ao pré-exercício para BACH ( $470 \pm 75$  ng/dL vs.  $370 \pm 103$  ng/dL). Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p > 0,05$ ; GRÁFICO 6).

**Gráfico 6 – Testosterona sérica durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

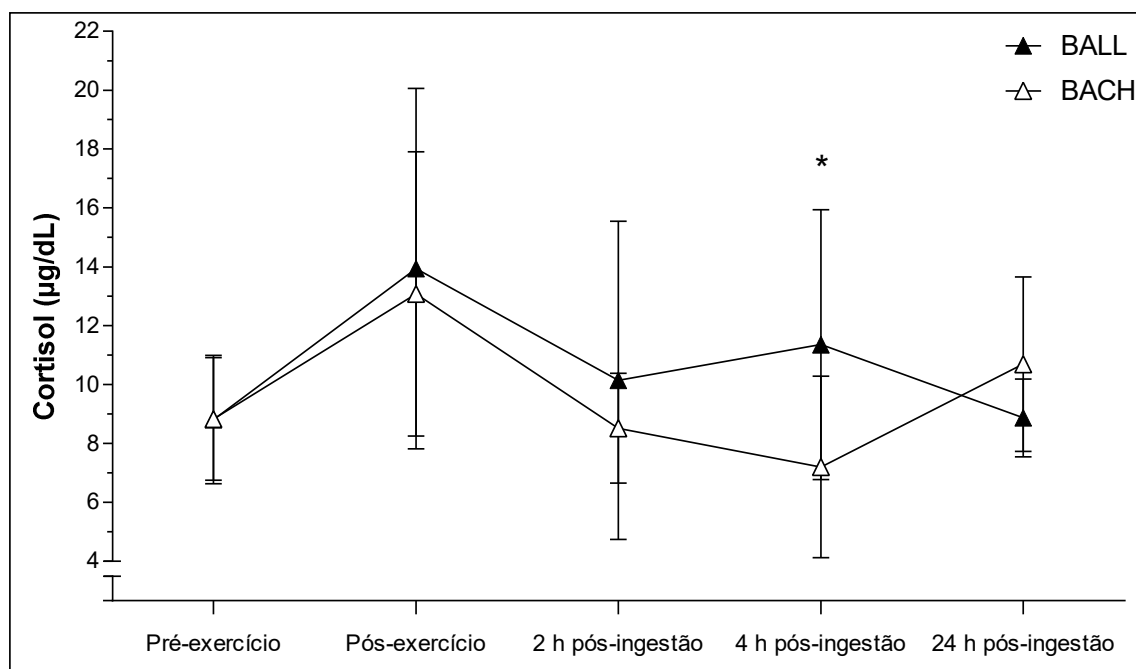
Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); # diferença significativa do pós-exercício, ambas as bebidas. Ψ diferença significativa do pré-exercício, BACH. Letras iguais diferem entre si intra-sujeitos ( $p < 0,05$ ). BACH,  $n=10$ ; BALL,  $n=10$  (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão,  $N=4$  para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Valores apresentados como média  $\pm$  DP.  $p < 0,05$ .

### c) Cortisol

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito médio,  $F(4,72)=2,042$   $p=0,097$ ,  $\eta^2=0,10$ , demonstrando comportamento de respostas similares para o cortisol sérico entre os tratamentos na linha do tempo.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas entre tratamentos às 4 h pós-ingestão (BACH=  $7 \pm 3 \mu\text{g/dL}$  vs. BALL=  $11 \pm 5 \mu\text{g/dL}$ ;  $p < 0,05$ ; GRÁFICO 7). A probabilidade de significado clínico ou prático dessa diferença foi “observado como provavelmente” (91%;  $1,6 \times / \div \pm 1,4$  [90 % IC]). Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p > 0,05$ ; GRÁFICO 7).

**Gráfico 712 – Cortisol sérico durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

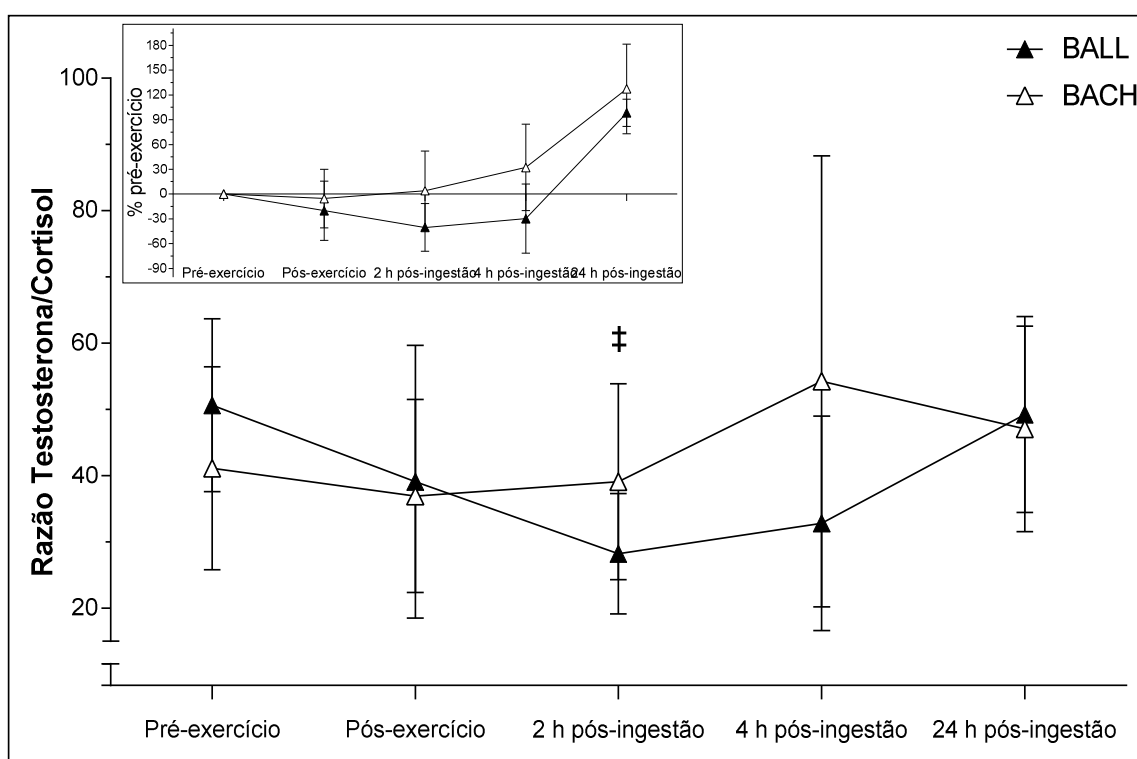
Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); \* diferença significativa entre BALL e BACH. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP.  $p < 0,05$ .

#### **d) Razão testosterona/cortisol (T/C)**

Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito grande,  $F(4,72)=3,299$   $p=0,017$ ,  $\eta^2=0,15$ , demonstrando comportamento de respostas diferentes para a razão T/C entre os grupos experimentais na linha do tempo.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas entre 2 h pós-ingestão e pré-exercício para BALL com reduções superiores a 30% ( $33 \pm 16\%$  vs.  $51 \pm 13\%$ , respectivamente BACH e BALL;  $p < 0,05$ ; GRÁFICO 8). Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p > 0,05$ ; GRÁFICO 8).

**Gráfico 8 – Razão testosterona/cortisol durante o período experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); Retângulo inserido mostra a razão percentual Testosterona/Cortisol em função do pré-exercício. ‡ diferença significativa do pré-exercício, BALL. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média ± DP.  $p < 0,05$ .

## 5.9. Estado da hidratação

Abaixo segue a descrição dos resultados estatísticos obtidos através de Anova Fatorial 2x5 (tratamento recebido= BACH ou BALL; e tempo= pré- e pós-exercício, pós-ingestão 2 h e 4 h) observados para massa corporal, gravidade específica da urina, sensação de sede, hematócrito e volume plasmático. Ao final, resultados do *test t* para retenção de fluidos entre as duas bebidas.

### a) Massa corporal

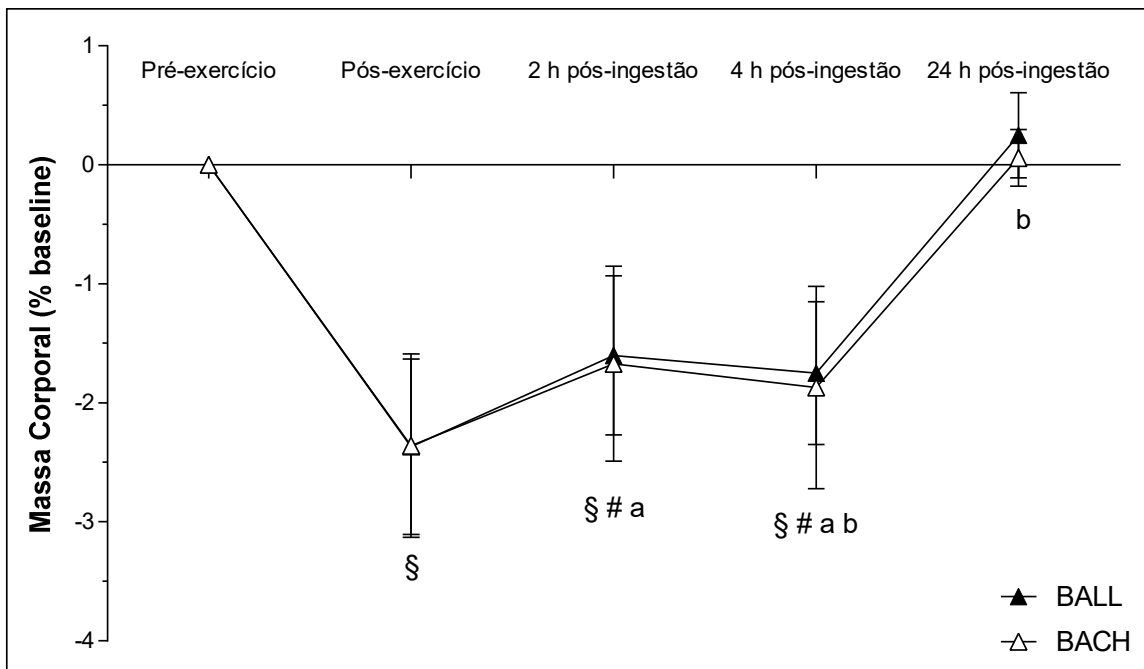
Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito pequeno,  $F(4,72)=,184$ ,  $p=0,722$ ,  $\eta^2=0,010$ , demonstrando comportamento de respostas similares para massa corporal entre as bebidas na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,001$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas intra-sujeitos, com valores inferiores, na linha de tempo entre pós-exercício, 2 h pós-ingestão, 4 h pós-ingestão em relação ao pré-exercício para ambas as bebidas ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 9).

Houve diferença significativa, com valores inferiores para ambas as bebidas, do 4 h pós-ingestão em relação às 2 h pós-ingestão e às 24 h pós-ingestão em relação às 4 h pós-ingestão.

Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas às 24 h pós-ingestão com pré-exercício e inter-sujeitos em todos os pontos temporais ( $p>0,05$ ; GRÁFICO 9).

**Gráfico 913 – Massa corporal durante o período de experimento em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); § diferença significativa do pré-exercício, ambas as bebidas. # diferença significativa do pós-exercício, ambas as bebidas. Letras iguais diferem entre si. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP.  $p < 0.05$ .

### **b) Gravidade específica da urina (GEU)**

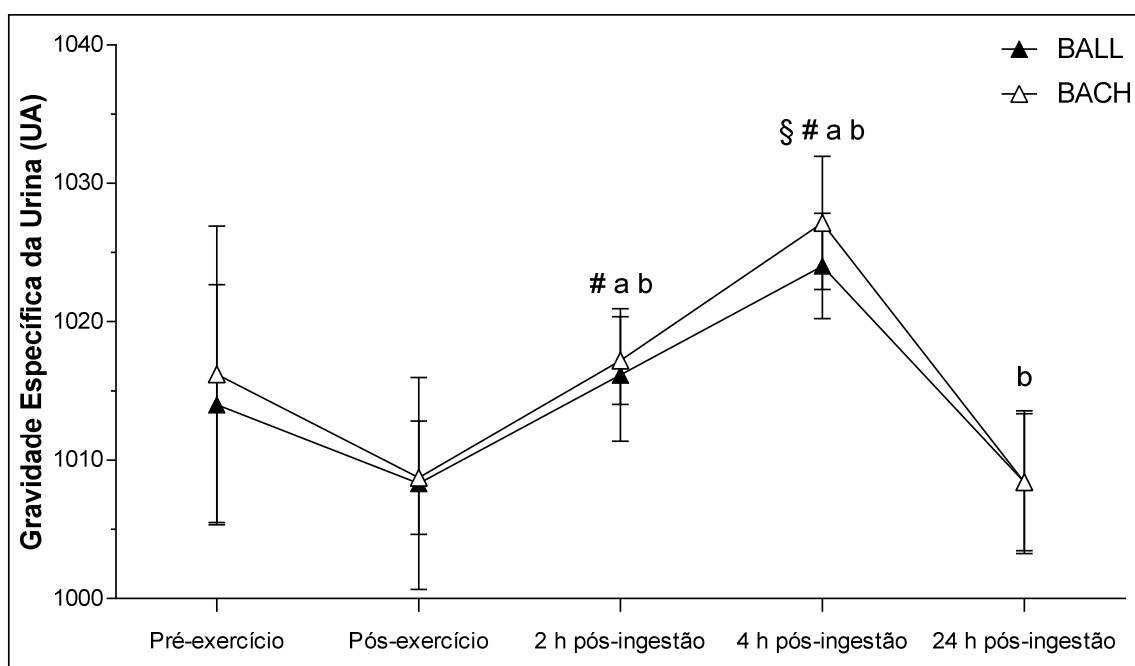
Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito médio,  $F(4,72)=0,243$ ,  $p=0,822$ ,  $\eta^2=0,13$ , demonstrando comportamento de respostas similares para GEU entre os grupos experimentais na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,003$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas intra-sujeitos, com valores superiores, na linha de tempo entre 2 h pós-ingestão, 4 h pós-ingestão em relação ao pós-exercício para ambas as bebidas ( $p < 0,05$ ; GRÁFICO 10). Houve diferença significativa, com valores superiores para ambas as bebidas, do 4 h pós-ingestão em relação ao pré-exercício, do 4 h pós-



ingestão em relação às 2 h pós-ingestão ( $p>0,05$ ; GRÁFICO 10). O 24 h pós-ingestão foi menor em relação a 2 h pós-ingestão e 4 h pós-ingestão ( $p>0,05$ ; Gráfico 14). Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas às 24 h pós-ingestão com pré-exercício e inter-sujeitos em todos os pontos temporais ( $p>0,05$ ; GRÁFICO 10).

**Gráfico 140 – Gravidade específica da urina (GEU) durante o período de experimento em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); § diferença significativa do pré-exercício, ambas as bebidas. # diferença significativa do pós-exercício, ambas as bebidas. Letras iguais, diferença significativa entre si na comparação intra-sujeitos. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP.  $p<0.05$ .

Durante o tratamento com as bebidas achocolatadas, foi observado percentualmente que maioria dos voluntários (BALL= 70%; BACH= 100%) foram classificados como “desidratação significativa” ou “grave” através da estimativa do grau de desidratação pela GEU de acordo com a proposta de Casa *et al.* (2000). Detalhes na Tabela 11.

**Tabela 11 – Classificação percentual dos voluntários para grau de desidratação “significativa” e “grave” segundo a gravidade específica da urina.**

Momento	Classificação	BALL	BACH
Pré-exercício	Sim	20%	50%
	Não	80%	50%
Pós-exercício	Sim	10%	0%
	Não	90%	100%
2 h pós-ingestão	Sim	10%	10%
	Não	90%	90%
4 h pós ingestão	Sim	70%	100%
	Não	30%	0%
24 h pós ingestão	Sim	0%	10%
	Não	100%	90%

Fonte: dados da pesquisa.

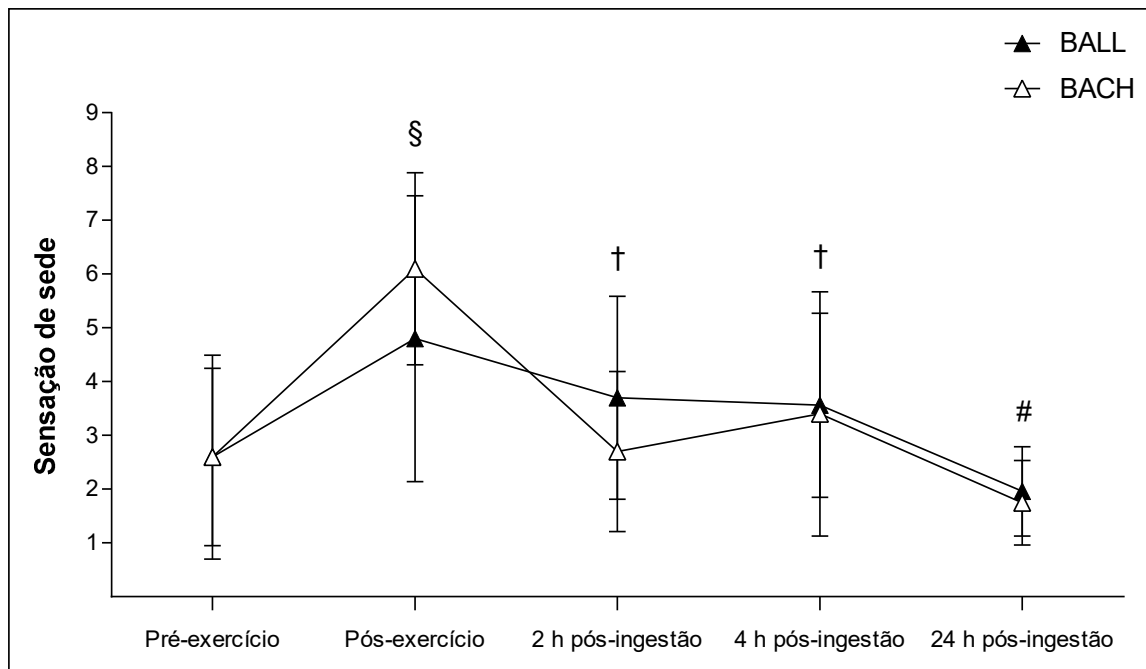
Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; desidratação significativa= 1.021 – 1.030 (UA); desidratação grave= > 1.030 (UA) segundo critérios de Casa *et al.* (2000).

### c) Sensação de sede

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito médio,  $F(4,72)=1,587$ ,  $p=0,196$ ,  $\eta^2=0,081$ , demonstrando comportamento de respostas similares para sensação de sede entre as bebidas na linha do tempo estabelecida no presente estudo.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas intra-sujeitos na linha de tempo entre pós-exercício e pré-exercício, 2 h, 4 e 24 pós-ingestão para ambas as bebidas ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 11). Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p>0,05$ ; GRÁFICO 11).

**Gráfico 1115 – Sensação de sede durante o período de experimento em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

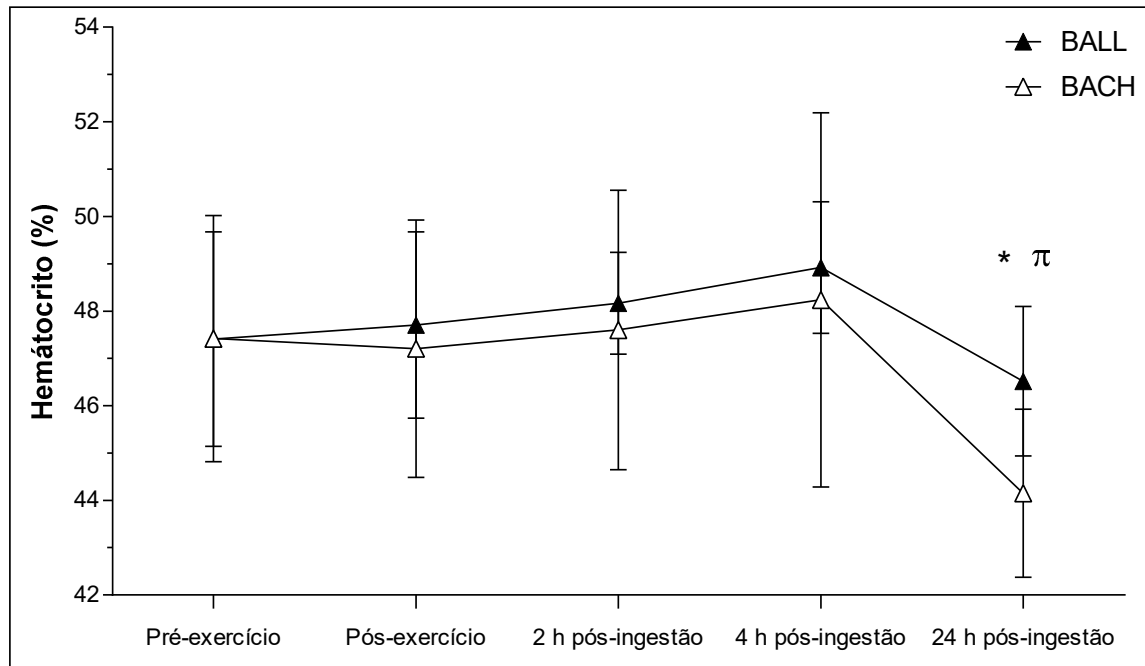
Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); § diferença significativa do pré-exercício, ambas as bebidas. # diferença significativa do pós-exercício, ambas as bebidas. † diferença significativa do pós-exercício, BACH. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média ± DP.  $p < 0,05$ .

#### **d) Hematócrito**

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito médio,  $F(4,72)=2,187$   $p=0,119$ ,  $\eta^2=0,108$ , demonstrando comportamento de respostas similares para o hematócrito entre as bebidas na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,005$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas entre as bebidas para 24 h pós-ingestão (BALL=  $47 \pm 2\%$  vs. BACH=  $44 \pm 2\%$   $p < 0,05$ ; GRÁFICO 12). Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p > 0,05$ ; GRÁFICO 12).

**Gráfico 116 – Hematócrito durante o período de experimento em resposta ao exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); π diferença significativa dos demais pontos, BACH. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média ± DP.  $p < 0.05$ .

### e) Volume plasmático

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito médio,  $F(3,54)=1,268$   $p=0,289$ ,  $\eta^2=0,07$ , demonstrando comportamento de respostas similares para o volume plasmático entre os tratamentos na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,001$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas entre o delta de 24 h/4 h pós-ingestão *versus* os demais valores para a BACH.

Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p > 0,05$ ; Tabela 12).

**Tabela 12 – Delta do volume plasmático segundo os fatores “bebida” e “momento de ingestão” durante a recuperação pós-exercício.**

Delta volume plasmático	BALL	BACH
Pós/pré-exercício	-1.7 ± 6 %	-0.6 ± 3.6 %
2 h pós-ingestão/pós-exercício	-1.4 ± 4.3 %	-1.5 ± 3.4 %
4 h/2 h pós-ingestão	-2.2 ± 4.2 %	-1.1 ± 5 %
24 h/4 h pós-ingestão	9.1 ± 5 %	18.2 ± 18.5 % <sup>π</sup>

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; delta estimado a partir da concentração de hemoglobina no sangue e hematócrito, como descrito por Dill e Costill (1974). <sup>π</sup> diferença significativa dos demais pontos temporais, BACH. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média ± DP.  $p < 0.05$ .

## f) Retenção de fluidos

Durante a recuperação, a ingestão das bebidas achocolatadas foi a única forma de ingestão de fluidos. Não houve diferença significativa entre a taxa de retenção de fluidos entre as bebidas (BACH=78 ± 19%; BALL=79 ± 13%;  $t=0,105$ ,  $p=0,918$ ).

## 5.10. Dano muscular

Abaixo segue a descrição dos resultados estatísticos obtidos através de Anova Fatorial 2x5 (tratamento recebido= BACH ou BALL; e tempo= pré- e pós-exercício, pós-ingestão 2 h e 4 h) observados para creatina quinase e mioglobina.

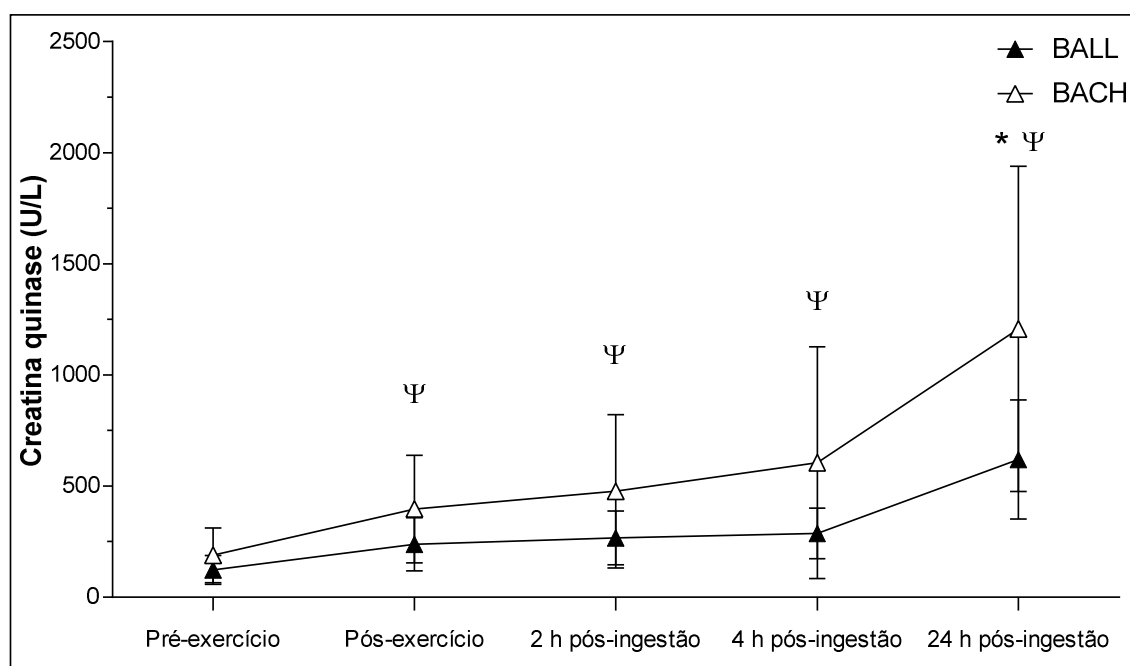
### a) Creatina Quinase

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito grande,  $F(4,72)=3,589$   $p=0,057$ ,  $\eta^2=0,166$ , demonstrando comportamento de respostas similares para a CK entre os tratamentos na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,001$ ), a correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

O resultado principal para o fator tratamento recebido foi significativo com tamanho do efeito grande,  $F(1,18)=5,396$ ,  $p=0,032$ ,  $\eta^2=0,23$ . Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni mostraram diferenças significativas entre as bebidas às 24 h pós-ingestão com efeito grande (BALL= 619 ± 267 U/L vs. BACH= 1208 ± 731 U/L;  $p < 0,05$ ;  $\eta^2=0,241$ ; GRÁFICO 13). A probabilidade de significado clínico ou

prático dessa diferença foi “observado como provavelmente” (89%;  $1,5 \times / \div \pm 1,3$  [90 % IC]). Comparações na linha do tempo revelaram diferenças estatisticamente significativas de todos os momentos em relação ao pré-exercício para BACH ( $p < 0,05$ ; GRÁFICO 13). Não houve diferenças significativas às 24 h pós-ingestão em relação aos demais momentos para BALL ( $p > 0,05$ ; GRÁFICO 13).

**Gráfico 13 – Creatina quinase sérica durante o período de experimento em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados de pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); \* diferença significativa entre BALL e BACH. Ψ diferença significativa do pré-exercício, BACH. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP.  $p < 0,05$ .

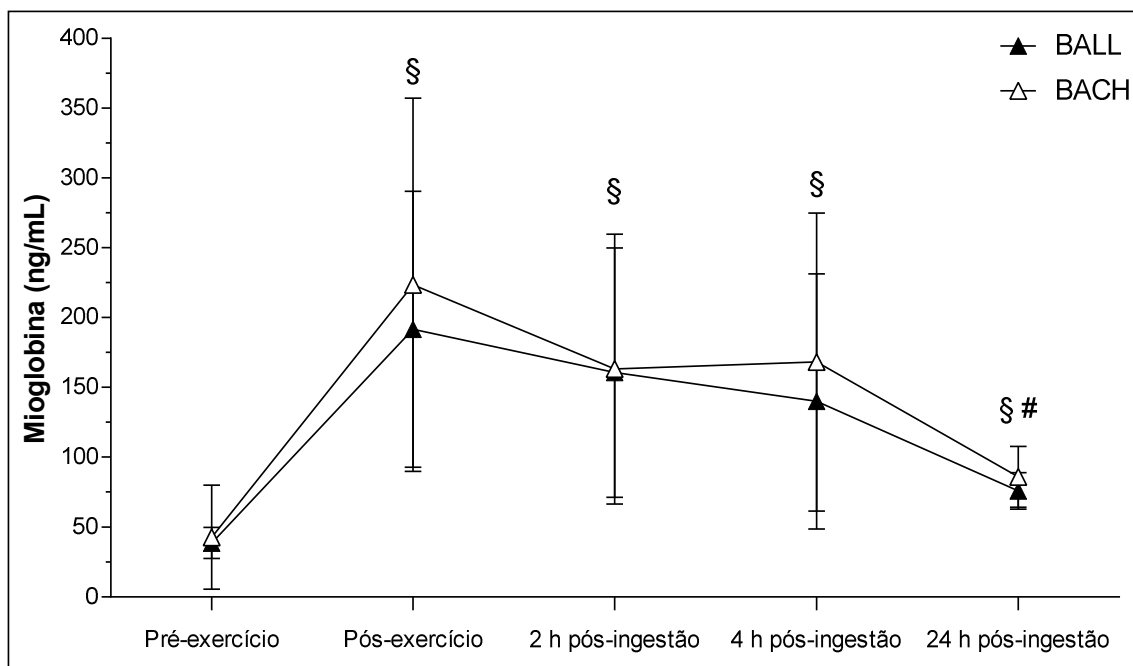
## b) Mioglobina

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito pequeno,  $F(4,72)=0,317$   $p=0,666$ ,  $\eta^2=0,017$ , demonstrando comportamento de respostas similares para a Mb entre os tratamentos na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,001$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Comparações na linha do tempo revelaram diferenças estatisticamente significativas de todos os momentos em relação ao pré-exercício, com respostas menores para

ambas as bebidas ( $p < 0,05$ ; GRÁFICO 14). Houve diferença às 24 h pós-ingestão em relação ao pós-exercício, com respostas menores para ambas as bebidas. Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p > 0,05$ ; GRÁFICO 14).

**Gráfico 14 – Mioglobina sérica durante o período de experimento em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); § diferença significativa do pré-exercício, ambas as bebidas. # diferença significativa do pós-exercício, ambas as bebidas. BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média ± DP.  $p < 0,05$ .

### 5.11. Respostas imunológicas

Abaixo segue a descrição dos resultados estatísticos obtidos através de Anova Fatorial 2x5 (tratamento recebido= BACH ou BALL; e tempo= pré- e pós-exercício, pós-ingestão 2 h e 4 h) observados para leucócitos, neutrófilos linfócitos e razão neutrófilos/linfócitos.

#### a) Leucócitos

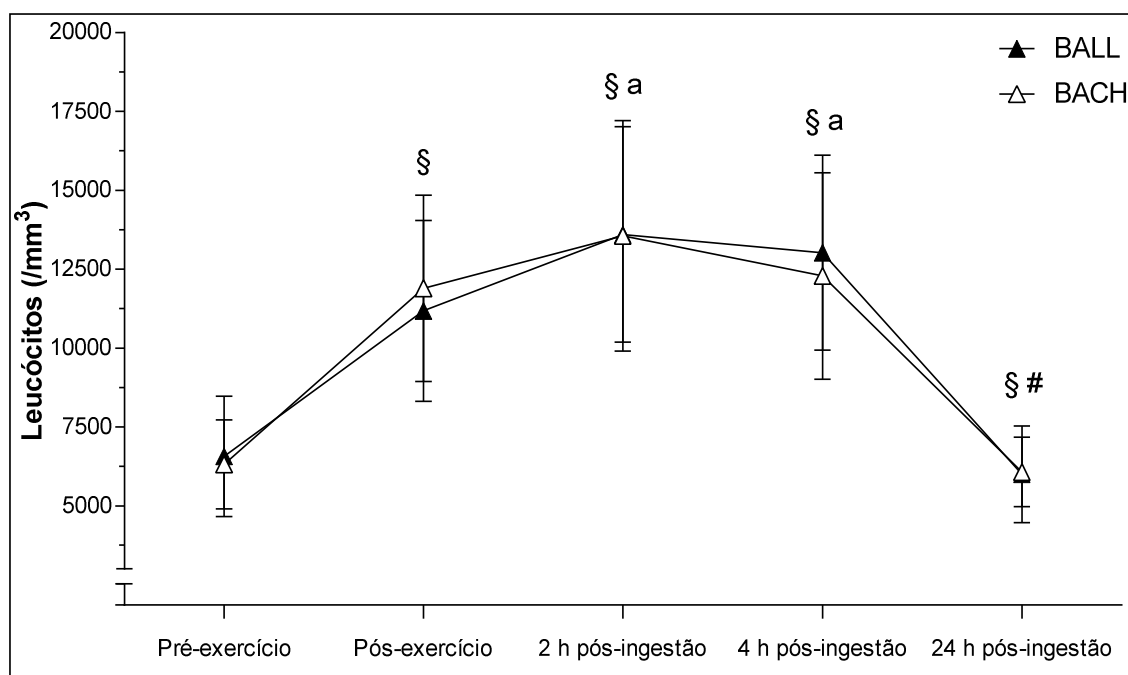
Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito pequeno,  $F(4,72)=0,445$   $p=0,677$ ,  $\eta^2=0,024$ , demonstrando comportamento de

respostas similares para os leucócitos entre os tratamentos na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,001$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Comparações na linha do tempo revelaram diferenças estatisticamente significativas de pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão em relação ao pré-exercício, com respostas maiores para ambas as bebidas ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 15).

Houve diferença às 24 h pós-ingestão em relação ao pós-exercício, com respostas menores para ambas as bebidas. O momento 4 h pós-ingestão foi diferente do momento 2 h pós-ingestão para BACH ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 15). Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p>0,05$ ; GRÁFICO 15).

**Gráfico 15 – Leucócitos sanguíneos durante o período de experimento função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); § diferença significativa do pré-exercício, ambas as bebidas. # diferença significativa do pós-exercício, ambas as bebidas. Letras iguais diferem entre si intra-sujeitos para BACH ( $p<0,05$ ). BACH,  $n=10$ ; BALL,  $n=10$  (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão,  $N=4$  para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP.  $p<0,05$ .

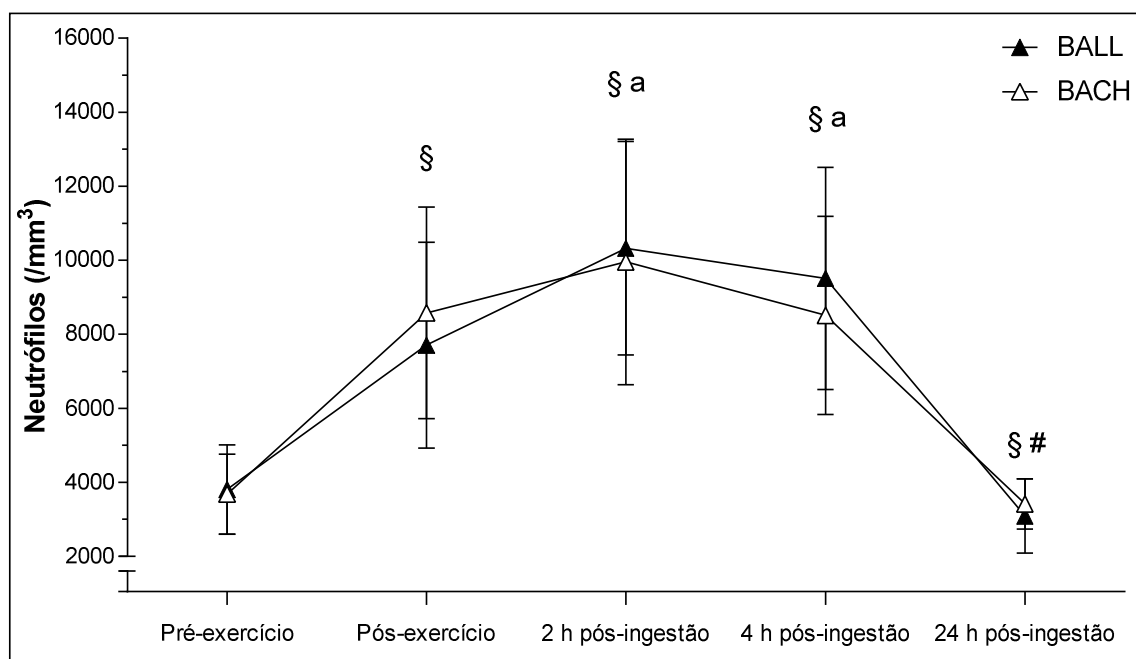


## b) Neutrófilos

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito pequeno,  $F(4,72)= 0,886$   $p=0,431$ ,  $\eta^2=0,047$ , demonstrando assim que há comportamento de respostas similares para os neutrófilos entre as bebidas na linha do tempo.

Comparações na linha do tempo revelaram diferenças estatisticamente significativas de pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão em relação ao pré-exercício, com respostas maiores para ambas as bebidas ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 16). Houve diferença às 24 h pós-ingestão em relação ao pós-exercício, com respostas menores para ambas as bebidas. O momento 4 h pós-ingestão foi diferente do momento 2 h pós-ingestão para BACH ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 16). Não houve diferenças significativas nos demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p>0,05$ ; GRÁFICO 16).

**Gráfico 16 – Neutrófilos sanguíneos durante o tratamento experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

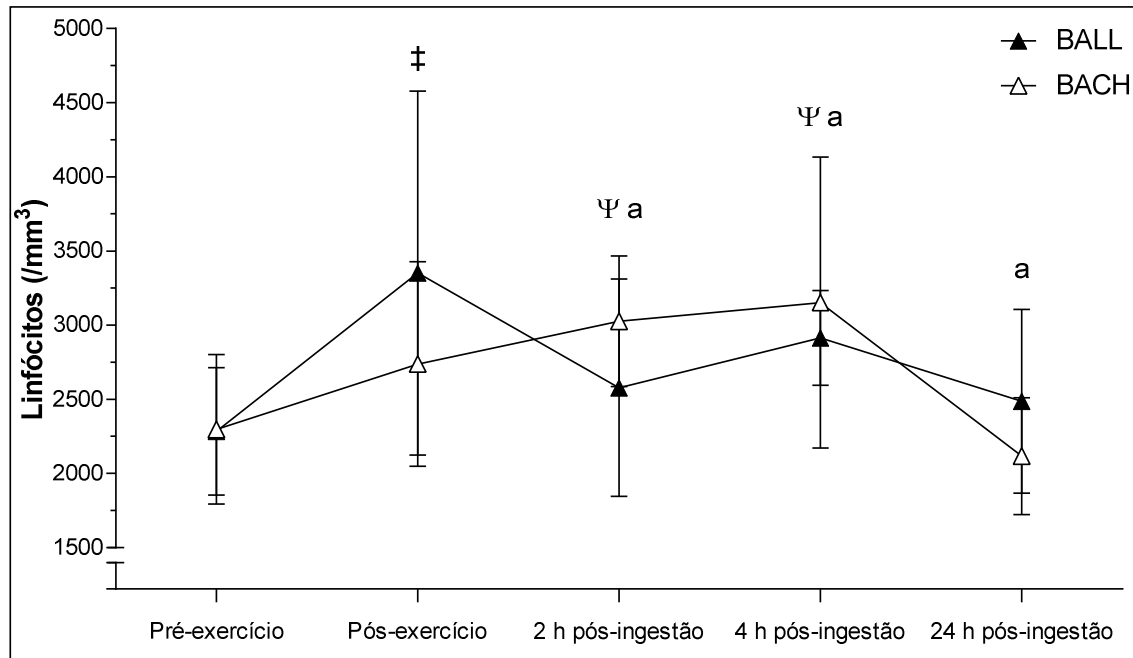
Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); § diferença significativa do pré-exercício, ambas as bebidas. # diferença significativa do pós-exercício, ambas as bebidas. Letras iguais diferem entre si intra-sujeitos para BACH ( $p<0,05$ ). BACH,  $n=10$ ; BALL,  $n=10$  (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão,  $N=4$  para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP.  $p<0,05$ .

### c) Linfócitos

Não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito médio,  $F(4,72)=0,010$   $p=0,921$ ,  $\eta^2=0,120$ , demonstrando assim que há comportamento de respostas similares para leucócitos entre as bebidas na linha do tempo.

Comparações na linha do tempo revelaram valores maiores estatisticamente significativas de pós-exercício em relação a pré-exercício para BALL. Houve resultados maiores do 2 h e 4 h pós-ingestão em relação ao pré-exercício para BALL ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 17). Houve diferença às 24 h pós-ingestão em relação a 2 h e 4 h pós-ingestão, com respostas menores para BACH. O momento 4 h pós-ingestão foi diferente do momento 2 h pós-ingestão para BACH ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 17). Não houve diferenças significativas nas comparações pareadas entre os demais pontos temporais intra ou inter-sujeitos ( $p>0,05$ ; GRÁFICO 17).

**Gráficos 17 – Linfócitos sanguíneos durante o tratamento experimental função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); ‡ diferença significativa do pré-exercício, BALL. Ψ diferença significativa do pré-exercício, BACH. Letras iguais diferem entre si intra-sujeitos para BACH ( $p<0,05$ ). BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP.  $p<0,05$ .

#### **d) Razão neutrófilos/linfócitos (N/L)**

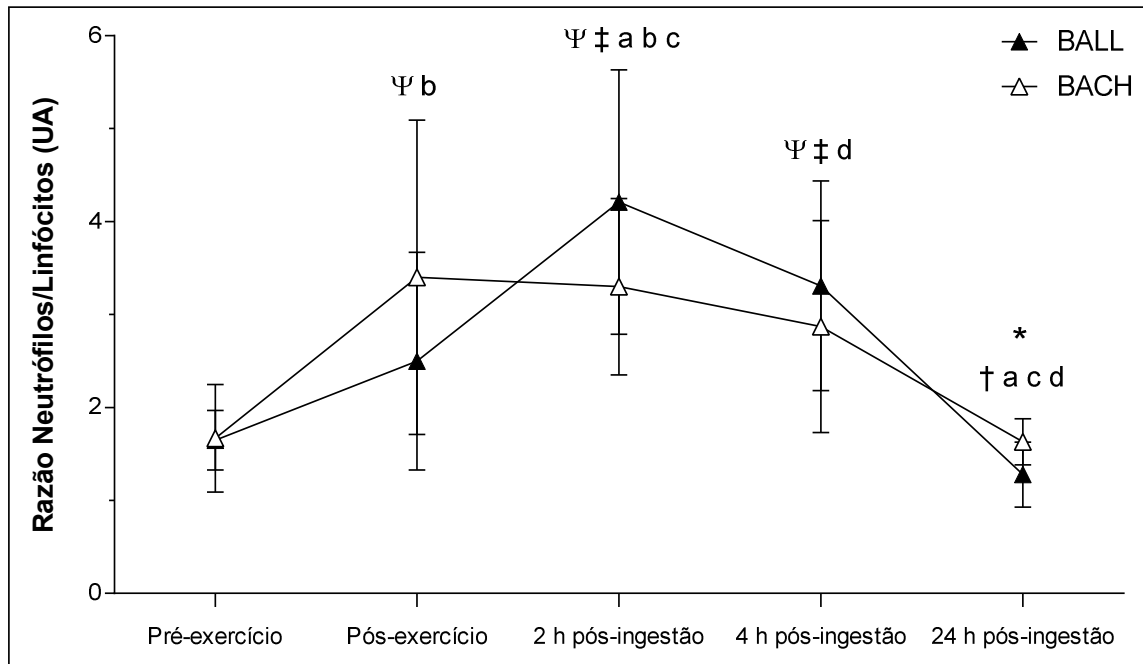
Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores com tamanho do efeito médio,  $F(3,24)=2,973$   $p=0,045$ ,  $\eta^2=0,14$ , demonstrando comportamento de respostas diferentes para o N/L entre os tratamentos na linha do tempo. Devido à violação da esfericidade pelo teste de *Mauchly* ( $p=0,003$ ), correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada para interpretação.

Comparações na linha do tempo revelaram diferenças estatisticamente significantes de 2 h pós-ingestão e 4 h pós-ingestão em relação ao pré-exercício, com respostas maiores para BALL ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 18). Houve diferença do pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão em relação a pré-exercício, com respostas maiores para BACH ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 18).

Para BACH, o valor de 24 h pós-ingestão foi menor que pós-exercício e 2 h pós-ingestão ( $p<0,05$ ), sem diferenças para o momento 4 h pós-ingestão ( $p>0,05$ ; GRÁFICO 18). Na BALL, 2 h pós-ingestão, a resposta de N/L foi maior significativamente que pós-exercício, assim como 24 h foi menor que 2 h e 4 h pós-ingestão ( $p<0,05$ ; GRÁFICO 18).

Houve diferença entre as bebidas para o momento 24 h pós-ingestão com respostas menores para BALL em relação a BACH ( $1.6 \pm 0.2$  vs.  $1.3 \pm 0.3$ ,  $p<0,05$ ; GRÁFICO 18). A probabilidade de significado clínico ou prático dessa diferença foi observado como possivelmente (54%;  $1,2 \times/\div \pm 1,1$  [90 % IC]).

**Gráfico 18 – Razão neutrófilos/linfócitos durante o tratamento experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**



Fonte: dados da pesquisa.

Nota: BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado; SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado de Lovell *et al.* (2008); \* diferença significativa entre BALL e BACH. † diferença significativa do pós-exercício, BACH. ‡ diferença significativa do pré-exercício, BALL. Ψ diferença significativa do pré-exercício, BACH. Letras iguais diferem entre si (a=BACH; b, c, d=BALL;  $p < 0,05$ ). BACH, n=10; BALL, n=10 (pré-exercício, pós-exercício, 2 h e 4 h pós-ingestão). 24 h pós-ingestão, N=4 para cada tratamento. Comparações pareadas com ajustamento de Bonferroni. Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP.  $p < 0.05$ .

Valores para normalidade clínica pode ser notado na (TABELA 13). A principal alteração foi o alto percentual da amostra de BALL acima da normalidade clínica para insulina às 2 h pós-ingestão.

Altos percentuais acima da linha de normalidade clínica também foram notadas para CK e Mb iniciando após exercício e seguindo até às 24 h pós-ingestão para ambas as bebidas. Nota-se também a leucocitose, via neutrofilia, caracterizada a partir do momento pós-exercício até às 4 h pós-ingestão.

**Tabela 13 – Ponto de corte para normalidade clínica de marcadores bioquímicos durante o tratamento experimental em função do exercício (SAFT90+) e tratamento recebido com bebida achocolatada.**

Marcador	Critério	Pré-exercício		Pós-exercício		2 h pós-ingestão		4 h pós-ingestão		24 h pós-ingestão	
		BALL	BACH	BALL	BACH	BALL	BACH	BALL	BACH	BALL	BACH
Glicose	Abaixo	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Normalidade	100%	110%	100%	100%	90%	90%	100%	100%	90%	100%
	Acima	0%	0%	0%	0%	10%	10%	0%	0%	10%	0%
Insulina	Abaixo	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Normalidade	100%	70%	100%	100%	10%	70%	100%	100%	100%	100%
	Acima	0%	30%	0%	0%	90%	30%	0%	0%	0%	0%
Testosterona	Abaixo	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Normalidade	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Acima	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Cortisol	Abaixo	0%	10%	10%	0%	20%	10%	10%	60%	0%	10%
	Normalidade	100%	90%	90%	100%	80%	90%	90%	40%	100%	90%
	Acima	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Creatina Quinase	Abaixo	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Normalidade	90%	60%	50%	20%	50%	0%	30%	0%	0%	0%
	Acima	10%	40%	50%	80%	50%	100%	70%	100%	100%	100%
Mioglobina	Abaixo	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	10%
	Normalidade	100%	90%	0%	0%	0%	30%	30%	30%	90%	80%
	Acima	0%	10%	100%	100%	100%	70%	70%	70%	10%	10%
Leucócitos	Abaixo	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Normalidade	100%	100%	50%	70%	20%	40%	30%	40%	100%	100%
	Acima	0%	0%	50%	30%	80%	60%	70%	60%	0%	0%
Linfócitos	Abaixo	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Normalidade	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Acima	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Neutrófilos	Abaixo	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Normalidade	100%	100%	40%	40%	10%	20%	30%	40%	100%	100%
	Acima	0%	0%	60%	60%	90%	80%	70%	60%	0%	0%
Hematócrito	Abaixo	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Normalidade	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	90%	100%	100%
	Acima	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	10%	0%	0%

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: Os momentos reportam o momento de coleta pré-pós exercícios e pós-ingestão. BALL= bebida achocolatada e L-leucina; BACH= bebida achocolatada e colágeno hidrolisado. SAFT90+= Soccer-specific aerobic field test adaptado. Faixa de normalidade para glicose sérica considerando faixa de valores para medidas casuais, segundo Nicoll *et al.* (2013). Faixa de normalidade para os demais parâmetros apoiados em Henry (2013).

## 6 DISCUSSÃO

A nutrição é considerada um dos pilares do rendimento esportivo e o cumprimento de necessidades dietéticas pós-exercício é fundamental para a efetividade do processo recuperativo e adaptativo (BURKE *et al.*, 2006; HAWLEY *et al.*, 2006). Assim, otimizar composição, testar novos produtos, e criar planos viáveis ao cotidiano de equipes esportivas, que permita aderência das atletas no pós-exercício, apresenta-se como um desafio para os investigadores das Ciências do Esporte. Tomando como ponto de partida a experimentação prévia com bebidas achocolatas comerciais para intentos recuperativos pós-exercício (FERGUSON-STEGALL *et al.*, 2011; GILSON *et al.*, 2010; LUNN *et al.*, 2012; SPACCAROTELLA *et al.*, 2011; THOMAS *et al.*, 2009), o objetivo principal do presente estudo foi analisar os efeitos da suplementação de L-leucina numa matriz particularizada de bebida achocolatada (BALL) sobre marcadores de referência da recuperação após perturbações agudas da homeostase fisiológica e metabólica ocorridas com simulação do futebol.

Para a formulação de BALL considerou-se a necessidade e cinética de absorção particulares as demandas recuperativas dessa modalidade, além de ser um produto zero lactose e glúten. A hipótese geral foi que a BALL proposta poderia promover um ambiente anabólico favorável, principalmente via resposta secretogoga da L-leucina suplementada para obter resposta hiperinsulínica pós-ingestão, desempenhando, então, importantes papéis no processo recuperativo agudo pós-exercício como especulado na literatura (ROWLANDS *et al.*, 2015; SALTIEL, 2016). Além disso, verificou-se se a mesma teria aceitabilidade na escala de aceitação sensorial afetiva e se seu uso pós-exercício não provocaria escores elevados de sensação de desconforto gastrointestinal.

Os principais resultados de uso da BALL pós-exercício foram: i) alto escore de aceitação sensorial afetiva, não se modificando na linha do tempo de ingestão e não provocando comprometimento da sensação de conforto gastrointestinal; ii) a ingestão promoveu aumento significativo na insulina após 2 h de ingestão; iii) amortização de respostas de CK e menor valor significativo às 24 h pós-ingestão; iv) não houve modificação significativa do tempo de curso e retorno aos valores pré-exercício da testosterona, cortisol, razão testosterona/cortisol, nos marcadores gerais de imunidade, mioglobina e massa corporal e nas escalas de recuperação

percebida e dor muscular até 4 h pós-ingestão; v) não comprometimento do hematócrito e alta taxa de retenção de fluidos até às 4 h pós-ingestão; e, vi) comprometimento dos *status* de hidratação via gravidade específica da urina e delta do volume plásmico, assim como o não restabelecimento da sensação de sede para valores pré-exercício até 4 h pós-ingestão.

### **6.1. Análise sensorial afetiva e conforto gastrointestinal**

A avaliação sensorial afetiva é um método que dispensa provadores treinados, pois avalia somente a aceitação e a preferência dos produtos utilizando consumidores habituais ou potenciais (MINIM, 2006). Os atributos das bebidas achocolatadas formuladas apresentaram índice de aceitabilidade entre 84% e 86%, sendo um escore considerado alto (i.e,  $\geq 70\%$ , DUTCOSKY, 2013). Nota-se que preenchimento dos anseios sensoriais de quem consome o produto determina sua qualidade. Assim, o uso de BALL poderá colaborar para aderência aos planos alimentares pós-exercício. Desta forma, uma vez que a satisfação do consumidor é objetivo fim do desenvolvimento e inovação de produtos, o alto escore de aceitação observado poderá direcionar avanços tecnológicos no patamar tecnológico e nas estratégias de marketing de produtos para atletas (MINIM, 2006).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que usaram a análise sensorial para avaliar a semelhança entre bebidas lácteas ou achocolatadas suplementadas com leucina. Entretanto, Lopes (2010) observou valores de aceitação inferiores ao presente estudo, como por exemplo escore de média 5 para uma bebida láctea sabor chocolate adicionada de ácido linoleico conjugado e média 7 para uma bebida láctea adicionada de óleo de canola. Outros pesquisadores elaboraram e avaliaram a aceitação de duas formulações alimentares achocolatadas (uma contendo albumina e a outra, concentrado proteico de soro de leite) para crianças de 7 a 10 anos observando valores de aceitação similares ao presente estudo utilizando provadores adultos (BATISTA *et al.*, 2015).

Outro estudo avaliando três bebidas lácteas achocolatadas comercializadas no mercado brasileiro, entre elas, a líder de mercado, utilizando os atributos forma geral e sabor, observaram valores entre 6.18 e 6.58 (PFLANZER *et al.*, 2010). Nota-se

que para o atributo sabor, os valores são inferiores aos observados para as bebidas (BALL e BACH) do presente estudo. Visando comparações com bebidas com intentos esportivos, muito comumente utilizada para reposição e recuperação pós-exercícios, Santos *et al.* (2013) elaboraram uma bebida isotônica orgânica sabor de tangerina e compararam com uma BEC(CHO-E) líder de mercado do mesmo sabor alcançando escores de 7,64 e 6,65 para o atributo sabor, respectivamente.

Buscando uma bebida achocolatada isenta de glúten, proteínas lácteas e lactose, preparada de extrato hidrossolúvel de arroz e de quinoa, um grupo de pesquisadores observaram escores na escala hedônica intervalar de nove pontos entre 6 e 7 para três formulações experimentais (BENTO *et al.*, 2012). Porém, nenhum desses estudos avaliaram a aceitação sensorial no momento pós-exercício, momento onde fatores como os fisiológicos e psicológicos podem causar diferentes sensibilizações sensoriais (MINIM, 2006). Assim, o delineamento de análise sensorial do presente estudo trouxe algumas fragilidades metodológicas para esse campo do saber relacionados ao momento de ingestão e fadiga sensorial pelo alto volume de ingestão praticado em relação a volumes de amostra para análise sensorial clássica, pode ter colaborado para erros de expectativa, de hábitos e lógicos, que geralmente causam tendenciosidade nos resultados (MINIM, 2006).

Mesmo com essas ressalvas, BALL segue a tendência de outros produtos com sabor chocolate que tem reconhecido apelo sensorial (BATISTA *et al.*, 2015; BENTO *et al.*, 2012). Apesar de sedimentação e necessidade da proposta “agite antes de beber”, as bebidas alcançaram escores de percepção que as classificaram com maioria das respostas entre “gostei muito” e “gostei extremamente” para os atributos impressão geral, aparência e consistência (TABELA 8). Talvez pelo teor de achocolatado utilizado, classificado como meio amargo e diferente de experiências sensoriais prévias com produtos similares, para o atributo “sabor”, a BALL obteve a maioria dos voluntários classificado-a em “gostei muito” (50%), com média na escala hedônica intervalar de nove pontos de 7.7, seguindo tendências de outras bebidas de matriz achocolatada suplementada (BATISTA *et al.*, 2015). Porém, o escore de sabor da BALL é superior aos observados em outros estudos para BEC(CHO-E) líder de mercado (SANTOS *et al.*, 2013), protótipos de isotônicos natural de



maracujá (DE MARCHI *et al.*, 2003) ou a partir de suco concentrado de frutas e hortaliças (MARTINS *et al.*, 2011).

Apesar de não ter sido feito teste de intenção de compra, e considerando a proposta de avaliação de aceitação sensorial afetiva diretamente com o público alvo consumidor e ambiente de consumo, o resultado para ambas bebidas achocolatadas de tratamento representaram boa aceitação, indicando que, se as mesmas fossem colocadas à venda, possivelmente teriam uma demanda satisfatória. Esse aspecto, apesar de não ter sido objetivo do estudo, sinaliza um importante referencial para a continuidade de aprimoramento do protótipo e processamento industrial, onde a avaliação sensorial é uma importante ferramenta para a decisão do processo de produção, visando minimizar o risco associado com a introdução de novos produtos alimentícios no mercado (DUTCOSKY, 2013).

Um importante resultado prático foi o indicativo de que a ingestão não modificou a aceitação sensorial afetiva na linha de tempo, assim como ficando demonstrado que o tratamento executado com BALL não comprometeu gravemente a sensação de conforto gastrointestinal. Porém, estatisticamente houve modificação dos escores de percepção gastrointestinal para inchaço na linha de tempo para BALL (2 h pós-ingestão=3.8 UA vs. 1.2 UA pré-exercício e 1.4 UA pós-exercício), assim como escore maior que a bebida BACH (1.7 UA), com tamanho de efeito grande. Apesar de às 4 h pós-ingestão ocorrer o restabelecimento do escores para inchaço, há evidências de que a leucina pode ter alguns efeitos via circuito hipotálamo-tronco cerebral específico que liga disponibilidade de aminoácidos e de detecção de nutrientes para o controle da ingestão de alimentos (BLOUET *et al.*, 2009).

Considerando o uso pós-exercício em humanos, Thomas *et al.* (2009), especulando capacidade recuperativa de uma BAC no mercado americano, observaram uma tendência estatística superior de sensação de saciedade e menor sensação de fome em relação a repositor energético para atletas e BEC(CHO-E), ocorrendo a ingestão (1 g/kg CHO) imediatamente após e com 2 h após protocolo de exercício em cicloergometro. Cabe assim ressaltar que a sensação de inchaço pode ser esperada para propostas multi-ingredientes como no caso da BALL, com a co-ingestão de CHO, PRO e GOR em função de sua densidade energética, por provocar pressão osmótica, por ser hipertônico e, principalmente, caso seja usado em grandes

volumes relativos a massa corporal, que conseqüentemente irá provocar taxas inferiores de esvaziamento gástrico e acusação de desconforto gastrointestinal.

No caso particular do presente estudo, parece que o inchaço relatado pode ser em função da L-leucina, já que no grupo controle não houve problemas de escores para os atributos de sensação gastrointestinal após tratamento, sendo esta uma mesma matriz de bebida achocolatada. A matriz era uma bebida isenta de lactose e glúten, já que boa parcela da população mundial sofre de intolerância à lactose (ODEDRA, 2015) ou das desordens advindas da ingestão do glúten (SDEPANIAN *et al.*, 1999). Assim, apesar da amostra ser representada por não declarantes de problemas de intolerância à lactose ou alergia a leite e derivados e/ou glúten, pode se acreditar que a proposta da matriz colaborou em não sensibilizar gatilhos para sintomas como distensão, flatulência, dor abdominal e diarreia que são comuns (SZILAGYI, 2015). Futuros estudos poderão atestar quantitativamente a ausência de lactose na BALL, assim como experimentos com controles e diagnóstico mais seguros para aplicação em voluntários com intolerância à lactose e/ou celíacos.

Além do aspecto tecnológico da BALL, permitindo um produto com ausência de lactose e glúten, o volume final de ingestão adotado ( $630 \pm 80$  mL) está de acordo com estudos anteriores para BAC (GILSON *et al.*, 2010; KARP *et al.*, 2006; LUNN *et al.*, 2012; SPACCAROTELLA *et al.*, 2011) e leite bovino (COCKBURN *et al.*, 2012; COCKBURN *et al.*, 2013) e pode ter colaborado para boa aceitação afetiva e o não comprometimento de sensação gastrointestinal. O protocolo de ingestão das bebidas também pôde ter colaborado (i.e, 50%, 30% e 20%, imediatamente pós, 45 min e 75 min pós, respectivamente). Tal abordagem também visou observar pontos de cortes para que as taxas ótimas de oxidação de CHO e PRO não fossem ultrapassadas (i.e, 0,75 g/kg/h; 0,5 g/kg/h, respectivamente) (VAN LOON *et al.*, 2000a; VAN LOON *et al.*, 2000b). Da mesma forma, também foi considerado o risco de toxicidade, com a quantidade de ingestão em aproximadamente 70% abaixo do limite máximo de ingestão tolerável para leucina (ELANGO *et al.*, 2012; PENCHARZ *et al.*, 2012).

Estudo prévio demonstrou que uma bebida achocolatada comercial (BAC) foi mais bem aceita em termos de palatabilidade em comparação a um suplemento de recuperação de atletas sabor chocolate comercial (PRITCHETT *et al.*, 2009). Há

limitação na literatura de estudos usando bebidas achocolatadas que verificassem a sensação gastrointestinal, saciedade, palatabilidade e comportamento alimentar subsequente a exercício físico. Apesar dessas limitações, assim como o não delineamento particular para análise sensorial no presente estudo, a ingestão de BALL como a proposta, pode ser uma alternativa as bebidas esportivas para intervenção nutricional para recuperação pós-exercício.

Considerando ainda que o ambiente de vestiário pós-jogo de futebol pode ser conturbado para ações pontuais e organizadas, a BALL possui bom apelo sensorial e pode sanear problemas alimentares imediatos dos atletas pós-exercícios e competição como a comum sensação de ausência de apetite ou desconforto gastrointestinal que sentem se comerem alimentos sólidos (BURKE, 1997). E também da comissão técnica pelo fato do contexto não ser prático para preparar, controlar a ingestão ou que estimule comer alimentos reais (BEELEN *et al.*, 2010).

Apesar da abordagem de delineamento do presente estudo não utilizar como controle experimental uma BAC ou convencional para atletas, como por exemplo frente a BEC(CHO-E) ou energéticos comerciais, o uso de BALL pode ter vantagens pela sua densidade energética (~1 kcal/mL) facilitando o cumprimento da necessidade dietética pós-jogo de futebolistas ao oferecer nos primeiros 75 minutos da recuperação aproximadamente 55% ( $634 \pm 47$  kcal) da estimativa do gasto energético de uma partida de futebol (1100 a 1500 kcal; COELHO *et al.*, 2010; EKBLUM, 1986; OSGNACH *et al.*, 2010; STØLEN *et al.*, 2005).

Além disso, ainda que não fosse testado, poderá ser expeculado que a BALL pode ter efeitos superiores as bebidas comerciais por contemplar esse critério energético e de cinética de absorção para desporto com alto desgaste como o futebol, ao oferecer proteína de boa qualidade (i.e, composição de aminoácidos) com diferentes taxas de solubilização (i.e, rápida, intermédia ou lenta) (BOS *et al.*, 2003). Da mesma forma, é opção mais segura para os atletas ao passo que é recomendado que eles utilizem alimentos ou produtos que aproximem-se de uma refeição mista em vez de suplementos nutricionais convencionais (SOUSA *et al.*, 2013), afastando, inclusive, a chance de contaminação potencial resultando em *doping* acidental (BURKE *et al.*, 2009).

## 6.2. Resposta insulínica

Entre os principais resultados do estudo está resposta insulínica ampliada às 2 h pós-ingestão com uso de BALL ( $43 \pm 20 \mu\text{UI/mL}$ ) em comparação com BACH ( $21 \pm 10 \mu\text{UI/mL}$ ), sendo observado tamanho de efeito grande. Outra interpretação de inferência também apontou que tal resultado pode ser classificado como “muito provavelmente” para probabilidades de significado clínico ou prático (HOPKINS *et al.*, 2002). Observando valores descritivos obtidos por delta, nota-se que os valores às 2 h de ingestão estavam em 107% acima da linha de base pré-exercício e ultrapassaram em 86% o limite superior de normalidade clínica ( $23 \mu\text{UI/mL}$ ) (HENRY, 2013).

Considerando respostas a tecidos periféricos para atingir propriedades pró-anabolizantes, atingir o limite de 25% da linha de base tem sido considerado como ponto de corte para efeito anabólico desse hormônio, sendo suficiente para influenciar troca de aminoácidos entre tecidos (POZEFSKY *et al.*, 1969). Valores de concentrações de insulina na veia porta de aproximadamente 19-24 mU/L ( $10$  a  $24 \mu\text{UI/mL}$ ) também tem sido observados como de sinalização quase máxima para síntese de glicogênio hepático (RODEN *et al.*, 1996).

Para atendimento da hipótese de resposta hiperinsulínica da BALL, a quantidade de ingestão do presente estudo visou uma suplementação aproximada daquela em que têm sido demonstrado saturar a síntese da proteína muscular pós-exercício correspondendo a uma ingestão de leucina na ordem de  $0,150 \text{ g/kg}$ ;  $\sim 10 \text{ g/h}$ , atingindo também as recomendações para EAA (6-20 g) (ARETA *et al.*, 2013; ROWLANDS *et al.*, 2015). Evitando efeitos de tratamento inconclusivos, no presente estudo foi adotado a mesma matriz de bebida achocoladata para placebo, modificando seu perfil aminoácídico para controle como supracitado para o caso da leucina (1,5 g de L-leucina na BALL vs. 1,5 g de CBH na BACH).

Além desse perfil aminoacídico particular visando atingir o objetivo do estudo, há de se considerar que a composição CHO/PRO em  $\sim 3:1$  da matriz é reconhecida por possibilitar respostas insulínótropicas (DETKO *et al.*, 2013; FERGUSON-STEGALL *et al.*, 2011; HARA *et al.*, 2011; IVY *et al.*, 2002; IVY *et al.*, 2008). Por esse motivo, os valores observados na bebida BACH também foram elevados, porém sem

ultrapassar o limite superior de normalidade clínica (10% abaixo). A curva de retorno da glicose na linha de tempo até às 4 h semelhante confirma evidências de que leucina e glicina (maior componente do CBH, ~27%) podem ser considerados dois dos aminoácidos mais potentes para redução da glicose quando administrados individualmente. Porém, nota-se a remoção da glicose da mesma forma com aumento modesto de insulina via glicina (IVERSON *et al.*, 2014).

Considerando que respostas insulínicas são também dependentes do IG (KREIDER *et al.*, 2007), tal possibilidade pode ser afastada considerando que houve igualdade por se tratar de uma mesma matriz, apesar de não ter sido mensurado o IG das bebidas de tratamento. Assim, o efeito secretogogo para insulina superior da BALL pode ser atribuído a suplementação de L-leucina, visto que o protocolo de ingestão foi idênticos e a curva glicêmica entre os tratamentos foram semelhantes.

Os resultados do presente estudo indicando glicose e insulina elevados às 2 h após a ingestão de BALL e com retorno aos valores pré-exercício às 4 h pós-ingestão pode ter alguns objetivos práticos além dos anabólicos como objetivo clássico esperado para suplementação de leucina. Primeiramente, por essa forma de BALL poder ajudar a manter os níveis de glicose e prevenção de incidentes de hipoglicemia que alguns indivíduos podem experimentar quando há ingestão de grandes quantidades de CHO e PRO (KREIDER *et al.*, 2007). Segundo por permitir cumprimento de referências temporais de intervenção de CHO pós-exercício (50 g ou 1 g/kg nos primeiros 30 min; PHILLIPS *et al.*, 2011), com maior sensibilização até às 2 h pós-exercício (IVY *et al.*, 1988), almejando, assim, aproveitar esse hormônio como um dos principais agentes anabólicos, promovendo a síntese e armazenamento de glicose, gorduras e proteínas, inibindo a degradação de proteínas e retorno de aminoácidos para a circulação (SALTIEL, 2016).

Cabe ressaltar que o efeito clássico da insulina sobre a homeostase da glicose é a sua capacidade para estimular o transporte de glicose e gorduras no músculo através da translocação de transportadores locais de glicose como o GLUT-4 intracelulares para a membrana plasmática, e muitos destes passos são controladas pela regulação de pequenas proteínas G (SALTIEL, 2016).

Nenhuma medida de avaliação da taxa de ressíntese de glicogênio foi proposta no presente estudo, mas é reconhecido que o restabelecimento de glicogênio é fundamental para jogadores de futebol, estando seus níveis associados a fatores de rendimento e fadiga (KRUSTRUP *et al.*, 2011). Uma intervenção eficaz também se faz necessária pelo fato de que no futebol, por exemplo, a incapacidade dos jogadores para manter os níveis normais de glicogênio muscular, mesmo em repouso, provavelmente estão relacionados às intervenções pós-jogos e suas práticas alimentares em ambiente familiares (BURKE *et al.*, 2006; CLARK, 1994; JACOBS *et al.*, 1982; NÉDÉLEC *et al.*, 2013).

Além das anteriormente apontadas, dificuldade de se atingir a intervenção pontual, ofertando CHO e PRO pós-exercício, tem sido sugerido que a presença de células inflamatórias na sequência a um EIDM, como os observados no presente estudo, pode causar concorrência para a glicose sanguínea dentro do músculo danificado, e que isso resultaria em aumento de utilização desse substrato, o que gera consequentemente diminuição de armazenamento de glicogênio muscular (TEE *et al.*, 2007).

Estudos têm apontado vantagens da combinação CHO-PRO, ampliando a capacidade de restauração do glicogênio a partir do oferecimento de bebida achocolatada comercial *versus* CHO ou placebo em ciclistas amadores (225% pós-exercício em 24 h) (WOJCIK *et al.*, 2001) ou maior apenas em relação a placebo (23,58 vs. 7,05 mol/g d/w) em ciclistas e triatletas treinados (FERGUSON-STEGALL *et al.*, 2011). No estudo de Wojcik *et al.* (2001) observou valores de insulina quatro vezes maior para uma BAC após 3 h de ingestão (~25  $\mu$ UI/mL). Ferguson-Stegall *et al.* (2001) observaram valores próximos a 300 pmol/L (~43  $\mu$ UI/mL) após 45 minutos de ingestão. Diferentes tempos de medidas dificultam comparações aos valores do presente estudo com BALL.

No estudo de Lunn *et al.* (2012) houve aumento da insulina no plasma 30 minutos após ingestão (78  $\mu$ UI/mL) servindo uma BAC frente uma bebida CHO isocalórica (43  $\mu$ UI/mL). Apesar da resposta ser maior 83% maior na BAC, não foi observado diferença estatística. Nesse estudo ainda não foi observado aumento de síntese de glicogênio muscular superior para a BAC após 3 h de recuperação através de biopsia (6.4  $\pm$  0.9 vs. 5.4  $\pm$  0.6 g/100 g tecido).

Limitações metodológicas desses estudos, como bebidas não isoenergéticas e não relativização da ingestão por massa corporal, assim como diferentes tempos de coleta e protocolos de indução de fadiga dificultam inferências e extrapolações desses resultados via resposta insulínica. Por exemplo, valores inexpressíveis de depleção de glicogênio parecem serem restauradas de forma efetiva somente com o oferecimento de CHO (FOURNIER *et al.*, 2002; ZACHWIEJA *et al.*, 1991). Para o futebol, a combinação CHO-PRO nas interações pós-exercício parecem ser justificadas através de resposta insulínica ampliada e oferecimento de nutrientes para a recuperação de diversos parâmetros energéticos e estruturais de tecido muscular. No futebol a depleção de glicogênio muscular é significativa (NIELSEN *et al.*, 2012; RICO-SANZ *et al.*, 1999) e pode necessitar da combinação CHO-PRO para alcançar recuperação de ressintese superior via rota insulino-dependente.

A leucina e ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico são estimulantes potentes da secreção de insulina (WILKINSON *et al.*, 2013). Desta forma, através da BALL proposta, pode ser ofertado nutrientes e criar cenário anabólico favorável através da resposta insulínica aumentada. Fisiologicamente, a síntese de glicogênio muscular pode ser regulada por múltiplos mecanismos, incluindo o aumento da sensibilidade à insulina, da expressão *glicogênio sintase*, a ativação alostérica da *glicogênio sintase* e atividade da *proteína fosfatase 1* (PP1) (JENSEN *et al.*, 2012; MANABE *et al.*, 2013). Além disso, esta fase rápida da síntese de glicogênio muscular é caracterizada por uma translocação induzida pelo exercício na proteína transportadora de glicose-4 (GLUT-4) à superfície das células, conduzindo a um aumento da permeabilidade da membrana muscular para a glicose (IVY *et al.*, 1998).

Os mecanismos pelos quais a leucina exerce os seus efeitos secretagógicos variam (XU *et al.*, 2001). Leucina pode servir como uma fonte de combustível para a produção de ATP ou ser convertido em ácido  $\alpha$ -cetoisocaproato, um intermediário metabólico que por sua vez inibe a atividade do canal de  $K_{ATP}$ , conduzindo à despolarização da membrana e desencadeando a secreção de insulina (BRÄNSTRÖM *et al.*, 1998). Leucina também regula a liberação de insulina, agindo sobre o glutamato-desidrogenase, uma enzima chave do ciclo do ácido tricarboxílico (CHENG *et al.*, 2015). Rotas adicionais para respostas insulínicas da leucina incluem sua conversão em acetoacetato, acetil-CoA, as oscilações provocadas no

cálcio nas células  $\beta$  pancreáticas (XU *et al.*, 2001) e a regulação da expressão de alguns genes que são fundamentais para a secreção de insulina nas ilhotas pancreáticas (CHENG *et al.*, 2015).

No entanto, independentemente da mistura utilizada, deve-se considerar que o aumento de leucina no plasma pode ser conseguida por vias distintas de administração e fatores como a fonte de proteína e digestibilidade pode influenciá-lo diretamente, sendo as respostas dependentes da dose (NICASTRO *et al.*, 2011). Nenhuma medida de aminoacidemia plasmática pós-ingestão e composição centesimal e aminograma da BALL foi realizado no presente estudo, porém o processo fabril foi projetado para permitir a máxima biodisponibilidade da L-leucina, forma de isômero natural que propicia ser ativamente transportado em maior velocidade através da mucosa (GROPPER *et al.*, 1993). Futuros estudos poderão evidenciar se o aumento da resposta da insulina é devido ao efeito secretogogo e/ou supressor do glucagon.

Apesar de existirem muitos benefícios para a suplementação de leucina, há evidências de que também ocorram alguns efeitos adversos, tais como antagonismo (desequilíbrio) de outros ACR (isoleucina e valina), principalmente com uso crônico (MATTHEWS, 2005; VERHOEVEN *et al.*, 2009). No entanto, na BALL, há naturalmente presença de aminoácidos de rápida (whey) e lenta absorção (caseína), o que poderia evitar antagonismos sobre a aminoacidemia. Futuros estudos poderão elucidar a aminoacidemia pós-ingestão, assim como mecanismos de ação molecular do *pool* de aminoácidos presentes na BALL e a eficácia de tais estratégias de dieta sobre a síntese de proteínas do músculo.

### **6.3. Dano muscular e perceptivas de dor, esforço e recuperação**

Tem sido sugerido que o teor de proteínas em bebidas achocolatadas esta associada com a maior absorção de aminoácidos no músculo proporcionando assim aumento da síntese de proteínas musculares (WILKINSON *et al.*, 2007), bem como o aumento da ativação de proteínas de sinalização associados com a síntese de proteínas e atenuação de marcadores de degradação da proteína muscular pós-exercício (FERGUSON-STEGALL *et al.*, 2011; LUNN *et al.*, 2012).



Desta forma, além das vias anabólicas iniciadas pela insulina, foi colocado como hipótese no presente estudo que a BALL pudesse induzir os efeitos de sinalização da rota da leucina sobre a síntese proteica muscular, que ocorrem por mecanismos dependentes desse hormônio, incluindo a sinalização mediada por *4E-BP1* e a *p70S6k*, assim como por indução de efeitos independentes que são mediados por mecanismos ainda não totalmente esclarecido envolvendo a fosforilação do eIF4G e/ou sua associação com o complexo eIF4E (ANTHONY *et al.*, 2001; MILLWARD, 2012; ROGERO *et al.*, 2008). Em termos práticos, medidos no presente estudo, estariam as vantagens observadas como amenização de danos musculares e dores percebidas na linha de tempo recuperativa.

De importância fundamental para monitoramento de atletas, marcadores bioquímicos indicativos de microtraumas musculares advindos de realização de exercícios como a creatina quinase (CK) e mioglobina (Mb) (COELHO *et al.*, 2011), assim como escalas subjetivas de dor e recuperação percebida, foram monitoradas no presente estudo especulando respostas favoráveis na linha do tempo após ingestão de BALL. Tais marcadores representam indiretamente a exigência física imposta a futebolistas e são usadas historicamente como controle de monitoramento recuperativo (COELHO *et al.*, 2015; GIFT, 1989; IMPELLIZZERI *et al.*, 2007; LAURENT *et al.*, 2011; MOHR *et al.*, 2015).

Não houve atendimento pleno das hipóteses para efeitos recuperativos advindos do tratamento com BALL, ocorrendo diferença entre as bebidas somente para a CK às 24 h pós-ingestão com efeito grande (BALL =  $619 \pm 267$  U/L vs. BACH =  $1208 \pm 731$  U/L;  $p < 0,05$ ; Gráfico ). A probabilidade de significado clínico ou prático dessa diferença foi “observado como provavelmente” (89%;  $1,5 \times / \div \pm 1,3$  [90 % IC]). Para mioglobina, escala de Borg, dor psicofísica e VAS, ambas as bebidas proporcionaram efeitos insuficientes para retornar aos valores de respostas pré-exercício, no entanto proporcionaram respostas inferiores em relação ao momento pós-exercício. Somente para a escala de recuperação percebida houve restabelecimento de valores no momento de 24 h da recuperação para a linha de base, obtida no momento pré-exercício.

Os resultados observados com amenização do valores da CK corroboram o que a maioria dos estudos similares têm demonstrado com uso de BAC na recuperação

pós-exercícios (COCKBURN *et al.*, 2008; COCKBURN *et al.*, 2010; GILSON *et al.*, 2010; PRITCHETT *et al.*, 2009; WOJCIK *et al.*, 2001), porém não sendo unânime (FERGUSON-STEGALL *et al.*, 2011; PESCHEK *et al.*, 2014). Para a Mb, os estudos de Cockburn *et al.* (2008) notaram amenização dos valores de forma significativa para a BAC, ao passo que outros não demonstraram tal efeito (FERGUSON-STEGALL *et al.*, 2011; GILSON *et al.*, 2010).

Recentemente, observações em jogadores semi-profissionais de futebol confirmaram correlação positiva ( $n=7$ ;  $r=0.80$ ,  $p=0.03$ ) entre número de *sprints* e alterações na CK (THORPE *et al.*, 2012). Outros estudos em jogadores de futebol observaram valores individuais dessa enzima pós-jogo oficial (24, 48 e 72 h) variando de 500 a 1200 U/L (ASCENSAO *et al.*, 2011; ASCENSÃO *et al.*, 2008; COELHO *et al.*, 2011; FATOUROS *et al.*, 2010; KRUSTRUP *et al.*, 2011; LAZARIM *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013). Aumentos nos níveis de CK nas primeiras 24-48 h podem refletir um aumento na permeabilidade sarcolemal (WARREN *et al.*, 2002), e elevações superiores a quatro dias podem estar ligados à necrose miofibrilar (TURNER *et al.*, 2012), observadas inclusive em seres humanos (JONES *et al.*, 1986). Para a Mb foram notados valores individuais entre 190 a 350  $\mu\text{g/L}$ ; ASCENSÃO *et al.*, 2008; KRUSTRUP *et al.*, 2011) valores esses que podem estar aumentados por seis vezes como observado em jogadores de alto nível da Dinamarca (KRUSTRUP *et al.*, 2011) ou por  $238 \pm 79\%$  em jogadores semiprofissionais ingleses em relação ao pré-exercício (THORPE *et al.*, 2012).

Desta forma, o futebol é reconhecido como de potencial forma de “exercício indutor de dano muscular” (EIDM), repercutida clinicamente por dor muscular percebida subjetivamente que perdura por vários dias pós-exercício (CHEUNG *et al.*, 2003). Essas percepções subjetivas geralmente acontecem com início tardio, podendo continuar elevadas desde momentos imediatamente pós-jogo, atingindo um pico por volta de 48 h e somente retornando aos níveis basais 96 h após o jogo, mesmo em jogadores de elite (FATOUROS *et al.*, 2010; ISPIRLIDIS *et al.*, 2008). Durante esse período, amplitude articular de movimento do joelho, medido por índice do edema muscular, diminuiu às 24 h após o jogo, atingindo o seu valor mais baixo às 48 h, retornando aos valores de pré-exercício fisiológicos às 96 h (ISPIRLIDIS *et al.*, 2008).

No que tange percepção de DOMS, as mesmas não parecem estarem correlacionadas de maneira linear com as respostas de CK observando resultados diferentes nos estudos. Talvez devido à alta variabilidade intraindividual da CK, bem como a natureza dinâmica de sua liberação via transporte linfático, *clearance* e pouca relação com torque muscular após EIDM (FRIDÉN *et al.*, 2001). Dessa forma, respostas atenuadas para DOMS foram relatados quando BAC foi consumida imediatamente após protocolo de exercício provocadores de danos musculares, sendo demonstrado amenização de CK (COCKBURN *et al.*, 2010). No entanto, outros estudos não mostraram nenhuma mudança em DOMS apesar dos aumentos atenuados da CK sérica durante a recuperação (COCKBURN *et al.*, 2008; GILSON *et al.*, 2010; PRITCHETT *et al.*, 2009).

Gilson *et al.* (2010) relataram que o consumo de BAC atenuaram as respostas CK (BAC=  $316,9 \pm 188,3$  U/L vs. CHO=  $431,6 \pm 310,8$  U/L), mas produziu mudanças similares na performance do exercício, nas concentrações de mioglobina sérica, na dor muscular tardia e na função muscular em comparação com o consumo de uma bebida recuperativa comercial contendo CHO-PRO para atletas [B(CHO-PRO)]. Outros estudos utilizando leite pasteurizado homogeneizado semidesnatado (COCKBURN *et al.*, 2012; COCKBURN *et al.*, 2013) ou *shakes* baseados em CHO e PRO do leite (COCKBURN *et al.*, 2008; COCKBURN *et al.*, 2010) observaram efeitos amenizadores em DOMS, CK e Mb, e menor depreciação de desempenho muscular isocinético em avaliações de 24 e 48 h após protocolo de exercício indutor de fadiga e dano muscular em aparelho de dinamometria isocinética.

Considerando a escala VAS, Pritchett *et al.* (2009) avaliando ciclistas e triatletas, observou redução do aumento de CK na linha do tempo em relação a uma bebida para recuperação de atletas comercial [B(CHO-PRO)] sabor chocolate. Porém, não foram observadas diferenças significativas na escala perceptiva de dor muscular (VAS) e na performance ao pedalar em carga única a 85%  $VO_{2max}$  até fadiga voluntária com BAC.

Portanto, sugere-se que o comportamento similar nas escalas de recuperação percebida e sintomas atenuados de dor muscular durante um período de curto prazo recuperativo, como o avaliado no presente estudo, possivelmente ocorreu por

causa de disponibilidade de energia numa mesma matriz em ambas as bebidas achocolatadas do presente estudo.

Quanto aos resultados observados para CK, os mesmos devem ser inferidos com muita cautela em virtude do tamanho amostral e ampla variabilidade de resposta da mesma, apesar de ser estatisticamente significativo e classificado como “provavelmente” para probabilidade de significado clínico ou prático dessa diferença. Em termos de proposta nutricional, pode ser hipotetizado de que fornecimento de L-leucina na BALL pode ter permitido resíntese em taxas superiores de proteínas, e, portanto, mais rápida recuperação. São necessárias mais pesquisas para determinar a tendência observada para CK nas primeiras horas após o exercício excêntrico é metabolicamente significativa via liberação de leucina, resposta insulínica e demais nutrientes da BALL.

Outro estudo observou a redução na CK (21-25 %) após suplementação com uma bebida LEU-PRO durante os seis dias de protocolos de exercício intensos (~3 h; 50 a 90% Wmax) (NELSON *et al.*, 2012). Fisiologicamente, alguns estudos postularam que existem receptor de membrana no músculo esquelético que são sensíveis a leucina (BOHÉ *et al.*, 2003). Estes receptores de membrana (transportadores e receptores) podem modular proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelulares (Akt, mTOR, Vps34, 4E-BP1, e fatores de iniciação eucarióticos) (KATO *et al.*, 2015; ROWLANDS *et al.*, 2015).

#### **6.4. Respostas imunológicas**

Vários agentes nutricionais vem sendo testados quanto à capacidade de atenuar as alterações imunes e inflamação após o exercício intenso, diminuindo assim a magnitude do estresse fisiológico e risco a ITRS (GLEESON, 2015; WALSH *et al.*, 2011). Esta estratégia é semelhante ao suporte nutricional imune fornecido a pacientes em recuperação de trauma e cirurgia, e para idosos fragilizados (NIEMAN, 2008). A principal hipótese sustentada é que os suplementos pudessem aumentar a vigilância imunológica contra uma ampla variedade de agentes patogênicos em atletas, principalmente operando em compensação favorável a defesa inata,

momento em que componentes imunes adaptativas estão mais lentos (NIEMAN *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2011).

Desta forma, para o presente estudo foi hipotetizado que a BALL pudesse ter efeito modulador da função imune inata pós-exercício. Primeiramente, tal efeito é sustentado pelo fato de que a ingestão de carboidratos durante e após exercício com características de *endurance* seria capaz de atenuar hormônios imunossupressores (GLEESON, 2015; WALSH *et al.*, 2011). Além disso, é considerado que as proteínas do soro de leite bovino tenham vários benefícios sobre a saúde humana, em particular sobre a imunidade inata e adquirida (DUARTE *et al.*, 2011; MARSHALL, 2004; RUSU *et al.*, 2009).

Entre os pressupostos teóricos da suplementação estaria o fato da leucina ser um potente ativador e regulador translacionais da mTOR (ANTHONY *et al.*, 2000; CHENG *et al.*, 2015), que é um regulador central de diversas respostas celulares a estímulos ambientais. Em células do sistema imunológico, a mTOR modula a diferenciação e a função das células T em resposta a estímulos ambientais e demandas metabólicas celulares (POWELL *et al.*, 2010) e poderia ser um mecanismo pelo qual a BALL exercesse efeitos imunomoduladores superiores sobre outras células do processo inflamatório.

Entre as preocupações do presente estudo para uso válido do exercício como modelo imunodepressor e de efeito suficiente para uma resposta de fase aguda para o local da infecção (WALSH *et al.*, 2011) similar ao futebol, estaria a observância de alguns fatores que poderiam afetar a resposta imunológica, sendo proeminentes a intensidade, duração, idade, estado nutricional e história de infecção (GLEESON, 2015; SIMPSON *et al.*, 2015). Particularmente para a especificidade de resposta imune, é considerado que a duração do exercício tem uma influência mais forte sobre a contagem total de leucócitos, principalmente via elevação de neutrófilos, ao passo que a resposta do número de linfócitos são principalmente dependentes da intensidade (WALSH *et al.*, 2011).

No presente estudo, a resposta do número total de leucócitos quase dobrou após o protocolo de exercício que simula o jogo (SAFT90+), o que é apoiado por estudos usando treinamentos (MALM *et al.*, 2004; REBELO *et al.*, 1998) e jogos no futebol

(MOHR *et al.*, 2015). Esse achado caracteriza leucocitose, sendo a alteração hematológica mais consistentemente observada em resposta ao exercício exaustivo e prolongado (WALSH *et al.*, 2011) como é o caso do futebol (MALM *et al.*, 2004), podendo este aumento estar envolvido na resposta inflamatória regenerativa pós-exercício.

A leucocitose no presente estudo manteve-se elevada pelo período monitorado de 4 h após o protocolo (~20% acima do limite superior clínico), sendo normalizado na linha de base pré-exercício após às 24 h de recuperação, não havendo diferenças entre as bebidas de tratamento. Episódios únicos de exercício evocam uma leucocitose notável e uma redistribuição das células efectoras entre o compartimento do sangue e da linfóide, e nos tecidos periféricos, sendo uma resposta que é mediada pelo aumento da hemodinâmica com desmarginação (BRENNER *et al.*, 1998; OTTAWAY *et al.*, 1994), bem como a liberação de catecolaminas e glicocorticóides após a ativação do SNS e do eixo hipófise-adrenal (SIMPSON *et al.*, 2015).

Embora o aumento do número de leucócitos possa ser muitas vezes indicativo de infecção e/ou inflamação, a leucocitose induzida pelo exercício é conhecida por ser um fenômeno transiente, com contagens normais de leucócitos e sub-tipos retornando aos níveis prévios de exercício dentro de 6-24 h após a cessação do exercício (SIMPSON *et al.*, 2015), como ocorreu no presente estudo para as duas bebidas de tratamento.

Entre as sub-classes do leucócitos (basófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e neutrófilos), as células predominantemente mobilizados com o exercício são os neutrófilos e linfócitos com uma menor contribuição a ser feita a partir de monócitos (SIMPSON *et al.*, 2015; WALSH *et al.*, 2011). Desta forma, em uma resposta inflamatória aguda, considerando modelos de estresse usando o exercício físico, os neutrófilos e os monócitos são as primeiras células a atingir o local lesionado, seguido de 24 a 48 h mais tarde por linfócitos se o tecido não está devidamente reparado (WALSH *et al.*, 2011). No presente estudo, houve neutrofilia (~37%) durante as primeiras 4 h da recuperação, mas com valores ligeiramente inferiores (~13%) às 24 h em relação ao valor pré-exercício. Esse comportamento foi similar entre as duas bebidas, e sem no entanto, descaracterizar o limite clínico inferior.

Apesar de inconclusivo, por efeito retardado de estimulação do eixo HPA e liberação de corticoides durante o exercício, o aumento de neutrófilos observados para BALL (2 a 4 h pós-ingestão) sugerindo que a mobilização de neutrófilos e a migração pode estar envolvida na lesão muscular e processos inflamatórios. Além disso, logo após a chegada de neutrófilos no músculo lesionado, o tecido começa a ser invadido por monócitos e macrófagos, resultando em uma significativa elevação de seus números no tecido lesionado por 12-24 h (WALSH *et al.*, 2011).

Assim, os locais onde existem microlesões geradas pelo exercício são rapidamente invadidos pelos neutrófilos contribuindo basicamente de duas formas: (i) função fagocitária, limpando os tecidos necrosados; e (ii) ampliando os processos inflamatórios através da liberação de citocinas pró-inflamatória, tais como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (ANDERSSON *et al.*, 2010; KANDA *et al.*, 2013; WALSH *et al.*, 2011).

Outro efeito somativo pode ser observado pelo fator ativador de plaquetas (FAP) que é um fosfoglicérido biologicamente ativo, sendo este resultado das respostas inflamatórias sistêmicas geradas por fagócitos, células endoteliais e plaquetas, têm sido relacionado ao acionamento dos neutrófilos em resposta a inflamação tecidual (TIDBALL *et al.*, 2010). Entre diversas funções, FAP apresenta importante efeito sobre o tônus e a permeabilidade vascular, promovendo a maior parte das reações inflamatórias, englobando o aumento de adesão dos leucócitos, a quimiotaxia e a degranulação leucocitária. Todo esse processo faz, em condição hipotética, que respostas amortizadas de CK como as observadas com o uso de BALL pode estar relacionado com a neutrofilia gerada. Futuros estudos poderão observar efeitos de desmarginação, quimiotaxia e função dos neutrófilos no processo de reparação muscular.

Há limitação de estudos com bebidas achocolatadas e verificação de efeitos agudos nos comportamentos de células de defesa inata para efeitos comparativos como os realizados no presente estudo. Entre as possibilidades de semelhança, está o estudo de Ferguson-Stegall *et al.* (2011), onde não observaram resultados superiores para uma BAC frente a B(CHO) ou placebo utilizando como marcadores imunes as citocinas IL-6, IL-10, IL-8 e IL-1ra (FERGUSON-STEGALL *et al.*, 2011). Papacosta *et al.* (2015) examinou os efeitos de uma BAC ou água no consumo pós-

exercício durante 5 dias de treinamento intensivo de judô, não havendo diferenças entre os tratamentos para as respostas da s-IgA (PAPACOSTA *et al.*, 2015).

Embora seja considerado que as proteínas do soro de leite bovino tenham vários benefícios sobre a saúde humana, em particular sobre a imunidade inata e adquirida (DUARTE *et al.*, 2011; MARSHALL, 2004; RUSU *et al.*, 2009), os mecanismos celulares e moleculares exatos da ação de proteínas particulares e seus fragmentados permanecem não totalmente compreendidos. Talvez por isso, algumas evidências tem encontrado efeito da ingestão de proteínas do leite bovino sobre a imunidade inata (LÓPEZ-EXPÓSITO *et al.*, 2008; RUSU *et al.*, 2009; VOGEL, 2012).

Da mesma forma, há evidências da ingestão de leucina suplementada com CHO-PRO após o exercício sobre a função e capacidade oxidativa dos neutrófilos durante a recuperação de exercício intenso e prolongado quando comparada a uma bebida controle (CHO-GOR isocalórica), sendo todas consumidas entre 1-3 h pós-exercício durante 6 dias (NELSON *et al.*, 2013). Segundo esses pesquisadores, as concentrações de aminoácidos no plasma e acilcarnitina alterados com a suplementação de leucina pode explicar, em parte, a redução aguda na função dos neutrófilos e aumento da sua capacidade oxidativa pós-exercício no sexto dia da experimentação, o que poderia impactar processos dependentes de neutrófilos durante a recuperação de treinamento intenso.

Talvez pela inconsistência de resultados favoráveis, a suplementação de aminoácidos não tem sido recomendada porque os melhores estudos não mostraram benefício adicional quando comparado ao placebo, talvez devido a *pool* de armazenamento abundantes dentro do corpo que não podem ser suficientemente esgotados pelo exercício (GLEESON *et al.*, 2004; GLEESON, 2015). Assim, parece que a semelhança entre as bebidas de tratamento no presente estudo possam ser melhores explicadas pela mesma densidade energética e quantidades de CHO-PRO presentes.

Tem sido demonstrado recentemente que oferta de CHO ou CHO-PRO imediatamente após 2 h de exercício extenuante evitou a redução da desgranulação de neutrófilos em comparação quando somente água foi consumida nesse mesmo



período de recuperação (COSTA *et al.*, 2011). No entanto, não foi notado diferenças entre as duas propostas de tratamento, possuindo a mesma quantidade relativa de CHO para ingestão. Portanto, parece mesmo que a presença de CHO nessas bebidas tem ação de favorecimento de diminuir também os hormônios de estresse e citocinas anti-inflamatórias (IL-6 e IL-10)(GLEESON, 2013; WALSH *et al.*, 2011).

Além disso, uma possível associação entre o consumo de CHO durante o exercício com uma menor perturbação do eixo HPA, tem gerado evidências de menor alteração pós-exercício na razão neutrófilo:linfócitos (um marcador de estresse imunológico), o que pode ser indicativo de menor estresse no sistema imunitário e menor imunodepressão induzida por exercício (GLEESON, 2013; NIEMAN *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2011). No presente estudo a razão N/L se comportou de forma semelhante, com linha de tendência menor para a bebida BACH, talvez em função da presença de glicina (~30%) no CBH. Evidências tem apontado que o aumento da concentração de glicina extracelular previne ou atenua uma variedade de respostas inflamatórias patológicas disfuncionais, principalmente através da ativação de canais de cloro-glicina (GIAMBELLUCA *et al.*, 2009; HARTOG *et al.*, 2013).

Nenhuma diferença entre as bebidas foi observada para linfócitos, havendo comportamento similares entre as bebidas, com ambas respostas acima da linha de base pré-exercício, mas dentro dos limites clínicos. Por ser um evento chave na resposta imune adaptativa, a capacidade proliferativa de linfócitos é a capacidade de acolhimento para responder a um desafio imunológico, podendo ser comprometida de forma significativa se a proliferação de linfócitos não for adequada aumentando a predisposição a infecções (SELLAR *et al.*, 2006). Proliferação de linfócitos reduzida após o exercício prolongado e exaustivo, como maratonas e triatlos, tem sido relatado por muitos autores (ROHDE *et al.*, 1996; SUZUKI *et al.*, 2000; ZIMMER *et al.*, 2016). Apesar de efeito inconclusivo, ambas as intervenções nutricionais pós-exercício utilizados no presente estudo podem ter colaborado com a resposta proliferativa de linfócitos, que se soma aos fatores humorais e substâncias liberadas pelo músculo danificado, participando desta forma de processos na recuperação e reparação muscular.

Os danos musculares induzidos por exercícios, assumindo que no futebol se tem tanto a vertente mecânica como metabólica de EIDM com altos valores de CK e Mb

como os demonstrados no presente estudo, estão relacionados com o aumento de danos estruturais (miofibrilas, citoesqueletos), de processamento de energia (mitocôndria e retículo sarcoplasmático), a resposta inflamatória aguda caracterizada por infiltração de fagócitos no músculo, a aumento de radicais livres, de produção de citocinas e alterações hormonais (ANDERSSON *et al.*, 2008; BANFI *et al.*, 2012; GLEESON *et al.*, 1995; ISPIRLIDIS *et al.*, 2008).

A reparação do dano muscular provocado pelo exercício pode ser iniciada imediatamente a partir das elevações no nível intracelular de  $Ca^{2+}$  que ativam um número de vias  $Ca^{2+}$  proteolíticas e fosfolipídica-dependentes, que degradam respectivamente proteínas estruturais, contráteis e fosfolipídios de membrana (ARMSTRONG *et al.*, 1991). Subsequentemente há produção de leucotrienos e a reparação do dano muscular continua durante o período inflamatório quando os macrófagos e outras células fagocíticas são ativados no local do dano (ARMSTRONG *et al.*, 1991). A fase fagocitária está em evidência por 2 às 6 h após a lesão, e prossegue por vários dias (CHEUNG *et al.*, 2003). A fase de regeneração (remodelação tecidual), então restaura a fibra muscular à sua condição normal.

Como pode existir conexão entre leucina, estímulo da mTor e sua capacidade de modular a diferenciação e a função das células T (POWELL *et al.*, 2010), futuros estudos poderão evidenciar a existência de mecanismos pelo qual a BALL exerceu amortização das respostas de CK, sendo por vias de resíntese em taxas superiores de proteínas, ou ainda por vias de recuperação através de maior equilíbrio finamente orquestrado entre as citocinas pró e anti-inflamatórias na regulação fisiológica da miogênese. Por exemplo, monitoramento liberação de citocinas pró-inflamatória, tais como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) poderão elucidar ações em conjunto pela BALL via respostas dependentes da insulina ou ativação direta disparados na mTor. Tais mecanismos apontam que uma ação que contribui para o reparo e crescimento do tecido lesado é a ação da TNF- $\alpha$  no compartimento muscular, existindo a sua ligação aos mioblastos (células precursoras das fibras musculares) e ativando o fator de transcrição (NF- $\kappa$ B), que aumenta a proliferação celular e suprime vários processos degenerativos que operam em paralelo (TIDBALL *et al.*, 2010).

Se a ingestão de BALL pode influenciar marcadores de imunidade durante um período mais prolongado de recuperação continua a ser determinado. Considerando a perspectiva crônica, tal demanda em futuros estudos se justifica pelo fato de ter sido relatado, ao longo de uma temporada, uma depressão progressiva da função dos neutrófilos em jogadores profissionais de futebol da primeira divisão belga (BURY *et al.*, 1998). Outro estudo longitudinal notou diminuição gradual da função imune de neutrófilos durante temporada de 10 meses em jogadores profissionais (SUDA *et al.*, 2013), que abre portas para o entendimento de que atletas podem conviver com descompensações imunomoduladora de longo prazo.

### **6.5. Resposta da testosterona e cortisol**

Por necessidades energéticas para manter níveis glicêmicos (HANEISHI *et al.*, 2007), um ambiente catabólico se inicia ainda durante o jogo, com liberação de cortisol, aumentando a concentração plasmática de amônia (RICO-SANZ *et al.*, 1999; ROSTGAARD *et al.*, 2008), principalmente devido à desaminação dos ACRs (WILKINSON *et al.*, 2010). Assim, talvez por esses motivos, as respostas de cortisol e testosterona foram ampliados em relação aos valores pré-exercício no presente estudo, assim como observados em caráter agudo em outras pesquisas como o futebol (SILVA *et al.*, 2013) e fundistas (KREIDER *et al.*, 2007), ou ao longo de uma temporada no futebol (COELHO *et al.*, 2015).

Do ponto de vista da recuperação pós-exercício, esse aspecto causa preocupação quando valores caracterizam o catabolismo persistente durante a fase de recuperação, sendo demonstrada através da concentração de cortisol elevada como pode ocorrer com jogadores de futebol de elite (COELHO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2013), jogadores semiprofissionais (THORPE *et al.*, 2012) ou outros esportistas do handebol, voleibol e basquetebol (SOUGLIS *et al.*, 2015), assim como atletas de provas de resistência (KREIDER *et al.*, 2007).

No presente estudo o comportamento do cortisol foi similar entre as bebidas, com diferença significativa (57%) para 4 h após-ingestão, com BALL expressando maiores valores, sem no entanto, ultrapassar o limite clínico superior (-50%). No

entanto, devido a variabilidade desse hormônio (COELHO *et al.*, 2015; HANEISHI *et al.*, 2007), é improvável a plausibilidade de efeito de tratamento no contexto de balanço anabólico/catabólico e imunomodulador do presente estudo que intentou mimetizar o futebol. Desta forma, os aumentos observados no presente estudo nos parâmetros imunológicos (leucócitos totais e neutrófilos) pode não ter efeito principal para as bebidas como já anunciado, tendo relações com o aumento nas concentrações de cortisol plasmático (OTTAWAY *et al.*, 1994), visto que ele estimula a migração de células da medula para a circulação que posteriormente são conduzidas para os tecidos lesionados (BRENNER *et al.*, 1998).

Considerando as respostas de testosterona, outros estudos em jogadores de futebol (ISPIRLIDIS *et al.*, 2008; MALM *et al.*, 2004) confirmaram reduções (~24% e 51%, imediatamente pós e 6 h pós, respetivamente) ou mesmo quantidade circulante de testosterona inalterada (ISPIRLIDIS *et al.*, 2008). Os motivos especulados é que a testosterona poderia estimular o aumento do número de células satélite, modular a degradação das PRO celulares danificadas e dos processos inflamatórios (MALM *et al.*, 2004; VELDERS *et al.*, 2013). Assim, pode se dizer que o aumento na razão T/C pode estar relacionado com o aumento na atividade anabólica, enquanto que decréscimos na razão T/C maiores do que 30% demonstram sinais de recuperação incompleta do estresse imposto pelo exercício (BANFI *et al.*, 2006).

Po exemplo, no estudo de Silva *et al.* (2013) em que se considerou hábitos normais de recuperação e nutrição para jogadores profissionais, a razão T/C estava diminuída significativamente às 24 h e 48 h ( $9.9 \pm 0.9\%$  e  $8.3 \pm 1.5\%$ ), sendo somente restabelecida, para valores próximos ao de pré-exercício ( $12.5 \pm 0.6\%$ ) após 72 h de recuperação ( $11.5 \pm 0.8\%$ ) (SILVA *et al.*, 2013). No presente estudo essa razão se restabeleceu às 24 h pós-ingestão para ambas as bebidas. A diminuição da relação T/C também foi identificada de forma aguda pós jogos de futebol australiano (CORMACK *et al.*, 2008) e futebol (ISPIRLIDIS *et al.*, 2008).

Os resultados de tratamento com a BALL pós-exercício corrobora outros estudos utilizando BAC para respostas agudas em testosterona, cortisol e GH sérico (WOJCIK *et al.*, 2001), cortisol sérico (FERGUSON-STEAGALL *et al.*, 2011) ou testosterona salivar (PAPACOSTA *et al.*, 2015), onde tratamentos com intervenções

de BAC não afetaram significativamente o tempo de curso de cortisol, testosterona e da razão T/C. Considerando a junção de leucina com PRO numa bebida, Nelson *et al.* (2013) observaram a diminuição do cortisol antes do exercício no sexto dia de experimentação.

Outros estudos especularam benefícios anabólicos da combinação CHO-PRO na ingestão pré e pós-exercícios (CHANDLER *et al.*, 1994) ou pós-exercícios somente (KRAEMER *et al.*, 1998). Por exemplo, Chandler *et al.* (2004) demonstraram aumentos na insulina e no GH durante a recuperação de uma única sessão de treinamento contra-resistência quando os indivíduos consumiram uma B(CHO-PRO) imediatamente antes e 2 h após o treino. No entanto, as concentrações de testosterona foram menores para essa combinação em relação a proposta isocalórica de CHO e PRO, não observando também efeito sobre o IGF-1. Segundo esses autores, as concentrações de testosterona diminuídas foram interpretados como sendo o resultado do aumento de *clearance* da testosterona.

Apesar de inconclusivo e sem diferenças estatísticas significativas, poderia ser especulado que a tendência diminuída de testosterona, refletindo numa pior razão T/C às 2 h e 4 h pós-ingestão para BALL, está vinculada ao *clearance* de testosterona ou ainda a um possível efeito secundário devido ao aumento da insulina. Assim, embora a simulação tenha aumentado a testosterona, parece que o consumo de alimentos aboliu este efeito como já observado previamente utilizando intervenção com uma B(CHO-PRO) durante as horas imediatamente após o exercício de resistência em comparação com o placebo (KRAEMER *et al.*, 1998). Para esses autores, assim como o acreditado para o presente estudo, não houve comprometimento do balanço anabólico por elevação da insulina ser clinicamente importante.

Cabe ressaltar, porém que a maioria dos jogos de futebol profissional acontecem no período da tarde ou à noite, enquanto que o protocolo de exercício do presente estudo foi realizado na parte da manhã, após uma noite de jejum. Isso pode ter tido alguma influência sobre o hormônio do estresse e respostas imunológicas, em particular, a resposta do cortisol, uma vez que as concentrações plasmáticas deste hormônio são marcadas por variação diurna, sendo mais alta no início da manhã e mais baixa à noite (FILAIRE *et al.*, 2001), especulando que caso venha ser oferecida

no período noturno, haverá modificação da relação T/C, e assim, BALL poderá colaborar com o balanço anabólico. O mesmo deve ser considerado para efeitos crônicos.

## **6.6. Respostas do estado de hidratação**

A desidratação que acompanha o exercício prolongado, especialmente em ambientes quentes, pode ter implicações para a saúde, aumentando o risco de lesões e doenças relacionadas ao calor (CONVERTINO *et al.*, 1996). Em circunstâncias extremas pode causar endotoxemia grave, levando a inflamação aguda, sepse, choque e falência de órgãos, o que pode ser fatal em situações extremas (LIM *et al.*, 2009; SHEPHARD *et al.*, 1998). No futebol, em função de limitações para hidratação, perda de fluidos pode ser excessiva sendo notadas reduções de 1,5-4% no peso corporal (BANGSBO, 1994; EDWARDS *et al.*, 2006; KRUSTRUP *et al.*, 2006; KRUSTRUP *et al.*, 2011; MOHR *et al.*, 2004); de 7-12% no plasma sanguíneo (EDWARDS *et al.*, 2006) e de 1-4 L de líquidos corporais (KRUSTRUP *et al.*, 2006; KRUSTRUP *et al.*, 2011). No presente estudo, apesar de ocorrer hidratação programada durante o SAFT90+, houve caracterização de desidratação para massa corporal (~-2,5%) que corrobora com os achados supracitados.

Medir a massa corporal antes e após o exercício permite estimar o grau de fluido a ser repostado, uma vez que a redução de massa corporal é devido principalmente à perda de fluido através da transpiração e a evaporação devida a respiração. Uma ingestão adequada de fluidos e minerais pós-exercício é então recomendada, porém intervenções mais específicas são difíceis devido ao atendimento simultâneo de um grupo grande de atletas como no futebol e controle dos inúmeros fatores que podem influenciar a estratégia pontual para reidratação como a massa corporal, a intensidade do exercício, as taxas individuais de suor e condições ambientais (PHILLIPS *et al.*, 2011). Além disso, a preferência de bebida pode representar um problema quando se considera a aplicação prática de uma bebida de reidratação em que a bebida é consumida voluntariamente. Nesse sentido, a BALL parece ser plausível de uso, afinal obteve boa aceitação e tolerância gastrointestinal como já previamente apontado no presente estudo.

Apesar dessa vantagem sensorial das duas bebidas de tratamento, o não comprometimento do hematócrito e alta taxa de retenção de fluidos até às 4 h pós-ingestão (~80%), houve comprometimento dos *status* de hidratação via gravidade específica da urina e do delta do volume plasmático, assim como o não restabelecimento da sensação de sede para valores pré-exercício até 4 h pós-ingestão.

Na condição hipotética para a formulação de BALL, considerou-se que tal formulação permitisse retenção mais eficaz de fluidos perdidos no exercício pela presença de proteínas nas bebidas de tratamento e seu efeito retentor hídrico. Isso está de acordo com evidências que apontam que as refeições mais calóricas tem maior potencial para reidratação, ao passo que retardam a taxa de esvaziamento gástrico, proporcionando melhoraria na capacidade de absorver e reter fluido a partir do intestino delgado (KWIATEK *et al.*, 2009). Além disso, o leite naturalmente tem altas concentrações de eletrólitos Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> o que ajuda na retenção de fluidos (JAMES, 2012; MARSHALL, 2004), e por ser um fluido altamente energético, a matriz do leite pode proporcionar um processo de esvaziamento mais lento do estômago, ocasionando absorção em taxas menores para a circulação (MAUGHAN *et al.*, 2004).

Do ponto de vista prático, esta absorção mais demorada atenua as grandes flutuações da osmolalidade do plasma que podem ocorrer com o consumo de grandes quantidades de água ou de BEC(CHO-E). Assim, por exemplo, posteriormente a ingestão de BEC(CHO-E), as grandes flutuações da pressão osmótica (osmolalidade plasmática diminuída) resultariam em taxas de depurações aumentadas nos rins, semelhantes aos observados por Shirreffs *et al.* (2007), o que resulta em um grande aumento da produção de urina.

Outra explicação para a hipótese da maior retenção de fluidos pode ser alcançado através da adição de PRO em BEC(CHO-E) (JAMES *et al.*, 2011; SEIFERT *et al.*, 2006). Os AA's são transportados transcelularmente por transporte ativo, transportadores de sódio dependentes e independentes, e por transporte passivo (STEVENS *et al.*, 1982). Assim tem sido bem estabelecido que a presença de PRO nessas bebidas aumentam a absorção de sódio e água no intestino (SCHEDL *et al.*, 1994; STEVENS *et al.*, 1982). O aumento do transporte intracelular de sódio e PRO

criam um maior gradiente osmótico para atrair e reter água. Sobre esse efeito, Schedl *et al.* (1994) relataram que os aminoácidos também atuam na permeabilidade celular aumentando a absorção de água por meio de transporte paracelular. Desta forma, a BALL parece ter a capacidade de reduzir temporariamente a produção de urina aumentando a osmolaridade de fluidos do corpo, que pode colaborar para um equilíbrio positivo de alguns eletrólitos após o exercício, sendo primordial para assegurar a integridade da função da célula e comunicação elétrica ao longo do corpo.

Variáveis de hidratação não tem sido incluídas nos estudos de bebidas achocolatadas colocando limitações comparativas para o presente estudo. No entanto, comparação por semelhança de matriz, principalmente de minerais, pode ser feita com estudos que utilizaram o leite bovino, demonstrando que o seu consumo pós-exercício é mais eficaz do que o consumo de água para reparar as perdas pelo suor após desidratação induzida pelo exercício (SHIRREFFS *et al.*, 2007), assim como eficaz para manter o equilíbrio de fluido positivo frente a BEC(CHO-E) durante a recuperação após desidratação induzida por exercício no calor (WATSON *et al.*, 2008).

A taxa de retenção de fluidos do presente estudo é superior ao observado no estudo de Desbrow *et al.* (2014) que objetivou comparar o potencial de re-hidratação de uma BEC(CHO-E), com uma variedade de bebidas a base de leite de soja e bovino após desidratação induzida pelo exercício. Após a conclusão dos ensaios, a percentagem de bebida retida foi maior para a um suplemento alimentar comercial para esportistas ( $65,1\% \pm 14,7\%$ ) em comparação ao leite de soja ( $46,9\% \pm 19,9\%$ ), leite bovino ( $40,0\% \pm 24,9\%$ ) e BEC(CHO-E) ( $16,6\% \pm 16,5\%$ ), sendo as medidas obtidas antes e durante cada hora até às 4 h após o consumo de bebidas. Desta forma, quando comparado em condições experimentais mais adequadas, a eficácia na reidratação de leite parece menos convincente (ISHIHARA *et al.*, 2013).

O que se observa nesses estudos, e que acaba dificultando as comparações, é que o potencial de reidratação das mais diversas bebidas demonstra uma relação dose-resposta para a densidade total de calorias, proteína e quantidade de sódio. Contudo, como muitos participantes geralmente relatam aumento da saciedade associado às bebidas com maior densidade calórica, o efeito do impacto da



palatabilidade e tolerância em volumes de consumo dentro de uma proposta *ad libitum* para a BALL, que é a realidade de um contexto esportivo, ainda deverão ser comprovados em novos estudos.

Apesar de uma considerável retenção hídrica, as intervenções com as bebidas de tratamento não promoveram o restabelecendo da massa corporal perdida, tendo ainda respostas pioradas progressivamente para a GEU das 2 h até às 4 h da recuperação, classificando a maioria dos indivíduos como desidratados para esse critério, segundo escores de Casa *et al.* (2000). Porém, esse resultados podem sinalizar para mudança de água dos compartimentos corporais, com concomitante concentração da urina, pois é considerado uma limitação da GEU o fato de que proporciona menos sensibilidade e uma resposta atrasada em relação a modificação da osmolaridade do plasma (SHIRREFFS, 2003). Outra limitação da GEU é que suas alterações são, muitas vezes, influenciadas por fatores não relacionados a desidratação como influência do tipo de alimentação (HARVEY *et al.*, 2008) que interfere na precisão de leituras de refratometria pelo tamanho de partículas grandes (proteínas, açúcares) (SHIRREFFS, 2000).

Apesar das limitações da GEU, fica evidente que há necessidade de incorporação de estratégias complementares a BALL para reidratação como, por exemplo, água ou BEC(CHO-E) convencional. Com essa abordagem pode-se evitar quadros de desidratação e amortizar sensação de sede, sendo esta relatada de forma importante no presente estudo após ingestão de ambas as bebidas acholadas de tratamento. A sensação de sede, que está subjacente ao comportamento de beber, indica a necessidade de hidratação e, portanto, é fundamental no controle da ingestão fluido e balanço hídrico, sendo um poderoso fator regulador a longo prazo (BURKE, 1997).

Portanto abordagens complementares a BALL devem ser implementadas para reidratação. Espera-se ainda que se fontes de CHO estiverem presentes, pode diminuir a resposta ao estresse via menor liberação de cortisol, que pode ter efeitos imunossupressores diretos (GLEESON, 2015; WALSH *et al.*, 2011), além de proporcionar balanço anabólico via razão T/C. Apesar de não ser escopo do presente trabalho, fica a orientação para ser criadas estratégias efetivas de pré-

hidratação para jogadores de futebol, principalmente para jovens que competem no calor, onde é comum começarem as partidas desidratados (DA SILVA *et al.*, 2012).

Do ponto de vista prático, tal abordagem da união de BALL com água ou BEC(CHO-E) convencional poderá aumentar a aderência dos atletas aos planos de reidratação propostos por amenizar desconforto gástrico e comprometer menos o sono, afinal há inúmeros deslocamentos ao banheiro em virtude de alta taxa de produção de urina quando a recomposição recomendada de 150% da massa corporal perdida é praticada com somente água ou BEC(CHO-E) (BURKE, 1997; SHIRREFFS *et al.*, 2006). Além disso, não haverá o consumo de grandes quantidades de fluido em um único bolus, o que permite maior retenção de fluidos por evitar grandes perdas de urina como já evidenciado (CONVERTINO *et al.*, 1996; SHIRREFFS *et al.*, 2006; SPACCAROTELLA *et al.*, 2011).

Na perspectiva de uso sequencial, o estudo de Papacosta *et al.* (2015) mostrou que o consumo de BAC durante 5 dias de treinamento intensivo no judô foi favorável à melhoria vários aspectos da recuperação do treinamento intensivo judo sem afetar a perda de peso intencional (PAPACOSTA *et al.*, 2015).

Outra forma de avaliar o potencial de reidratação da BALL seria a avaliação da osmolalidade plasmática ou da urina, assim como a coloração da urina, porém não foram medidos, sendo, então, uma limitação do presente estudo. Porém, dentro das possibilidades de monitoramento da hidratação, esperou-se que através da alteração na massa corporal, retenção hídrica e sensação de sede pudessem monitorar de maneira satisfatória o status de hidratação e reidratação dos voluntários da pesquisa.

Evidências tem apontado que durante um jogo de futebol, a modificação de massa corporal pode ser considerado um método eficaz de controle de desidratação devido à perda de suor, ao passo que hematócrito e osmolalidade podem ser menos sensíveis a níveis leves de desidratação em relação a marcadores urinários como GEU e coloração (HARVEY *et al.*, 2008), e ainda há pouca relação entre si (ARMSTRONG *et al.*, 1994). Espera-se que outros estudos possam considerar a indução de fadiga atendendo o escopo de protocolos típicos para desidratação padronizada (i.e -2% MCI) com condições mais controladas objetivando verificar o

potencial de reidratação da BALL. Futuros estudos poderão elucidar a osmolalidade da BALL e monitoramento da distribuição de eletrólitos no plasma e na urina.

### **6.7. Categorização legal da bebida**

Como discutido e observado até aqui, a BALL parece ser viável e poderá ser uma alternativa a BEC(CHO-E). Por ser formulada para satisfazer às necessidades de energia, carboidratos e proteínas, a BALL pode sanar problemas imediatos de ingestão de alimentos pós-exercícios. Esse atributo é importante para iniciar o processo de recuperação de atletas, já que reduções na disponibilidade de nutrientes e práticas alimentares pobres durante os períodos de treinamento mais intensos da temporada tem sido relacionados na etiologia da depressão imunológica induzida pelo exercício (SIMPSON *et al.*, 2015; WALSH *et al.*, 2011).

Segundo a RDC n.º 18/2010, “Alimentos para Atletas”, a BALL proposta poderia ser classificada como “suplemento para substituição parcial de refeições de atletas”. Essa designação direcionará a tramitação de apreciação e registro de patentes junto a Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica da UFMG (CTIT) e, mais a frente, se for o caso, tramitação de regulamentação de produtos alimentares junto a ANVISA. Como essa categoria visa atender alimentação em condições adversas ou inoportunas para refeição convencional, outras possibilidades de inovação e uso poderão direcionar linhas de pesquisas buscando o melhoramento funcional através da chamada inovação tecnológica incremental (TIDD *et al.*, 2015).

Por ser considerada fundamental no processo de recuperação pós-exercícios, a alimentação ou uso de suplementos para atletas tem impulsionado a indústria de alimentos ao desenvolvimento de uma variedade de novos produtos objetivando atividades funcionais no organismo (KORHONEN *et al.*, 2007; SHIBY *et al.*, 2013). Nesse compasso, nota-se que a indústria de suplementos alimentares cresce anualmente mais de 20-25% no Brasil (ABENUTRI, 2015). Assim, com o avançar de conhecimentos das Ciências do Esporte e da Nutrição Esportiva, muito estudos poderão ser feitos e novos produtos poderão ser lançados no mercado visando melhorar o rendimento e recuperação de atletas.

## 6.8. Limitações

A presente investigação examinou vários aspectos do processo de recuperação com o objetivo de identificar possíveis efeitos positivos da ingestão de BALL. Como há pontos positivos e negativos em qualquer escolha metodológica, os passos seguidos na presente proposta tentaram minimizar os efeitos inconclusivos, passando pela homogeneização da amostra, escolha de um protocolo válido de exercício que simulasse o futebol, e formas de controle experimental para a suplementação de leucina mais adequadas.

É sabedor que o exercício representa um estresse significativo ao organismo e a recuperação está associada ao retorno da homeostase dos processos celulares periféricos, metabolismo do SNC, regulação neuronal e hormonal (BANFI *et al.*, 2012). Da mesma forma, um jogo de futebol pode representar um bom exemplo de estresse fisiológico, o que demanda medidas paliativas ou um período de recuperação suficiente para que o atleta esteja pronto para novos estímulos de treinamentos ou jogos (COELHO *et al.*, 2015; MOHR *et al.*, 2015; THORPE *et al.*, 2015). Um dos reflexos da magnitude desse estresse pode ser determinado por respostas do sistema endócrino, sistema imunológico, ou danos musculares (microtraumas), que podem ser identificados pela mensuração de variáveis como citocinas, cortisol, testosterona e marcadores sanguíneos específicos (COELHO *et al.*, 2015; NÉDÉLEC *et al.*, 2012).

Desta forma, objetivando uma formulação particularizada para modular a recuperação da demanda metabólica e mecânica de uma partida de futebol, visando ainda controle experimental, a presente investigação se apoiou em em protocolo padronizado de indução de fadiga. Tal abordagem visou diminuir os problemas de investigações anteriores devido à grande variabilidade existente no jogo, o que pode tornar as inferências da intervenções ou medidas de desempenho difíceis de serem verificadas durante partida real pelas mesmas mostrarem baixa reprodutibilidade (GREGSON *et al.*, 2010).

Nesse sentido, o afastamento do viés sistemático na etapa experimental de testagem dos efeitos da BALL e BACH pode ser notada nas comparações entre as características dos voluntários na fase pré-exercício (idade, MCI, %GC, estatura,

distância percorrida no Yo-Yo Test IR2 e  $VO_{2max}$ , GEU) para entrada em protocolo de exercício (SAFT90+) e pós-exercício em indicadores de esforço (%FCM, escala de Borg), sendo os grupos homogêneos para iniciar o tratamento experimental no período de recuperação estabelecido (24 h). Desta forma, o presente protocolo usado parece ser adequado para um modelo de indução de fadiga, causando dano muscular, percepção de esforço e inflamação aguda de baixo grau típicas as que ocorrem em partidas oficiais.

O desenvolvimento de estudo com maior validade ecológica, tentando usar jogadores profissionais visando aplicações práticas diretas, também teriam limitações, pois é muito rara, devido ao acesso limitado e a natureza finita da população. Isso diminui a capacidade de interpretação dos dados, pois em uma situação da vida real, os jogadores não são normalmente mantidos em jejum antes de um jogo como ocorreu no presente estudo. Durante os jogos também recebem cargas nutricionais de energia durante o mesmo ou seu intervalo, e no presente grupo receberam apenas água. Da mesma forma, o período de recuperação de 24 h utilizados neste estudo não foi suficiente para que os participantes se recuperem totalmente. Um período de recuperação monitorado de 96 h ou mais poderá ser estudo para a observação dos efeitos de BALL visando recuperação completa.

Mesmo sendo observado homogeneidade entre os grupos experimentais antes e pós-exercício, os resultados ainda assim demonstraram uma considerável variabilidade para algumas respostas de indivíduos para linfócitos e CK, o que afeta as conclusões e inferências dos efeitos da BALL com importância real. Entre os marcadores utilizados, a CK sérica possui muita variabilidade intraindividual e pode sofrer drenagem linfática por ação manual, postural ou de atividades físicas de leve intensidade (FRIDÉN *et al.*, 2001). No entanto, por ser um marcador comumente utilizado no dia a dia dos clubes de futebol, a presente investigação considerou plausível a sua inclusão. Além disso, os valores observados pós-exercícios e durante a fase de recuperação corroboram os valores observados em estudos com atletas e jogadores profissionais (300-500 U/L; 650-850 U/L, respectivamente, imediatamente pós e 24 h) (BRANCACCIO *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2011).

Mesmo atendendo o mínimo do cálculo amostral proposto, um maior número de participantes em cada grupo, assim como triagem de adaptabilidade ao futebol,

poderia ter sido realizado para diminuir o efeito da variabilidade nos resultados pós-exercício para essas variáveis. Sabe-se que boa parte da susceptibilidade de alguns indivíduos a perturbações musculares pós-exercício pode ser resultado de vulnerabilidade genética (PIMENTA *et al.*, 2012; PRUNA *et al.*, 2013). No entanto, há de se reconhecer que triagem prévia dos voluntários por tipologia genética, por exemplo, seriam inviáveis, além de privar o estudo de recurtar voluntários com as características mais randômicas possíveis.

Outra estratégia para diminuir a variabilidade seria usar um desenho experimental cruzado, onde se permite que indivíduos se sirvam como seus próprios controles (THOMAS *et al.*, 2007). No entanto, a utilização de um desenho cruzado demanda que os voluntários realizassem as atividades experimentais várias vezes. Isso iria provocar perda de amostra, trazer riscos aos voluntários por causa dos prejuízos de mudança de perfil reológico e microbiológico que ocorre na vida de prateleira das bebidas de tratamento, por estas serem consideradas ainda protótipos e, então, não esteréis comercialmente. Realizar batelada produtiva da BALL para cada dia experimental se tornou inviável por utilização compartilhada de laboratórios, além de despesas adicionais para análises microbiológicas.

Além disso, metodologicamente não se sabe até que ponto os resultados em estudos cruzados são por causa de um efeito de tratamento ou por consequência do efeito repetido e acumulado de tratamentos (BORDENS *et al.*, 2005). Além disso, um delineamento com essa abordagem não garantiria que o consumo de energia extra-experimento e indução de fadiga teriam sido os mesmos entre as condições e, conseqüentemente, o efeito da BALL não seria confiável.

Uma limitação do presente estudo foi a ausência de um grupo placebo ou controle com bebida achocolatada comercial ou esportiva convencional. Como já apontado, divergências de calorias e volume de ingestão colocaria condições não ideais para verificação do efeito da formulação com suplementação de L-leucina. Outros estudos no futuro poderão elucidar os efeitos de BALL frente as práticas nutricionais habituais de jogadores de futebol e outros esportes.

Novas pesquisas também deverão determinar a melhor combinação de leucina e de outros aminoácidos, a fim de evitar o desequilíbrio de aminoácidos que a leucina

pode causar por estimular a oxidação e a especulada "resistência anabólica" (NICASTRO *et al.*, 2011). Assim, mais estudos carecem para elucidar quantidades de leucina que é limitrofe para tal efeito oxidativo, e quantidades requeridas de isoleucina e valina na dieta para compensação. Monitoramento de aminograma pós-ingestão também poderá levantar medidas da taxa de absorção da BALL, permitindo projetar melhorias tecnológicas de produção voltadas a biodisponibilidade.

Estudo com efeitos crônicos deverão ser orientados para verificação dos efeitos de BALL em contextos mais realísticos do futebol. Apesar da maioria dos estudos delimitarem para a análise de um jogo (GUNNARSSON *et al.*, 2013; KRUSTRUP *et al.*, 2011), porém na realidade prática, a participação ocorre de forma sequencial, onde o processo recuperativo e desempenho é sempre afetado pelo jogo anterior. Adicionalmente, a adaptação do sistema imune deve ser observada durante toda a temporada, com vistas a monitorar uma possível imunossupressão.

Propostas de estudos de longo prazo também permitirão o estabelecimento de aderência ao uso de BALL, assim como seu impacto no balanço nutricional. O uso de BALL poderá sanar déficit de energia diário, algo constatado em jovens jogadores ingleses durante período competitivo (RUSSELL *et al.*, 2011). No entanto, atenção especial para consumo crônico deve ser dado, uma vez que leucina tem sido considerada um secretagogo de insulina, o seu uso em condições tais como diabetes e tratamento com glucocorticóides deverá ser examinado com cuidado (NICASTRO *et al.*, 2011).

Como dica de estudos, considera-se ainda que uma especulação levantada pelo presente trabalho na efetividade da BALL na recuperação de atletas, foi seu efeito antioxidante advindo do conteúdo fenólico presente no cacau. Apesar de nenhuma análise de estresse oxidativo ter sido feita, e as bebidas de tratamento serem idênticas em relação ao conteúdo de cacau, estudo recente que analisou os efeitos da ingestão regular de chocolate amargo antes de protocolo indutor de fadiga de ciclismo relataram redução de marcadores de estresse oxidativo, mas nenhum efeito sobre as respostas endócrinas-imunes ao exercício (ALLGROVE *et al.*, 2011). Assim, o tipo e dose do polifenóis poderá ser importante e poderão ser considerados em novos delineamentos de formulações e estudos com BALL. Da mesma forma,

ampliação do período de recuperação de para 72 – 96 h poderá ser mais adequado para a observação de recuperação.

As generalizações dos resultados também se fazem com limitações. Por exemplo, o público feminino deverá ser alvo de futuros estudos. Afinal as mulheres podem responder diferentemente ao jogo de futebol (ANDERSSON *et al.*, 2010; BRADLEY *et al.*, 2014), e devido à suas diferenças hormonais, podem ter diferentes respostas inflamatórias sob efeito do exercício físico em comparação com os homens (FERRER *et al.*, 2009; GRAVINA *et al.*, 2011) que modularam diferentes taxas de recuperação. Futuros estudos poderão focar esse público alvo.

Embora o colágeno tenha uma baixa PDCAAS, que contém uma elevada proporção de aminoácidos não-essenciais, há interesse da indústria de alimentos na incorporação de colágeno para obtenção de vantagens tecnológicas (LIU *et al.*, 2015). Como observado, a bebida BACH também atende os mesmos critérios de macro nutrientes da BALL. Desta forma, linhas de pesquisas também poderão considerar a incorporação de colágeno em bebidas achocolatadas. Várias pesquisas (HAJOSCH *et al.*, 2010; OESSER *et al.*, 1999) têm mostrado a importância do colágeno e seus derivados na manutenção e reconstituição da pele, dos ossos, dos tecidos cartilagosos e da matriz extracelular. Apesar de relação metabólica indireta com anabolismo celular esquelético, outros estudos têm demonstrado que suplementos concentrados de proteína hidrolisada de colágeno foram capazes de manter o balanço de nitrogênio e preservou a massa corporal magra durante 15 dias de consumo de dieta hipoproteica (HAYS *et al.*, 2009).

Do ponto de vista do processamento da BALL, há ainda necessidade da melhoria da mensuração microbiológica com vistas ao uso comercial. Segundo critério ICMSF (ICMSF, 2002), as amostras de BALL formuladas foram indicadas para consumo humano sendo classificadas como pertencentes as categorias: i) sem risco direto à saúde: que inclui microrganismos que causam apenas alterações nos alimentos (i.e: presença dentro dos limites toleráveis para bactérias aeróbias mesófilas segundo Instrução Normativa n.º 16/2005) e ii) risco indireto à saúde do consumidor: presença de microrganismos indicadores (i.e presença de coliformes totais acima do limite da Instrução Normativa n.º 16/2005 quanto aos parâmetros para bebida láctea pasteurizada e da Resolução RDC n.º 12/2001 para Sobremesas lácteas



pasteurizadas refrigeradas, com ou sem adições). Para esse mesmo parâmetro, a BALL formulada esteve dentro dos limites toleráveis para a Resolução RDC n.º 12/2001, Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos (chocolates e produtos similares, em pó, granulado ou flocados e outros produtos de cacau e similares).

Apesar do avanço em relação aos primeiros ensaios de fabricação, no que diz respeito ao processo de sanitização e manipulação, com os resultados observados para coliformes totais, sugere-se (i) controle de qualidade dos ingredientes utilizados; (ii) revisão no processo de fabricação das BALL do presente estudo e que se faça cumprir as “boas práticas de fabricação” (BPF). Nesse sentido, a validade está condicionada a estabilidade da bebida, devendo-se testes de “vida de prateleira” para estabelecer o prazo de validade.

Vale ressaltar que as operações na Plataforma Inovaleite da UFV são classificadas como de operações unitárias, que amplia a chance de contaminação e recontaminação por ser de circuito aberto. Nessa proposta de produção, que facilita o entendimento de cada operação/equipamento na abordagem didática na proposta ensino-aprendizagem na UFV, mas por outro lado, infelizmente, dificulta a obtenção de produtos estereis. Cabe salientar que tratamento térmico mais severo poderia sanear o problema de presença de microbiota, porém, segundo a proposta binômio tempo-temperatura adotada (74 °C, 2 min), a intenção seria sustentar a biodisponibilidade da suplementação com L-leucina. Sugere-se estudo e viabilidade tecnológica para incorporação da suplementação, como hidratação prévia, fórmula líquida, ou mistura em tanques industriais com circuito fechado afim de garantir biodisponibilidade e homogeneidade do produto para proposta de vida de prateleira.

Consideramos que a BALL utilizada pelo presente estudo cumpre os primeiros estágios de aprimoramento ou desenvolvimento de novos produtos. Reconhece-se que houve a definição do produto com objetivos específicos, necessitando agora de elaboração dos protótipos e os testes industriais, para determinar os parâmetros de processo, da formulação e das especificações finais. Há necessidade também de determinar a composição química e o estudo da vida de prateleira, que são importantes para caracterizar o produto final.

Ainda de interesse para a Engenharia de Alimentos e cadeia produtiva, há necessidade de estudos aprofundados de análise sensorial da BALL. Nos últimos anos, a análise sensorial deixou de ser uma atividade secundária e empírica e enquadrou-se na categoria de disciplina científica, capaz de gerar informações precisas e reproduzíveis (DUTCOSKY, 2013). Sobre estas informações recaem importantes decisões como seleção da matéria-prima, padronização de métodos e otimização de formulações, para desenvolvimento de produtos, tornando-se assim uma ferramenta básica para aplicação na indústria de alimentos.

Apesar de tudo, de todo esforço no sentido de oferecer intervenções nutricionais baseadas em evidências, como o caso da BALL, é necessário lembrar que há uma gama de dietas e regimes de exercícios que irão apoiar a excelente condição física e desempenho de atletas. É compreensível que ainda não exista um tratamento único de dieta ou adaptação ao exercício que pode ser o denominador comum, ou a uma fórmula universal para rendimento ou para a saúde, ou mesmo uma panacéia para todos as vertentes de desempenho e recuperação de atletas.

## 7 CONCLUSÃO

A intervenção nutricional pós-exercício com BALL apresentou alto escore de aceitação sensorial afetiva, não provocou comprometimento da sensação de conforto gastrointestinal e proporcionou alta taxa de retenção de fluidos. A suplementação de L-leucina na matriz de bebida achocolatada promoveu aumento sinérgico significativo no nível de insulina após 2 h de ingestão e amortizou respostas de CK durante a recuperação, com menor valor às 24 h pós-ingestão.

Ambas as intervenções nutricionais não se diferenciaram significativamente na percepção de dor muscular, testosterona, cortisol, razão T/C, nos marcadores gerais de imunidade, mioglobina e massa corporal e nas escalas de recuperação percebida e dor muscular.

Houve comprometimento dos *status* de hidratação via gravidade específica da urina e do delta do volume plásmatico, assim como o não restabelecimento da sensação de sede para valores pré-exercício até 4 h pós-ingestão. Isso sugere que estratégias complementares de reidratação deverão ser implementadas para uso em conjunto com a BALL.

Elaboração de novos protótipos e testes de processo, para definir os parâmetros de tecnologia e da formulação, as especificações de composições químicas finais e vida de prateleira. Estudos de análise sensorial poderão contribuir para a viabilidade de processamento em escala industrial, transferência de tecnologia para a indústria produtiva e comercialização da BALL.

Assim, por contemplar os principais critérios energéticos e de macronutrientes e uma suplementação importante com aminoácido regulador do metabolismo muscular, a BALL pode ser uma alternativa alimentar potencial para intervenção imediata pós-exercícios em futebolistas, constituindo-se em suplemento para substituição parcial de refeições para atletas, segundo a RDC n.º 18/2010.

## REFERÊNCIAS

ABENUTRI. Associação Brasileira de Empresas de Produtos Nutricionais. **Abenutri**: 12 anos marcados por conquistas para o mercado brasileiro. Disponível em: <http://www.abenutri.org/>. Acesso em: 14 jun. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12994**: Métodos de análise sensorial de alimentos e bebidas: terminologia. Rio de Janeiro, 1993.

\_\_\_\_\_. **NBR 14141**: Escalas utilizadas em análise sensorial. Rio de Janeiro, 1998.

AKENHEAD, R.; HAYES, P.R.; THOMPSON, K.G. *et al.* Diminutions of acceleration and deceleration output during professional football match play. **J Sci Med Sport.**, v. 16, n. 6, p. 556-61, 2013.

AL-NAKHLI, H.H.; PETROFSKY, J.S.; LAYMON, M.S. *et al.* The use of thermal infrared imaging to detect delayed onset muscle soreness. **J Vis Exp.**, v. 22, n. 59, p. pii: 3551, 2012.

ALLEN, D.G.; LAMB, G.D.; WESTERBLAD, H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. **Physiol Rev.**, v. 88, n. 1, p. 287-332, 2008.

ALLGROVE, J.; FARRELL, E.; GLEESON, M. *et al.* Regular dark chocolate consumption's reduction of oxidative stress and increase of free-fatty-acid mobilization in response to prolonged cycling. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, v. 21, n. 2, p. 113-23, 2011.

ALMEIDA, R.C.; GANDOLFI, L.; DE NAZARÉ KLAUTAU-GUIMARÃES, M. *et al.* Does celiac disease occur in afro-derived brazilian populations? **Am J Hum Biol.**, v. 24, n. 5, p. 710-2, 2012.

ANANIAS, G.E.O.; KOKUBUN, E.; MOLINA, R. *et al.* Capacidade funcional, desempenho e solicitação metabólica em futebolistas profissionais durante situação real de jogo monitorados por análise cinematográfica. **Rev Bras Med Esporte**, v. 4, n. 3, p. 87-95, 1998.

ANDERSSON, H.; BØHN, S.K.; RAASTAD, T. *et al.* Differences in the inflammatory plasma cytokine response following two elite female soccer games separated by a 72-h recovery. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 20, n. 5, p. 740-7, 2010.

ANDERSSON, H.; RAASTAD, T.; NILSSON, J. *et al.* Neuromuscular fatigue and recovery in elite female soccer: effects of active recovery. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 40, n. 2, p. 372-80, 2008.

ANDERSSON, H.A.; RANDERS, M.B.; HEINER-MØLLER, A. *et al.* Elite female soccer players perform more high-intensity running when playing in international games compared with domestic league games. **J Strength Cond Res.**, v. 24, n. 4, p. 912-9, 2010.

ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBALL, S.R. *et al.* Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **J Nutr.**, v. 131, n. 3, p. 856S-860S, 2001.

\_\_\_\_\_.; REITER, A.K.; ANTHONY, T.G. *et al.* Orally administered leucine enhances protein synthesis in skeletal muscle of diabetic rats in the absence of increases in 4e-bp1 or s6k1 phosphorylation. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 928-36, 2002.

\_\_\_\_\_.; YOSHIZAWA, F.; ANTHONY, T.G. *et al.* Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. **J Nutr.**, v. 130, n. 10, p. 2413-9, 2000.

AOI, W.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Role of oxidative stress in impaired insulin signaling associated with exercise-induced muscle damage. **Free Radic Biol Med.**, v. 65, p. 1265-72, 2013.

ARETA, J.L.; BURKE, L.M.; ROSS, M.L. *et al.* Timing and distribution of protein ingestion during prolonged recovery from resistance exercise alters myofibrillar protein synthesis. **J Physiol.**, v. 591, n. Pt 9, p. 2319-31, 2013.

ARMSTRONG, L.E.; MARESH, C.M.; CASTELLANI, J.W. *et al.* Urinary indices of hydration status. **Int J Sport Nutr.**, v. 4, n. 3, p. 265-79, 1994.

ARMSTRONG, R.B.; WARREN, G.L.; WARREN, J.A. Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. **Sports Med.**, v. 12, n. 3, p. 184-207, 1991.

AROLA, H.; TAMM, A. Metabolism of lactose in the human body. **Scand J Gastroenterol Suppl.**, v. 202, p. 21-5, 1994.

ARRUDA, A.F.S.; CARLING, C.; ZANETTI, V. *et al.* Effects of a very congested match schedule on body-load impacts, accelerations, and running measures in youth soccer players. **Int J Sports Physiol Perform.**, v. 10, n. 2, p. 248-52, 2015.

ASCENSAO, A.; LEITE, M.; REBELO, A.N. *et al.* Effects of cold water immersion on the recovery of physical performance and muscle damage following a one-off soccer match. **J Sports Sci.**, v. 29, n. 3, p. 217-25, 2011.

\_\_\_\_\_.; REBELO, A.; OLIVEIRA, E. *et al.* Biochemical impact of a soccer match - analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. **Clin Biochem.**, v. 41, n. 10-11, p. 841-51, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) **Official methods of analysis.** 16 ed. Washington, DC: 1990.

AVLONITI, A.A.; DOUDA, H.T.; TOKMAKIDIS, S.P. *et al.* Acute effects of soccer training on white blood cell count in elite female players. **Int J Sports Physio Perform.**, v. 2, n. , p. 239-49, 2007.

BANFI, G.; COLOMBINI, A.; LOMBARDI, G. *et al.* Metabolic markers in sports medicine. **Adv Clin Chem.**, v. 56, p. 1-54, 2012.

BANFI, G.; DOLCI, A. Free testosterone/cortisol ratio in soccer: usefulness of a categorization of values. **J Sports Med Phys Fitness.**, v. 46, n. 4, p. 611-6, 2006.

BANGSBO, J. The physiology of soccer: with special reference to intense intermittent exercise. **Acta Physiol Scand.**, v. 151, n. Suppl 619, p. 1-155, 1994.

\_\_\_\_\_. Energy demands in competitive soccer. **J Sports Sci.**, v. 12 Spec No, p. S5-12, 1994.

\_\_\_\_\_.; GOLLNICK, P.D.; GRAHAM, T.E. *et al.* Substrates for muscle glycogen synthesis in recovery from intense exercise in man. **J Physiol.**, v. 434, p. 423-40, 1991.

\_\_\_\_\_.; IAIA, F.M.; KRUSTRUP, P. The yo-yo intermittent recovery test: a useful tool for evaluation of physical performance in intermittent sports. **Sports Med.**, v. 38, n. 1, p. 37-51, 2008.

\_\_\_\_\_.; MADSEN, K.; KIENS, B. *et al.* Muscle glycogen synthesis in recovery from intense exercise in humans. **Am J Physiol.**, v. 273, n. 2 Pt 1, p. E416-24, 1997.

\_\_\_\_\_.; NØRREGAARD, L.; THORSØ, F. Activity profile of competition soccer. **Can J Sport Sci.**, v. 16, n. 2, p. 110-6, 1991.

\_\_\_\_\_.; NØRREGAARD, L.; THORSØ, F. The effect of carbohydrate diet on intermittent exercise performance. **Int J Sports Med.**, v. 13, n. 2, p. 152-7, 1992.

BARBOSA, A.W.C.; BENEVIDES, G.P.; ALFERES, L.M.T. *et al.* A leucine-rich diet and exercise affect the biomechanical characteristics of the digital flexor tendon in rats after nutritional recovery. **Amino Acids.**, v. 42, n. 1, p. 329-36, 2012.

BARROS, R.M.L.; MISUTA, M.S.; MENEZES, R.P. *et al.* Analysis of the distances covered by first division brazilian soccer players obtained with an automatic tracking method. **J Sports Sci Med.**, v. 6, n. 2, p. 233-42, 2007.

BATISTA, M.A.; GAMA, L.L.A.; ALMEIDA, L.P.D. *et al.* Desenvolvimento, caracterização e análise sensorial de formulações alimentares com proteínas do soro de leite ou albumina para crianças. **Brazilian Journal of Food Technology.**, v. 18, n. , p. 31-41, 2015.

BEELEN, M.; BURKE, L.M.; GIBALA, M.J. *et al.* Nutritional strategies to promote postexercise recovery. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, v. 20, n. 6, p. 515-32, 2010.

BENTO, R.S.; SCAPIM, M.R.D.S.; AMBRÓSIO-UGRI, M.C.B. Desenvolvimento e caracterização de bebida achocolatada à base de extrato hidrossolúvel de quinoa e de arroz. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v. 71, n. 2, p. 317-23, 2012.

BERARDI, J.M.; PRICE, T.B.; NOREEN, E.E. *et al.* Postexercise muscle glycogen recovery enhanced with a carbohydrate-protein supplement. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 38, n. 6, p. 1106-13, 2006.

BETTS, J.; WILLIAMS, C.; DUFFY, K. *et al.* The influence of carbohydrate and protein ingestion during recovery from prolonged exercise on subsequent endurance performance. **J Sports Sci.**, v. 25, n. 13, p. 1449-60, 2007.

BETTS, J.A.; WILLIAMS, C. Short-term recovery from prolonged exercise: exploring the potential for protein ingestion to accentuate the benefits of carbohydrate supplements. **Sports Med.**, v. 40, n. 11, p. 941-59, 2010.

BIRD, P.; FLANNERY, J.; CROWLEY, E. *et al.* Evaluation of the 3m™ petrifilm™ salmonella express system for the detection of salmonella species in selected foods: collaborative study. **J AOAC Int.**, v. 97, n. 6, p. 1563-75, 2014.

BISHOP, N.C.; BLANNIN, A.K.; ROBSON, P.J. *et al.* The effects of carbohydrate supplementation on immune responses to a soccer-specific exercise protocol. **J Sports Sci.**, v. 17, n. 10, p. 787-96, 1999.

\_\_\_\_\_; GLEESON, M.; NICHOLAS, C.W. *et al.* Influence of carbohydrate supplementation on plasma cytokine and neutrophil degranulation responses to high intensity intermittent exercise. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, v. 12, n. 2, p. 145-56, 2002.

\_\_\_\_\_; GLEESON, M. Acute and chronic effects of exercise on markers of mucosal immunity. **Front Biosci.**, v. 14, n. , p. 4444-56, 2009.

BLOOMFIELD, J.; POLMAN, R.; O'DONOGHUE, P. Physical demands of different positions in FA premier league soccer. **J Sports Sci Med.**, v. 6, n. 1, p. 63-70, 2007.

BLOUET, C.; JO, Y.; LI, X. *et al.* Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit. **J Neurosci.**, v. 29, n. 26, p. 8302-11, 2009.

BOHÉ, J.; LOW, A.; WOLFE, R.R. *et al.* Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose-response study. **J Physiol.**, v. 552, n. Pt 1, p. 315-24, 2003.

BORDENS, K. *et al.* **Research and design methods: a process approach.** 8 ed.: McGraw-Hill, 2005.

BORG, G. Psychological bases of perceived exertion. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 14, n. 5, p. 377-81, 1982.

BORGENVIK, M.; APRÓ, W.; BLOMSTRAND, E. Intake of branched-chain amino acids influences the levels of mafb mRNA and murf-1 total protein in resting and exercising human muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 302, n. 5, p. E510-21, 2012.

BOS, C.; METGES, C.C.; GAUDICHON, C. *et al.* Postprandial kinetics of dietary amino acids are the main determinant of their metabolism after soy or milk protein ingestion in humans. **J Nutr.**, v. 133, n. 5, p. 1308-15, 2003.

BOUNOUS, G.; BATIST, G.; GOLD, P. Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. **Clin Invest Med.**, v. 12, n. 3, p. 154-61, 1989.

\_\_\_\_\_.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clin Invest Med.**, v. 14, n. 4, p. 296-309, 1991.

BOYAS, S.; GUÉVEL, A. Neuromuscular fatigue in healthy muscle: underlying factors and adaptation mechanisms. **Ann Phys Rehabil Med.**, v. 54, n. 2, p. 88-108, 2011.

BRADLEY, P.S.; DELLAL, A.; MOHR, M. *et al.* Gender differences in match performance characteristics of soccer players competing in the uefa champions league. **Hum Mov Sci.**, v. 33, p. 159-71, 2014.

\_\_\_\_\_.; SHELDON, W.; WOOSTER, B. *et al.* High-intensity running in English FA premier league soccer matches. **J Sports Sci.**, v. 27, n. 2, p. 159-68, 2009.

BRANCACCIO, P.; LIMONGELLI, F.M.; MAFFULLI, N. Monitoring of serum enzymes in sport. **Br J Sports Med.**, v. 40, n. 2, p. 96-7, 2006.

\_\_\_\_\_.; MAFFULLI, N.; LIMONGELLI, F.M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **Br Med Bull.**, v. 81-82, n. 1, p. 209-30, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N.º 16**, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 24 Aug. 2005.

BRASIL **Higiene dos alimentos** – textos básicos. Ed.Brasilia: Organização Pan-Americana de Saúde, 2006.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria n.º 368**, de 4 de setembro de 1997. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 08 Sep. 1997.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n.º. 12**, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Jan. 2001.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n.º.16**, de 23 de agosto de 2005. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 24 Aug. 2005.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.º 18**, de 27 de abril de 2010. Regulamento técnico sobre alimentos para atletas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 28 Abril. 2010.



BRENNER, I.; SHEK, P.N.; ZAMECNIK, J. *et al.* Stress hormones and the immunological responses to heat and exercise. **Int J Sports Med.**, v. 19, n. 2, p. 130-43, 1998.

BROWN, L.J.S.; MIDGLEY, A.W.; VINCE, R.V. *et al.* High versus low glycemic index 3-h recovery diets following glycogen-depleting exercise has no effect on subsequent 5-km cycling time trial performance. **J Sci Med Sport.**, v. 16, n. 5, p. 450-4, 2013.

BRÄNSTRÖM, R.; EFENDIĆ, S.; BERGGREN, P.O. *et al.* Direct inhibition of the pancreatic beta-cell atp-regulated potassium channel by alpha-ketoisocaproate. **J Biol Chem.**, v. 273, n. 23, p. 14113-8, 1998.

BURD, N.A.; YANG, Y.; MOORE, D.R. *et al.* Greater stimulation of myofibrillar protein synthesis with ingestion of whey protein isolate v. micellar casein at rest and after resistance exercise in elderly men. **Br J Nutr.**, v. 108, n. 6, p. 958-62, 2012.

BURKE, L.M. Nutrition for post-exercise recovery. **Aust J Sci Med Sport.**, v. 29, n. 1, p. 3-10, 1997.

\_\_\_\_\_.; CASTELL, L.M.; STEAR, S.J. Bjsm reviews: a-z of supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance part 1. **Br J Sports Med.**, v. 43, n. 10, p. 728-9, 2009.

BURKE, L.M.; HAWLEY, J.A.; ROSS, M.L. *et al.* Preexercise aminoacidemia and muscle protein synthesis after resistance exercise. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 44, n. 10, p. 1968-77, 2012.

\_\_\_\_\_.; KIENS, B.; IVY, J. L. Carbohydrates and fat for training and recovery. **J Sports Sci.**, v. 22, n. 1, p. 15-30, 2004.

\_\_\_\_\_.; LOUCKS, A.B.; BROAD, N. Energy and carbohydrate for training and recovery. **J Sports Sci.**, v. 24, n. 7, p. 675-85, 2006.

\_\_\_\_\_.; MUJIK, I. Nutrition for recovery in aquatic sports. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, v. 24, n. 4, p. 425-36, 2014.

\_\_\_\_\_.; WINTER, J.A.; CAMERON-SMITH, D. *et al.* Effect of intake of different dietary protein sources on plasma amino acid profiles at rest and after exercise. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, v. 22, n. 6, p. 452-62, 2012.

BURY, T.; MARECHAL, R.; MAHIEU, P. *et al.* Immunological status of competitive football players during the training season. **Int J Sports Med.**, v. 19, n. 5, p. 364-8, 1998.

CAPRANICA, L.; TESSITORE, A.; GUIDETTI, L. *et al.* Heart rate and match analysis in pre-pubescent soccer players. **J Sports Sci.**, v. 19, n. 6, p. 379-84, 2001.

CARLING, C.; LE GALL, F.; DUPONT, G. Are physical performance and injury risk in a professional soccer team in match-play affected over a prolonged period of fixture congestion? **Int J Sports Med.**, v. 33, n. 1, p. 36-42, 2012.

CARLING, C.; LE GALL, F.; DUPONT, G. Analysis of repeated high-intensity running performance in professional soccer. **J Sports Sci.**, v. 30, n. 4, p. 325-36, 2012.

CASA, D.J.; ARMSTRONG, L.E.; HILLMAN, S.K. *et al.* National athletic trainers' association position statement: fluid replacement for athletes. **J Athl Train.**, v. 35, n. 2, p. 212-24, 2000.

CHANDLER, R.M.; BYRNE, H.K.; PATTERSON, J.G. *et al.* Dietary supplements affect the anabolic hormones after weight-training exercise. **J Appl Physiol (1985).**, v. 76, n. 2, p. 839-45, 1994.

CHAUDHURI, A. Lactose intolerance and neuromuscular symptoms. **Lancet.**, v. 356, n. 9228, p. 510-1, 2000.

CHENG, Q.; DIEZ BELTRAN, V.; CHAN, S.M. *et al.* System-I amino acid transporters play a key role in pancreatic  $\beta$ -cell signalling and function. **J Mol Endocrinol.**, v. , n. , p. , 2015.

CHEUNG, K.; HUME, P.; MAXWELL, L. Delayed onset muscle soreness: treatment strategies and performance factors. **Sports Med.**, v. 33, n. 2, p. 145-64, 2003.

CHICHARRO, J.L.; LUCÍA, A.; PÉREZ, M. *et al.* Saliva composition and exercise. **Sports Med.**, v. 26, n. 1, p. 17-27, 1998.

CHISHOLM, D.M.; COLLIS, M.; KUKAK, L. *et al.* Physical activity readiness. **British Columbia Medical Journal.**, v. 17, n. 11, p. 375-8, 1975.

CHOI, S.; DISILVIO, B.; FERNSTROM, M.H. *et al.* Oral branched-chain amino acid supplements that reduce brain serotonin during exercise in rats also lower brain catecholamines. **Amino Acids.**, v. , n. , p. , 2013.

CHRYSSANTHOPOULOS, C.; WILLIAMS, C.; NOWITZ, A. *et al.* Skeletal muscle glycogen concentration and metabolic responses following a high glycaemic carbohydrate breakfast. **J Sports Sci.**, v. 22, n. 11-12, p. 1065-71, 2004.

CHURCHWARD-VENNE, T.A.; BREEN, L.; DI DONATO, D.M. *et al.* Leucine supplementation of a low-protein mixed macronutrient beverage enhances myofibrillar protein synthesis in young men: a double-blind, randomized trial. **Am J Clin Nutr.**, v. 99, n. 2, p. 276-86, 2014.

\_\_\_\_\_.; BURD, N.A.; MITCHELL, C.J. *et al.* Supplementation of a suboptimal protein dose with leucine or essential amino acids: effects on myofibrillar protein synthesis at rest and following resistance exercise in men. **J Physiol.**, v. 590, n. Pt 11, p. 2751-65, 2012.

CLARK, K. Nutritional guidance to soccer players for training and competition. **J Sports Sci.**, v. 12 Spec No, p. S43-50, 1994.

COCKBURN, E.; BELL, P.G.; STEVENSON, E. Effect of milk on team sport performance after exercise-induced muscle damage. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 45, n. 8, p. 1585-92, 2013.

COCKBURN, E.; HAYES, P.R.; FRENCH, D.N. *et al.* Acute milk-based protein-cho supplementation attenuates exercise-induced muscle damage. **Appl Physiol Nutr Metab.**, v. 33, n. 4, p. 775-83, 2008.

\_\_\_\_\_.; ROBSON-ANSLEY, P.; HAYES, P.R. *et al.* Effect of volume of milk consumed on the attenuation of exercise-induced muscle damage. **Eur J Appl Physiol.**, v. 112, n. 9, p. 3187-94, 2012.

\_\_\_\_\_.; STEVENSON, E.; HAYES, P.R. *et al.* Effect of milk-based carbohydrate-protein supplement timing on the attenuation of exercise-induced muscle damage. **Appl Physiol Nutr Metab.**, v. 35, n. 3, p. 270-7, 2010.

COELHO, D.B.; COELHO, L.G.; MORTIMER, L.A. *et al.* Energy expenditure during official soccer matches. **Braz Jour Biomotr.**, v. 4, n. 4, p. 246-55, 2010.

\_\_\_\_\_.; MORANDI, R.F.; MELO, M.A.A. *et al.* Cinética da creatina quinase em jogadores de futebol profissional em uma temporada competitiva. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum.**, v. 13, n. 3, p. 189-94, 2011.

\_\_\_\_\_.; PIMENTA, E.M.; DA PAIXÃO, R.C. *et al.* Analysis of chronic physiological demand of an annual soccer season. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum.**, v. 4, n. 4, p. 400-8, 2015.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences.** 2nd ed. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, 1988.

COLOMBINI, A.; MACHADO, M.; LOMBARDI, G. *et al.* Modifications of biochemical parameters related to protein metabolism and renal function in male soccer players after a match. **J Sports Med Phys Fitness.**, v. 54, n. 5, p. 658-64, 2014.

CONVERTINO, V.A.; ARMSTRONG, L.E.; COYLE, E.F. *et al.* American college of sports medicine position stand. exercise and fluid replacement. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 28, n. 1, p. i-vii, 1996.

CORMACK, S.J.; NEWTON, R.U.; MCGUIGAN, M.R. Neuromuscular and endocrine responses of elite players to an australian rules football match. **Int J Sports Physiol Perform.**, v. 3, n. 3, p. 359-74, 2008.

COSTA, R.J.; WALTERS, R.; BILZON J, L.J. *et al.* Effects of immediate postexercise carbohydrate ingestion with and without protein on neutrophil degranulation. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, v. 21, n. 3, p. 205-13, 2011.

COSTE, O.; VAN BEERS, P.; TOUITOU, Y. Hypoxia-induced changes in recovery sleep, core body temperature, urinary 6-sulphatoxymelatonin and free cortisol after a simulated long-duration flight. **J Sleep Res.**, v. 18, n. 4, p. 454-65, 2009.

CROZIER, S.J.; KIMBALL, S.R.; EMMERT, S.W. *et al.* Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. **J Nutr.**, v. 135, n. 3, p. 376-82, 2005.

CURRELL, K.; JEUKENDRUP, A. E. Validity, reliability and sensitivity of measures of sporting performance. **Sports Med.**, v. 38, n. 4, p. 297-316, 2008.

DA SILVA, R.P.; MÜNDEL, T.; NATALI, A.J. *et al.* Pre-game hydration status, sweat loss, and fluid intake in elite brazilian young male soccer players during competition. **J Sports Sci.**, v. 30, n. 1, p. 37-42, 2012.

DA LUZ, C.R.; NICASTRO, H.; ZANCHI, N.E. *et al.* Potential therapeutic effects of branched-chain amino acids supplementation on resistance exercise-based muscle damage in humans. **J Int Soc Sports Nutr.**, v. 8, n. , p. 23, 2011.

DANGIN, M.; BOIRIE, Y.; GARCIA-RODENAS, C. *et al.* The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 280, n. 2, p. E340-8, 2001.

DE MARCHI, R.; MONTEIRO, M.; CARDELLO, H.M.A.B. Avaliação da vida-de-prateleira de um isotônico natural de maracujá (*passiflora edulis sims. f. flavicarpa deg.*). **Braz J Food Technol.**, v. 6, n. 2, p. 291-300, 2003.

DELLAL, A.; CHAMARI, C.; WONG, D. *et al.* Comparison of physical and technical performance in european soccer match-play: fa premier league and la liga. **Eur J Sport Sci.**, v. 11, n. 1, p. 51-9, 2011.

\_\_\_\_\_.; DA SILVA, C.D.; HILL-HAAS, S. *et al.* Heart-rate monitoring in soccer: interest and limits during competitive match-play and training - practical application. **J Strength Cond Res.**, v. 26, n. 10, p. 2890-906, 2012.

\_\_\_\_\_.; WONG, D.P.; MOALLA, W. *et al.* Physical and technical activity of soccer players in the french first league – with special reference to the playing position. **Int Sport Med J.**, v. 11, n. 2, p. 278-90, 2010.

DESBROW, B.; JANSEN, S.; BARRETT, A. *et al.* Comparing the rehydration potential of different milk-based drinks to a carbohydrate-electrolyte beverage. **Appl Physiol Nutr Metab.**, v. 39, n. 12, p. 1366-72, 2014.

DETKO, E.; O'HARA, J.P.; THELWALL, P.E. *et al.* Liver and muscle glycogen repletion using <sup>13</sup>c magnetic resonance spectroscopy following ingestion of maltodextrin, galactose, protein and amino acids. **Br J Nutr.**, v. 110, n. 5, p. 848-55, 2013.

DI SALVO, V.; BARON, R.; TSCHAN, H. *et al.* Performance characteristics according to playing position in elite soccer. **Int J Sports Med.**, v. 28, n. 3, p. 222-7, 2007.

DILL, D.B.; COSTILL, D.L. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. **J Appl Physiol.**, v. 37, n. 2, p. 247-8, 1974.

DONOHUE, R.T.; BENTON, D. Glucose tolerance predicts performance on tests of memory and cognition. **Physiol Behav.**, v. 71, n. 3-4, p. 395-401, 2000.

DUARTE, D.C.; NICOLAU, A.; TEIXEIRA, J.A. *et al.* The effect of bovine milk lactoferrin on human breast cancer cell lines. **J Dairy Sci.**, v. 94, n. 1, p. 66-76, 2011.

DUPONT, G.; NEDELEC, M.; MCCALL, A. *et al.* Effect of 2 soccer matches in a week on physical performance and injury rate. **Am J Sports Med.**, v. 38, n. 9, p. 1752-8, 2010.

DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. 4 ed. Curitiba: Champagnat - Pucpress, 2013.

EDUARDO, M.F.; LANNES, S. C.S. Achocolatados: análise química. **Rev Bra Ciê Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 405-12, 2004.

EDWARDS, A.M.; CLARK, N.A. Thermoregulatory observations in soccer match play: professional and recreational level applications using an intestinal pill system to measure core temperature. **Br J Sports Med.**, v. 40, n. 2, p. 133-8, 2006.

EKBLOM, B. Applied physiology of soccer. **Sports Med.**, v. 3, n. 1, p. 50-60, 1986.

EL-KHAIR, A.A. Optimization of a new version of chocolate milk for endurance performance and post-exercise recovery. **Journal of Agriculture and Biological Sciences.**, v. 5, n. , p. 482-9, 2009.

ELANGO, R.; CHAPMAN, K.; RAFII, M. *et al.* Determination of the tolerable upper intake level of leucine in acute dietary studies in young men. **Am J Clin Nutr.**, v. 96, n. 4, p. 759-67, 2012.

ENGELL, D.B.; MALLER, O.; SAWKA, M.N. *et al.* Thirst and fluid intake following graded hypohydration levels in humans. **Physiol Behav.**, v. 40, n. 2, p. 229-36, 1987.

FIFA/F-MARC. CONSENSUS STATEMENT Nutrition for football: the FIFA/F-MARC consensus conference. **J Sports Sci.**, v. 24, n. 7, p. 663-4, 2006.

FAO/WHO/UNU Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint fao/who/unu expert consultation. WHO technical report series, n. 935, 2002.

FARIA, V.C.D.; CAZAL, M.D.M.; CABRAL, C.A.C. *et al.* Influência do índice glicêmico na glicemia em exercício físico aeróbico. **Motriz.**, v. 17, n. 3, p. 395-405, 2011.

FARUP, J.; RAHBK, S.K.; VENDELBO, M.H. *et al.* Whey protein hydrolysate augments tendon and muscle hypertrophy independent of resistance exercise contraction mode. **Scand J Med Sci Sports.**, v. , n. , p. , 2013.

FATOUROS, I.G.; CHATZINIKOLAOU, A.; DOUROUDOS, I.I. *et al.* Time-course of changes in oxidative stress and antioxidant status responses following a soccer game. **J Strength Cond Res.**, v. 24, n. 12, p. 3278-86, 2010.

FAVANO, A.; SANTOS-SILVA, P.R.; NAKANO, E.Y. *et al.* Peptide glutamine supplementation for tolerance of intermittent exercise in soccer players. **Clinics.**, v. 63, n. 1, p. 27-32, 2008.

FERGUSON-STEAGALL, L.; MCCLEAVE, E.L.; DING, Z. *et al.* Postexercise carbohydrate-protein supplementation improves subsequent exercise performance

and intracellular signaling for protein synthesis. **J Strength Cond Res.**, v. 25, n. 5, p. 1210-24, 2011.

FERRER, M.D.; TAULER, P.; SUREDA, A. *et al.* Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise. **J Sports Sci.**, v. 27, n. 1, p. 49-58, 2009.

FILAIRE, E.; BERNAIN, X.; SAGNOL, M. *et al.* Preliminary results on mood state, salivary testosterone:cortisol ratio and team performance in a professional soccer team. **Eur J Appl Physiol.**, v. 86, n. 2, p. 179-84, 2001.

FLORIDA-JAMES, G.; REILLY, T. The physiological demands of gaelic football. **Br J Sports Med.**, v. 29, n. 1, p. 41-5, 1995.

FOGELHOLM, M. Vitamins, minerals and supplementation in soccer. **J Sports Sci.**, v. 12 Spec No, p. S23-7, 1994.

FOLEY, J.M.; JAYARAMAN, R.C.; PRIOR, B.M. *et al.* Mr measurements of muscle damage and adaptation after eccentric exercise. **J Appl Physiol.**, v. 87, n. 6, p. 2311-8, 1999.

FONOLLÁ, J.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; MACHADO, F.J. *et al.* Milk enriched with "healthy fatty acids" improves cardiovascular risk markers and nutritional status in human volunteers. **Nutrition.**, v. 25, n. 4, p. 408-14, 2009.

FOURNIER, P.A.; BRÄU, L.; FERREIRA, L.D.M.C. *et al.* Glycogen resynthesis in the absence of food ingestion during recovery from moderate or high intensity physical activity: novel insights from rat and human studies. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v. 133, n. 3, p. 755-63, 2002.

FOWLER, P.; DUFFIELD, R.; VAILE, J. Effects of simulated domestic and international air travel on sleep, performance, and recovery for team sports. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 3 n. 25, p. 441-51, 2015.

FREITAS, R.; NERO, L.A.; CARVALHO, A.F. Technical note: enumeration of mesophilic aerobes in milk: evaluation of standard official protocols and petrifilm aerobic count plates. **J Dairy Sci.**, v. 92, n. 7, p. 3069-73, 2009.

FRIDÉN, J.; LIEBER, R.L. Serum creatine kinase level is a poor predictor of muscle function after injury. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 11, n. 2, p. 126-7, 2001.

FRIDÉN, J.; LIEBER, R.L. Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. **Acta Physiol Scand.**, v. 171, n. 3, p. 321-6, 2001.

FRIDÉN, J.; SJÖSTRÖM, M.; EKBLÖM, B. A morphological study of delayed muscle soreness. **Experientia.**, v. 37, n. 5, p. 506-7, 1981.

FRIEDMAN, M. Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of d-amino acids. **Chem Biodivers.**, v. 7, n. 6, p. 1491-530, 2010.

GANDEVIA, S.C. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. **Physiol Rev.**, v. 81, n. 4, p. 1725-89, 2001.

GARBER, C.E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M.R. *et al.* American college of sports medicine position stand. quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 43, n. 7, p. 1334-59, 2011.

GARCÍA-ROVÉS, P.M.; GARCÍA-ZAPICO, P.; PATTERSON, A.M. *et al.* Nutrient intake and food habits of soccer players: analyzing the correlates of eating practice. **Nutrients.**, v. 6, n. 7, p. 2697-717, 2014.

GARLICK, P.J. The role of leucine in the regulation of protein metabolism. **J Nutr.**, v. 135, n. 6 Suppl, p. 1553S-6S, 2005.

GARRIDO, G.; WEBSTER, A.L.; CHAMORRO, M. Nutritional adequacy of different menu settings in elite spanish adolescent soccer players. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, v. 17, n. 5, p. 421-32, 2007.

GIAMBELLUCA, M.S.; GENDE, O.A. Effect of glycine on the release of reactive oxygen species in human neutrophils. **Int Immunopharmacol.**, v. 9, n. 1, p. 32-7, 2009.

GIFT, A.G. Visual analogue scales: measurement of subjective phenomena. **Nurs Res.**, v. 38, n. 5, p. 286-8, 1989.

GILANI, G.S. Background on international activities on protein quality assessment of foods. **Br J Nutr.**, v. 108 Suppl 2, n. , p. S168-82, 2012.

GILSON, S.F.; SAUNDERS, M.J.; MORAN, C.W. *et al.* Effects of chocolate milk consumption on markers of muscle recovery following soccer training: a randomized cross-over study. **J Int Soc Sports Nutr.**, v. 7, n. 19, p. 1-10, 2010.

GLEESON, M. Nutritional support to maintain proper immune status during intense training. **Nestle Nutr Inst Workshop Ser.**, v. 75, p. 85-97, 2013.

\_\_\_\_\_. Immunological aspects of sport nutrition. **Immunol Cell Biol.**, v. , n. , p. , 2015.

\_\_\_\_\_.; BLANNIN, A.K.; ZHU, B. *et al.* Cardiorespiratory, hormonal and haematological responses to submaximal cycling performed 2 days after eccentric or concentric exercise bouts. **J Sports Sci.**, v. 13, n. 6, p. 471-9, 1995.

\_\_\_\_\_.; NIEMAN, D.C.; PEDERSEN, B.K. Exercise, nutrition and immune function. **J Sports Sci.**, v. 22, n. 1, p. 115-25, 2004.

GONZÁLEZ SÁNCHEZ, M.E.; RIVERA TORRES, A.; MORÁN FAGÚNDEZ, L.J. [nutritional trial to evaluate calcium intake in postmenopausal women on a diet of fermented milk enriched in calcium and vitamin d (densia®)]. **Nutr Hosp.**, v. 27, n. 2, p. 537-41, 2012.

GRAVINA, L.; RUIZ, F.; DIAZ, E. *et al.* Influence of nutrient intake on antioxidant capacity, muscle damage and white blood cell count in female soccer players. **J Int Soc Sports Nutr.**, v. 9, n. 1, p. 32, 2012.

\_\_\_\_\_.; RUIZ, F.; LEKUE, J.A. *et al.* Metabolic impact of a soccer match on female players. **J Sports Sci.**, v. 29, n. 12, p. 1345-52, 2011.

GREGSON, W.; DRUST, B.; ATKINSON, G. *et al.* Match-to-match variability of high-speed activities in premier league soccer. **Int J Sports Med.**, v. 31, n. 4, p. 237-42, 2010.

GROPPER, S.S.; GROPPER, D.M.; ACOSTA, P.B. Plasma amino acid response to ingestion of l-amino acids and whole protein. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 16, n. 2, p. 143-50, 1993.

GRYSON, C.; WALRAND, S.; GIRAUDET, C. *et al.* "fast proteins" with a unique essential amino acid content as an optimal nutrition in the elderly: growing evidence. **Clin Nutr.**, v. 33, n. 4, p. 642-8, 2014.

GUERRA, I.; SOARES, E.D.A.; BURINI, R.C. Aspectos nutricionais do futebol de competição. **Rev Bras Med Esporte.**, v. 7, n. 6, p. 200-2006, 2001.

GUNNARSSON, T.P.; BENDIKSEN, M.; BISCHOFF, R. *et al.* Effect of whey protein- and carbohydrate-enriched diet on glycogen resynthesis during the first 48 h after a soccer game. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 23, n. 4, p. 508-15, 2013.

HAJOSCH, R.; SUCKFUELL, M.; OESSER, S. *et al.* A novel gelatin sponge for accelerated hemostasis. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 94, n. 2, p. 372-9, 2010.

HALSON, S.L. Monitoring training load to understand fatigue in athletes. **Sports Med.**, v. 44, n. Suppl 2, p. S139-47, 2014.

HANEISHI, K.; FRY, A.C.; MOORE, C.A. *et al.* Cortisol and stress responses during a game and practice in female collegiate soccer players. **J Strength Cond Res.**, v. 21, n. 2, p. 583-8, 2007.

HARA, D.; MORRISON, P.J.; DING, Z. *et al.* Effect of carbohydrate-protein supplementation postexercise on rat muscle glycogen synthesis and phosphorylation of proteins controlling glucose storage. **Metabolism.**, v. 60, n. 10, p. 1406-15, 2011.

HARPER, L.D.; BRIGGS, M.A.; MCNAMEE, G. *et al.* Physiological and performance effects of carbohydrate gels consumed prior to the extra-time period of prolonged simulated soccer match-play. **Journal of Science and Medicine in Sport.**, v. , n. , p. , 2015.

HARTMAN, J.W.; TANG, J.E.; WILKINSON, S.B. *et al.* Consumption of fat-free fluid milk after resistance exercise promotes greater lean mass accretion than does consumption of soy or carbohydrate in young, novice, male weightlifters. **Am J Clin Nutr.**, v. 86, n. 2, p. 373-81, 2007.



HARTOG, A.; COZIJNSEN, M.; DE VRIJ, G. *et al.* Collagen hydrolysate inhibits zymosan-induced inflammation. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 238, n. 7, p. 798-802, 2013.

HARVEY, G.; MEIR, R.; BROOKS, L. *et al.* The use of body mass changes as a practical measure of dehydration in team sports. **J Sci Med Sport**, v. 11, n. 6, p. 600-3, 2008.

HAUG, A.; HØSTMARK, A.T.; HARSTAD, O.M. Bovine milk in human nutrition-a review. **Lipids Health Dis**, v. 6, p. 25, 2007.

HAUSSWIRTH, C. *et al.* **Recovery for performance in sport**. ed. Champaign: Human Kinetics, 2013.

HAWKINS, R.D.; HULSE, M.A.; WILKINSON, C. *et al.* The association football medical research programme: an audit of injuries in professional football. **Br J Sports Med**, v. 35, n. 1, p. 43-7, 2001.

HAWLEY, J.A.; BURKE, L.M.; PHILLIPS, S.M. *et al.* Nutritional modulation of training-induced skeletal muscle adaptations. **J Appl Physiol**, v. 110, n. 3, p. 834-45, 2011.

\_\_\_\_\_; TIPTON, K.D.; MILLARD-STAFFORD, M.L. Promoting training adaptations through nutritional interventions. **J Sports Sci**, v. 24, n. 7, p. 709-21, 2006.

HAYS, N.P.; KIM, H.; WELLS, A.M. *et al.* Effects of whey and fortified collagen hydrolysate protein supplements on nitrogen balance and body composition in older women. **J Am Diet Assoc**, v. 109, n. 6, p. 1082-7, 2009.

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 21 ed. São Paulo: Manole, 2013.

HILDEBRANDT, C.; RASCHNER, C.; AMMER, K. An overview of recent application of medical infrared thermography in sports medicine in austria. **Sensors**, v. 10, n. 5, p. 4700-15, 2010.

HOPKINS; W. G. Sportscience. Probabilities of clinical or practical significance. Disponível em: <http://www.sportsci.org/jour/0201/wghprob.htm>. Acesso em: 18 dez 2015.

HULLEY, S. *et al.* **Designing clinical research**. 4 ed.: Wolters Kluwer Health, 2013.

ICMSF. THE INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS **Microorganisms in foods 7. microbiological testing in food safety management**. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2002.

INSTITUTE OF MEDICINE **Dietary references intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids**. Ed. Washington, DC: The National Academy Press, 2001.

IGLESIAS-GUTIÉRREZ, E.; GARCÍA-ROVÉS, P.M.; RODRÍGUEZ, C. *et al.* Food habits and nutritional status assessment of adolescent soccer players. a necessary and accurate approach. **Can J Appl Physiol.**, v. 30, n. 1, p. 18-32, 2005.

IMAFIDON, G.I.; FARKYE, N.Y.; SPANIER, A.M. Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 37, n. 7, p. 663-89, 1997.

IMPELLIZZERI, F.M.; MAFFIULETTI, N.A. Convergent evidence for construct validity of a 7-point likert scale of lower limb muscle soreness. **Clin J Sport Med.**, v. 17, n. 6, p. 494-6, 2007.

INGRAM, C.J.E.; MULCARE, C.A.; ITAN, Y. *et al.* Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. **Hum Genet.**, v. 124, n. 6, p. 579-91, 2009.

INTERNATIONAL SOCIETY FOR THE ADVANCEMENT OF KINANTHROPOMETRY (ISAK) **International standards for anthropometric assessment.** 1 ed. Adelaide: National Library of Australia, 2001.

ISHIHARA, K.; KATO, Y.; USAMI, A. *et al.* Electrolyte-free milk protein solution influences sodium and fluid retention in rats. **J Nutr Sci.**, v. 2, p. e8, 2013.

ISPIRLIDIS, I.; FATOUROS, I.G.; JAMURTAS, A.Z. *et al.* Time-course of changes in inflammatory and performance responses following a soccer game. **Clin J Sport Med.**, v. 18, n. 5, p. 423-31, 2008.

IVERSON, J.F.; GANNON, M.C.; NUTTALL, F.Q. Interaction of ingested leucine with glycine on insulin and glucose concentrations. **J Amino Acids.**, v. 2014, n. , p. 521941, 2014.

IVY, J.L.; DING, Z.; HWANG, H. *et al.* Post exercise carbohydrate-protein supplementation: phosphorylation of muscle proteins involved in glycogen synthesis and protein translation. **Amino Acids.**, v. 35, n. 1, p. 89-97, 2008.

\_\_\_\_\_; GOFORTH, H.W.J.; DAMON, B.M. *et al.* Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate-protein supplement. **J Appl Physiol.**, v. 93, n. 4, p. 1337-44, 2002.

\_\_\_\_\_; KATZ, A.L.; CUTLER, C.L. *et al.* Muscle glycogen synthesis after exercise: effect of time of carbohydrate ingestion. **J Appl Physiol (1985).**, v. 64, n. 4, p. 1480-5, 1988.

\_\_\_\_\_; KUO, C.H. Regulation of glut4 protein and glycogen synthase during muscle glycogen synthesis after exercise. **Acta Physiol Scand.**, v. 162, n. 3, p. 295-304, 1998.

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

JACOBS, I.; WESTLIN, N.; KARLSSON, J. *et al.* Muscle glycogen and diet in elite soccer players. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.**, v. 48, n. 3, p. 297-302, 1982.

JAMES, L. Milk protein and the restoration of fluid balance after exercise. **Med Sport Sci.**, v. 59, p. 120-6, 2012.

JAMES, L.J.; CLAYTON, D.; EVANS, G.H. Effect of milk protein addition to a carbohydrate-electrolyte rehydration solution ingested after exercise in the heat. **Br J Nutr.**, v. 105, n. 3, p. 393-9, 2011.

JENSEN, J.; RUSTAD, P.I.; KOLNES, A.J. *et al.* The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. **Front Physiol.**, v. 2, n. , p. 112, 2011.

JENSEN, T. E.; RICHTER, E.A. Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. **J Physiol.**, v. 590, n. Pt 5, p. 1069-76, 2012.

JENTJENS, R.; JEUKENDRUP, A. Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. **Sports Med.**, v. 33, n. 2, p. 117-44, 2003.

\_\_\_\_\_.; VAN LOON, L.J.; MANN, C.H. *et al.* Addition of protein and amino acids to carbohydrates does not enhance postexercise muscle glycogen synthesis. **J Appl Physiol.**, v. 91, n. 2, p. 839-46, 2001.

JEUKENDRUP, A.E.; JENTJENS, R. Oxidation of carbohydrate feedings during prolonged exercise: current thoughts, guidelines and directions for future research. **Sports Med.**, v. 29, n. 6, p. 407-24, 2000.

\_\_\_\_\_.; VET-JOOP, K.; STURK, A. *et al.* Relationship between gastro-intestinal complaints and endotoxaemia, cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. **Clin Sci (Lond).**, v. 98, n. 1, p. 47-55, 2000.

JIANG, L.J.; NG, E.Y.K.; YEO, A.C.B. *et al.* A perspective on medical infrared imaging. **J Med Eng Technol.**, v. 29, n. 6, p. 257-67, 2005.

JONES, D.A.; NEWHAM, D.J.; ROUND, J.M. *et al.* Experimental human muscle damage: morphological changes in relation to other indices of damage. **J Physiol.**, v. 375, p. 435-48, 1986.

JORDANO, R.; LOPEZ, C.; RODRIGUEZ, V. *et al.* Comparison of petrifilm method to conventional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms, escherichia coli and yeasts and molds in foods. **Acta Microbiol Immunol Hung.**, v. 42, n. 3, p. 255-9, 1995.

KAASTRA, B.; MANDERS, R.J.F.; VAN BREDA, E. *et al.* Effects of increasing insulin secretion on acute postexercise blood glucose disposal. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 38, n. 2, p. 268-75, 2006.

KAKANIS, M.W.; PEAKE, J.; BRENU, E.W. *et al.* The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. **Exerc Immunol Rev.**, v. 16, n. Suppl., p. 119-37, 2010.

KANDA, A.; MORIFUJI, M.; FUKASAWA, T. *et al.* Dietary whey protein hydrolysates increase skeletal muscle glycogen levels via activation of glycogen synthase in mice. **J Agric Food Chem.**, v. 60, n. 45, p. 11403-8, 2012.

\_\_\_\_\_.; NAKAYAMA, K.; FUKASAWA, T. *et al.* Post-exercise whey protein hydrolysate supplementation induces a greater increase in muscle protein synthesis than its constituent amino acid content. **Br J Nutr.**, v. 110, n. 6, p. 981-7, 2013.

KANEKANIAN, A. **Milk and dairy products as functional foods.** 1 ed. : Wiley, 2014.

KARP, J.R.; JOHNSTON, J.D.; TECKLENBURG, S. *et al.* Chocolate milk as a post-exercise recovery aid. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, v. 16, n. 1, p. 78-91, 2006.

KATCH, F. *et al.* **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano.** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008.

KATO, H.; SUZUKI, H.; MIMURA, M. *et al.* Leucine-enriched essential amino acids attenuate muscle soreness and improve muscle protein synthesis after eccentric contractions in rats. **Amino Acids.**, v. 47, n. 6, p. 1193-201, 2015.

KELLER, C.; STEENSBERG, A.; HANSEN, A.K. *et al.* Effect of exercise, training, and glycogen availability on il-6 receptor expression in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985).**, v. 99, n. 6, p. 2075-9, 2005.

KELLMANN, M. Underrecovery and overtraining: different concepts – similar impact? In: *Enhancing recovery: preventing underperformance in athletes.* Kellmann M (Ed.). 2002. 3-24.

\_\_\_\_\_. Preventing overtraining in athletes in high-intensity sports and stress/recovery monitoring. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 20 Suppl 2, p. 95-102, 2010.

KEMPTON, M.J.; ETTINGER, U.; FOSTER, R. *et al.* Dehydration affects brain structure and function in healthy adolescents. **Hum Brain Mapp.**, v. 32, n. 1, p. 71-9, 2011.

KENTTÄ, G.; HASSMÉN, P. Overtraining and recovery. a conceptual model. **Sports Med.**, v. 26, n. 1, p. 1-16, 1998.

KIRWAN, J.P.; DEL AGUILA, L.F. Insulin signalling, exercise and cellular integrity. **Biochem Soc Trans.**, v. 31, n. Pt 6, p. 1281-5, 2003.

KOO, G.H.; WOO, J.; KANG, S. *et al.* Effects of supplementation with bcaa and l-glutamine on blood fatigue factors and cytokines in juvenile athletes submitted to maximal intensity rowing performance. **J Phys Ther Sci.**, v. 26, n. 8, p. 1241-6, 2014.

KOOPMAN, R.; CROMBACH, N.; GIJSEN, A.P. *et al.* Ingestion of a protein hydrolysate is accompanied by an accelerated in vivo digestion and absorption rate when compared with its intact protein. **Am J Clin Nutr.**, v. 90, n. 1, p. 106-15, 2009.

\_\_\_\_\_.; WAGENMAKERS, A.J.M.; MANDERS, R.J.F. *et al.* Combined ingestion of protein and free leucine with carbohydrate increases postexercise muscle protein synthesis in vivo in male subjects. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 288, n. 4, p. E645-53, 2005.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. **Curr Pharm Des.**, v. 13, n. 8, p. 829-43, 2007.

KRAEMER, W.J.; VOLEK, J.S.; BUSH, J.A. *et al.* Hormonal responses to consecutive days of heavy-resistance exercise with or without nutritional supplementation. **J Appl Physiol (1985).**, v. 85, n. 4, p. 1544-55, 1998.

KREIDER, R.B.; EARNEST, C.P.; LUNDBERG, J. *et al.* Effects of ingesting protein with various forms of carbohydrate following resistance-exercise on substrate availability and markers of anabolism, catabolism, and immunity. **J Int Soc Sports Nutr.**, v. 4, n. , p. 18, 2007.

KRUSTRUP, P.; MOHR, M.; NYBO, L. *et al.* The yo-yo ir2 test: physiological response, reliability, and application to elite soccer. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 38, n. 9, p. 1666-73, 2006.

\_\_\_\_\_.; MOHR, M.; STEENSBERG, A. *et al.* Muscle and blood metabolites during a soccer game: implications for sprint performance. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 38, n. 6, p. 1165-74, 2006.

\_\_\_\_\_.; ORTENBLAD, N.; NIELSEN, J. *et al.* Maximal voluntary contraction force, sr function and glycogen resynthesis during the first 72 h after a high-level competitive soccer game. **Eur J Appl Physiol.**, v. 111, n. 12, p. 2987-95, 2011.

KRZYWKOWSKI, K.; PETERSEN, E.W.; OSTROWSKI, K. *et al.* Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in lymphocyte function. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 281, n. 4, p. C1259-65, 2001.

KWIATEK, M.A.; MENNE, D.; STEINGOETTER, A. *et al.* Effect of meal volume and calorie load on postprandial gastric function and emptying: studies under physiological conditions by combined fiber-optic pressure measurement and mri. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 297, n. 5, p. G894-901, 2009.

LAAKSONEN, M.M.L.; IMPIVAARA, O.; SIEVÄNEN, H. *et al.* Associations of genetic lactase non-persistence and sex with bone loss in young adulthood. **Bone.**, v. 44, n. 5, p. 1003-9, 2009.

LATIF, R. Health benefits of cocoa. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.**, v. 16, n. 6, p. 669-74, 2013.

LAURENT, C.M.; GREEN, J.M.; BISHOP, P.A. *et al.* A practical approach to monitoring recovery: development of a perceived recovery status scale. **J Strength Cond Res.**, v. 25, n. 3, p. 620-8, 2011.

LAYMAN, D.K.; ANTHONY, T.G.; RASMUSSEN, B.B. *et al.* Defining meal requirements for protein to optimize metabolic roles of amino acids. **Am J Clin Nutr.**, *no prelo*, 2015.

LAZARIM, F.L.; ANTUNES-NETO, J.M.F.; DA SILVA, F.O.C. *et al.* The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian national championship. **J Sci Med Sport.**, v. 12, n. 1, p. 85-90, 2009.

LEMON, P.W. Protein requirements of soccer. **J Sports Sci.**, v. 12 Spec No, n. , p. S17-22, 1994.

LIM, C.L.; PYNE, D.; HORN, P. *et al.* The effects of increased endurance training load on biomarkers of heat intolerance during intense exercise in the heat. **Appl Physiol Nutr Metab.**, v. 34, n. 4, p. 616-24, 2009.

LIU, D.; NIKOO, M.; BORAN, G. *et al.* Collagen and gelatin. **Annu Rev Food Sci Technol.**, v. 6, p. 527-57, 2015.

LOLLO, P.C.B.; AMAYA-FARFAN, J.; DE CARVALHO-SILVA, L.B. Physiological and physical effects of different milk protein supplements in elite soccer players. **J Hum Kinet.**, v. 30, n. , p. 49-57, 2011.

LOPES, D.C.F. Desenvolvimento de bebida láctea adicionada de ácido linoléico conjugado e ensaio clínico em mulheres obesas. 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

LOVELL, R.; KNAPPER, B.; SMALL, K. Physiological responses to saft90: a new soccer-specific match simulation. **Coach Sports Sci.**, v. 3, p. 46, 2008.

\_\_\_\_\_; MIDGLEY, A.; BARRETT, S. *et al.* Effects of different half-time strategies on second half soccer-specific speed, power and dynamic strength. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 23, n. 1, p. 105-13, 2013.

LUIKING, Y.C.; DEUTZ, N.E.; MEMELINK, R.G. *et al.* Postprandial muscle protein synthesis is higher after a high whey protein, leucine-enriched supplement than after a dairy-like product in healthy older people: a randomized controlled trial. **Nutr J.**, v. 13, n. 1, p. 9, 2014.

LUNN, W.R.; PASIAKOS, S.M.; COLLETTA, M.R. *et al.* Chocolate milk and endurance exercise recovery: protein balance, glycogen, and performance. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 44, n. 4, p. 682-91, 2012.

LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; RECIO, I. Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumor properties. **Adv Exp Med Biol.**, v. 606, p. 271-93, 2008.

MALM, C.; EKBLÖM, Ö.; EKBLÖM, B. Immune system alteration in response to two consecutive soccer games. **Acta Physiol Scand.**, v. 180, n. 2, p. 143-55, 2004.

\_\_\_\_\_.; EKBLÖM, Ö.; EKBLÖM, B. Immune system alteration in response to increased physical training during a five day soccer training camp. **Int J Sports Med.**, v. 25, n. 6, p. 471-6, 2004.

MANABE, Y.; GOLLISCH, K.S.C.; HOLTON, L. *et al.* Exercise training-induced adaptations associated with increases in skeletal muscle glycogen content. **FEBS J.**, v. 280, n. 3, p. 916-26, 2013.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Altern Med Rev.**, v. 9, n. 2, p. 136-56, 2004.

MARSHALL, P.W.M.; LOVELL, R.; JEPPESEN, G.K. *et al.* Hamstring muscle fatigue and central motor output during a simulated soccer match. **PLoS One.**, v. 9, n. 7, p. e102753, 2014.

MARTINS, R.C.; CHIAPETTA, S.C.; PAULA, F. *et al.* Avaliação da vida de prateleira de bebida isotônica a base de suco concentrado de frutas e hortaliças congelado por 30 dias. **Alim. Nutr.**, v. 22, n. 4, p. 623-9, 2011.

MASTROIACOVO, D.; KWIK-URIBE, C.; GRASSI, D. *et al.* Cocoa flavanol consumption improves cognitive function, blood pressure control, and metabolic profile in elderly subjects: the cocoa, cognition, and aging (cocoa) study--a randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr.**, v. 101, n. 3, p. 538-48, 2015.

MATSUDO, S.; ARAÚJO, T.; MATSUDO, V. *et al.* Questionário internacional de atividade física (ipaq): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. **Rev Bras Ativ Fís Saúde.**, v. 6, n. 2, p. 05-18, 2001.

MATSUI, T.; SOYA, S.; OKAMOTO, M. *et al.* Brain glycogen decreases during prolonged exercise. **J Physiol.**, v. 589, n. Pt 13, p. 3383-93, 2011.

MATTAR, R.; MAZO, D.F.D.C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 56, n. 2, p. 230-6, 2010.

MATTHEWS, D.E. Observations of branched-chain amino acid administration in humans. **J Nutr.**, v. 135, n. 6 Suppl, p. 1580S-4S, 2005.

MAUGHAN, R. *et al.* **The biochemical basis of sports performance.** 1st ed. UK: Oxford University Press, 2004.

MAUGHAN, R.J.; LEIPER, J.B.; VIST, G.E. Gastric emptying and fluid availability after ingestion of glucose and soy protein hydrolysate solutions in man. **Exp Physiol.**, v. 89, n. 1, p. 101-8, 2004.

\_\_\_\_\_.; SHIRREFFS, S.M.; OZGÜNEN, K.T. *et al.* Living, training and playing in the heat: challenges to the football player and strategies for coping with environmental extremes. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 20 Suppl 3, p. 117-24, 2010.

\_\_\_\_\_.; SHIRREFFS, S.M. Development of individual hydration strategies for athletes. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, v. 18, n. 5, p. 457-72, 2008.

\_\_\_\_\_.; SHIRREFFS, S.M. Development of hydration strategies to optimize performance for athletes in high-intensity sports and in sports with repeated intense efforts. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 20 Suppl 2, n. , p. 59-69, 2010.

MCBRIER, N.M.; VAIRO, G.L.; BAGSHAW, D. *et al.* Cocoa-based protein and carbohydrate drink decreases perceived soreness after exhaustive aerobic exercise: a pragmatic preliminary analysis. **J Strength Cond Res.**, v. 24, n. 8, p. 2203-10, 2010.

MCCULLY, K.K.; FAULKNER, J.A. Characteristics of lengthening contractions associated with injury to skeletal muscle fibers. **J Appl Physiol (1985).**, v. 61, n. 1, p. 293-9, 1986.

MEEUSEN, R. Exercise, nutrition and the brain. **Sports Med.**, v. 44 Suppl 1, p. S47-56, 2014.

\_\_\_\_\_.; WATSON, P.; DVORAK, J. The brain and fatigue: new opportunities for nutritional interventions? **J Sports Sci.**, v. 24, n. 7, p. 773-82, 2006.

MERO, A. Leucine supplementation and intensive training. **Sports Med.**, v. 27, n. 6, p. 347-58, 1999.

MILLWARD, D.J. Knowledge gained from studies of leucine consumption in animals and humans. **J Nutr.**, v. 142, n. 12, p. 2212S-2219S, 2012.

MINIM, V. P. R. Análise sensorial: estudo com consumidores. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006.

MOHR, M.; DRAGANIDIS, D.; CHATZINIKOLAOU, A. *et al.* Muscle damage, inflammatory, immune and performance responses to three football games in 1 week in competitive male players. **Eur J Appl Physiol.**, *no prelo*, 2015.

\_\_\_\_\_.; KRUSTRUP, P.; BANGSBO, J. Match performance of high-standard soccer players with special reference to development of fatigue. **J Sports Sci.**, v. 21, n. 7, p. 519-28, 2003.

\_\_\_\_\_.; KRUSTRUP, P.; BANGSBO, J. Fatigue in soccer: a brief review. **J Sports Sci.**, v. 23, n. 6, p. 593-9, 2005.

\_\_\_\_\_., M.; KRUSTRUP, P.; NYBO, L. *et al.* Muscle temperature and sprint performance during soccer matches: beneficial effect of re-warm-up at half-time. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 14, n. 3, p. 156-62, 2004.

MORATO, P.N.; LOLLO, P.C.B.; MOURA, C.S. *et al.* Whey protein hydrolysate increases translocation of glut-4 to the plasma membrane independent of insulin in wistar rats. **PLoS One.**, v. 8, n. 8, p. e71134, 2013.



\_\_\_\_\_.; RODRIGUES, J.B.; MOURA, C.S. *et al.* Omega-3 enriched chocolate milk: a functional drink to improve health during exhaustive exercise. **Journal of Functional Foods**, v. 14, n. 0, p. 676-83, 2015.

MOREIRA, A.; ARSATI, F.; CURY, P.R. *et al.* Salivary immunoglobulin a response to a match in top-level brazilian soccer players. **J Strength Cond Res**, v. 23, n. 7, p. 1968-73, 2009.

\_\_\_\_\_.; ARSATI, F.; DE OLIVEIRA LIMA ARSATI, Y.B. *et al.* Salivary cortisol in top-level professional soccer players. **Eur J Appl Physiol**, v. 106, n. 1, p. 25-30, 2009.

\_\_\_\_\_.; ARSATI, F.; DE OLIVEIRA LIMA-ARSATI, Y.B. *et al.* Salivary immunoglobulin a responses in professional top-level futsal players. **J Strength Cond Res**, v. 25, n. 7, p. 1932-6, 2011.

MORIFUJI, M.; KANDA, A.; KOGA, J. *et al.* Post-exercise carbohydrate plus whey protein hydrolysates supplementation increases skeletal muscle glycogen level in rats. **Amino Acids**, v. 38, n. 4, p. 1109-15, 2010.

\_\_\_\_\_.; KOGA, J.; KAWANAKA, K. *et al.* Branched-chain amino acid-containing dipeptides, identified from whey protein hydrolysates, stimulate glucose uptake rate in l6 myotubes and isolated skeletal muscles. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 55, n. 1, p. 81-6, 2009.

MORTATTI, A.L.; MOREIRA, A.; AOKI, M.S. *et al.* Effect of competition on salivary cortisol, immunoglobulin a, and upper respiratory tract infections in elite young soccer players. **J Strength Cond Res**, v. 26, n. 5, p. 1396-401, 2012.

MOUGIOS, V. Reference intervals for serum creatine kinase in athletes. **Br J Sports Med**, v. 41, n. 10, p. 674-8, 2007.

MULLINIX, M.C.; JONNALAGADDAA, S.S.; ROSENBLOOMA, C.A. *et al.* Dietary intake of female u.s. soccer players. **Nutrition Research**, v. 23, n. , p. 585-93, 2003.

MURO URISTA, C.; ÁLVAREZ FERNÁNDEZ, R.; RIERA RODRIGUEZ, F. *et al.* Review: production and functionality of active peptides from milk. **Food Sci Technol Int.**, v. 17, n. 4, p. 293-317, 2011.

MURRAY, R.; EDDY, D.E.; MURRAY, T.W. *et al.* The effect of fluid and carbohydrate feedings during intermittent cycling exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 19, n. 6, p. 597-604, 1987.

MAĐRY, E.; KRASIŃSKA, B.; DRZYMAŁA-CZYŻ, S. *et al.* Lactose malabsorption is a risk factor for decreased bone mineral density in pancreatic insufficient cystic fibrosis patients. **Eur J Hum Genet**, v. 20, n. 10, p. 1092-5, 2012.

NABAVI, S.F.; SUREDA, A.; DAGLIA, M. *et al.* Anti-oxidative polyphenolic compounds of cocoa. **Curr Pharm Biotechnol**, v. , n. , p. , 2015.

NACLERIO, F.; LARUMBE-ZABALA, E.; COOPER, R. *et al.* A multi-ingredient containing carbohydrate, proteins l-glutamine and l-carnitine attenuates fatigue

perception with no effect on performance, muscle damage or immunity in soccer players. **PLoS One.**, v. 10, n. 4, p. e0125188, 2015.

NEDELEC, M.; MCCALL, A.; CARLING, C. *et al.* The influence of soccer playing actions on the recovery kinetics after a soccer match. **J Strength Cond Res.**, v.26 , n. 6, p. 1517-23, 2013.

NELSON, A.R.; JACKSON, L.; CLARKE, J. *et al.* Effect of post-exercise protein-leucine feeding on neutrophil function, immunomodulatory plasma metabolites and cortisol during a 6-day block of intense cycling. **Eur J Appl Physiol.**, v. 113, n. 9, p. 2211-22, 2013.

\_\_\_\_\_; PHILLIPS, S.M.; STELLINGWERFF, T. *et al.* A protein-leucine supplement increases branched-chain amino acid and nitrogen turnover but not performance. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 44, n. 1, p. 57-68, 2012.

NEVILLE, V.; GLEESON, M.; FOLLAND, J.P. Salivary iga as a risk factor for upper respiratory infections in elite professional athletes. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 40, n. 7, p. 1228-36, 2008.

NICASTRO, H.; ARTIOLI, G.G.; COSTA, A.D.S. *et al.* An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions. **Amino Acids.**, v. 40, n. 2, p. 287-300, 2011.

NICOLL, D. *et al.* **Manual de exames diagnósticos.** 6 ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2013.

NIELSEN, J.; HOLMBERG, H.; SCHRØDER, H.D. *et al.* Human skeletal muscle glycogen utilization in exhaustive exercise: role of subcellular localization and fibre type. **J Physiol.**, v. 589, n. Pt 11, p. 2871-85, 2011.

\_\_\_\_\_; KRUSTRUP, P.; NYBO, L. *et al.* Skeletal muscle glycogen content and particle size of distinct subcellular localizations in the recovery period after a high-level soccer match. **Eur J Appl Physiol.**, v. 112, n. 10, p. 3559-67, 2012.

NIEMAN, D.C. Immunonutrition support for athletes. **Nutr Rev.**, v. 66, n. 6, p. 310-20, 2008.

\_\_\_\_\_; BISHOP, N.C. Nutritional strategies to counter stress to the immune system in athletes, with special reference to football. **J Sports Sci.**, v. 24, n. 7, p. 763-72, 2006.

NOSAKA, K.; CLARKSON, P.M. Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 28, n. 8, p. 953-61, 1996.

NYBO, L.; DALSGAARD, M.K.; STEENSBERG, A. *et al.* Cerebral ammonia uptake and accumulation during prolonged exercise in humans. **J Physiol.**, v. 563, n. Pt 1, p. 285-90, 2005.

\_\_\_\_\_.; SECHER, N.H. Cerebral perturbations provoked by prolonged exercise. **Prog Neurobiol.**, v. 72, n. 4, p. 223-61, 2004.

NÉDÉLEC, M.; MCCALL, A.; CARLING, C. *et al.* Recovery in soccer: part i - post-match fatigue and time course of recovery. **Sports Med.**, v. 42, n. 12, p. 997-1015, 2012.

\_\_\_\_\_.; MCCALL, A.; CARLING, C. *et al.* Physical performance and subjective ratings after a soccer-specific exercise simulation: comparison of natural grass versus artificial turf. **J Sports Sci.**, v. 31, n. 5, p. 529-36, 2013.

\_\_\_\_\_.; MCCALL, A.; CARLING, C. *et al.* Recovery in soccer: part ii-recovery strategies. **Sports Med.**, v. 43, n. 1, p. 9-22, 2013.

OEDRA, K.M. Milk allergy in adults and children. **Nurs Stand.**, v. 29, n. 44, p. 43-8, 2015.

OESSER, S.; ADAM, M.; BABEL, W. *et al.* Oral administration of (14)c labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (c57/bl). **J Nutr.**, v. 129, n. 10, p. 1891-5, 1999.

ORTENBLAD, N.; WESTERBLAD, H.; NIELSEN, J. Muscle glycogen stores and fatigue. **J Physiol.**, v. 15, n. 591(Pt 18), p. 4405-13, 2013.

OSGNACH, C.; POSER, S.; BERNARDINI, R. *et al.* Energy cost and metabolic power in elite soccer: a new match analysis approach. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 42, n. 1, p. 170-8, 2010.

OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; ASP, S. *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **J Physiol.**, v. 515 (Pt 1), p. 287-91, 1999.

OTTAWAY, C.A.; HUSBAND, A.J. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. **Immunol Today.**, v. 15, n. 11, p. 511-7, 1994.

OWEN, A.L.; WONG, D.P.; DUNLOP, G. *et al.* High intensity training and salivary immunoglobulin-a responses in professional top-level soccer players: effect of training intensity. **J Strength Cond Res.**, *no prelo*, 2014.

OZGÜNEN, K.T.; KURDAK, S.S.; MAUGHAN, R.J. *et al.* Effect of hot environmental conditions on physical activity patterns and temperature response of football players. **Scand J Med Sci Sports.**, v. 20 Suppl 3, p. 140-7, 2010.

PACHECO, M.T.B.; DIAS, N.F.G.; BALDINI, V.L.S. *et al.* Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 25, n. 02, p. 333-8, 2005.

PALMER, T.N.; FOURNIER, P.A. Replenishment of muscle glycogen after high-intensity exercise: a role for intramuscular lactate glyconeogenesis?. **Biochem Soc Trans.**, v. 25, n. 1, p. 25-30, 1997.

PAPACOSTA, E.; NASSIS, G.P.; GLEESON, M. Effects of acute postexercise chocolate milk consumption during intensive judo training on the recovery of salivary

hormones, salivary sIgA, mood state, muscle soreness, and judo-related performance. **Appl Physiol Nutr Metab.**, v. 40, n. 11, p. 1116-22, 2015.

PASTRE, C.M.; BASTOS, F.D.N.; NETTO JÚNIOR, J. *et al.* Métodos de recuperação pós-exercício: uma revisão sistemática. **Rev Bras Med Esporte.**, v. 15, n. 2, p. 138-44, 2009.

PAULSEN, G.; CRAMERI, R.; BENESTAD, H.B. *et al.* Time course of leukocyte accumulation in human muscle after eccentric exercise. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 42, n. 1, p. 75-85, 2010.

PEDERSEN, B.K. Il-6 signalling in exercise and disease. **Biochem Soc Trans.**, v. 35, n. Pt 5, p. 1295-7, 2007.

\_\_\_\_\_; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol Rev.**, v. 88, n. 4, p. 1379-406, 2008.

\_\_\_\_\_; ROHDE, T.; ZACHO, M. Immunity in athletes. **J Sports Med Phys Fitness.**, v. 36, n. 4, p. 236-45, 1996.

PENCHARZ, P.B.; ELANGO, R.; BALL, R. O. Determination of the tolerable upper intake level of leucine in adult men. **J Nutr.**, v. 142, n. 12, p. 2220S-2224S, 2012.

PENNINGS, B.; BOIRIE, Y.; SENDEN, J.M.G. *et al.* Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. **Am J Clin Nutr.**, v. 93, n. 5, p. 997-1005, 2011.

PESCHEK, K.; PRITCHETT, R.; BERGMAN, E. *et al.* The effects of acute post exercise consumption of two cocoa-based beverages with varying flavanol content on indices of muscle recovery following downhill treadmill running. **Nutrients.**, v. 6, n. 1, p. 50-62, 2014.

PETERSEN, A.M.W.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol (1985).**, v. 98, n. 4, p. 1154-62, 2005.

\_\_\_\_\_; PEDERSEN, B.K. The role of il-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. **J Physiol Pharmacol.**, v. 57 Suppl 10, p. 43-51, 2006.

PFLANZER, S.B.; CRUZ, A.G.D.; HATANAKA, C.L. *et al.* Perfil sensorial e aceitação de bebida láctea achocolatada. **Food Science and Technology (Campinas).**, v. 30, n. , p. 391-8, 2010.

PHILLIPS, S.M.; SPROULE, J.; TURNER, A.P. Carbohydrate ingestion during team games exercise: current knowledge and areas for future investigation. **Sports Med.**, v. 41, n. 7, p. 559-85, 2011.

PIMENTA, E.M.; COELHO, D.B.; CRUZ, I.R. *et al.* The ACTN3 genotype in soccer players in response to acute eccentric training. **Eur J Appl Physiol.**, v. 112, n. 4, p. 1495-503, 2012.

PIRES, C.V.; OLIVEIRA, M.G.D.A.; ROSA, J.C. *et al.* Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 26, n. 1, p. 179-87, 2006.

POTTER, J.; FULLER, B. The effectiveness of chocolate milk as a post-climbing recovery aid. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 55, n. 12, p. 1438-44, 2015.

POWELL, J.D.; DELGOFFE, G.M. The mammalian target of rapamycin: linking t cell differentiation, function, and metabolism. **Immunity**, v. 33, n. 3, p. 301-11, 2010.

POZEFSKY, T.; FELIG, P.; TOBIN, J.D. *et al.* Amino acid balance across tissues of the forearm in postabsorptive man. effects of insulin at two dose levels. **J Clin Invest**, v. 48, n. 12, p. 2273-82, 1969.

PRICE, T.B.; ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, R.G. NMR of glycogen in exercise. **Proc Nutr Soc**, v. 58, n. 4, p. 851-9, 1999.

\_\_\_\_\_; ROTHMAN, D.L.; TAYLOR, R. *et al.* Human muscle glycogen resynthesis after exercise: insulin-dependent and -independent phases. **J Appl Physiol**, v. 76, n. 1, p. 104-11, 1994.

PRITCHETT, K.; BISHOP, P.; PRITCHETT, R. *et al.* Acute effects of chocolate milk and a commercial recovery beverage on postexercise recovery indices and endurance cycling performance. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 6, p. 1017-22, 2009.

\_\_\_\_\_; PRITCHETT, R. Chocolate milk: a post-exercise recovery beverage for endurance sports. **Med Sport Sci**, v. 59, p. 127-34, 2012.

PRUNA, R.; ARTELLS, R.; RIBAS, J. *et al.* Single nucleotide polymorphisms associated with non-contact soft tissue injuries in elite professional soccer players: influence on degree of injury and recovery time. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 14, p. 221, 2013.

RAJA AZIDIN, R.M.F.; SANKEY, S.; DRUST, B. *et al.* Effects of treadmill versus overground soccer match simulations on biomechanical markers of anterior cruciate ligament injury risk in side cutting. **J Sports Sci**, v. , n. , p. 1-10, 2015.

RANKIN, J.W.; GOLDMAN, L.P.; PUGLISI, M.J. *et al.* Effect of post-exercise supplement consumption on adaptations to resistance training. **J Am Coll Nutr**, v. 23, n. 4, p. 322-30, 2004.

REBELO, A.N.; CANDEIAS, J.R.; FRAGA, M.M. *et al.* The impact of soccer training on the immune system. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 38, n. 3, p. 258-61, 1998.

REIDY, P.T.; WALKER, D.K.; DICKINSON, J.M. *et al.* Protein blend ingestion following resistance exercise promotes human muscle protein synthesis. **J Nutr**, v. 143, n. 4, p. 410-6, 2013.

REILLY, T. Energetics of high-intensity exercise (soccer) with particular reference to fatigue. **J Sports Sci**, v. 15, n. 3, p. 257-63, 1997.

\_\_\_\_\_.; DRUST, B.; CLARKE, N. Muscle fatigue during football match-play. **Sports Med.**, v. 38, n. 5, p. 357-67, 2008.

\_\_\_\_\_.; EKBLUM, B. The use of recovery methods post-exercise. **J Sports Sci.**, v. 23, n. 6, p. 619-27, 2005.

REITELSEDER, S.; AGERGAARD, J.; DOESSING, S. *et al.* Positive muscle protein net balance and differential regulation of atrogene expression after resistance exercise and milk protein supplementation. **Eur J Nutr.**, v. 53, n. 1, p. 321-33, 2014.

RICO-SANZ, J.; ZEHNDER, M.; BUCHLI, R. *et al.* Muscle glycogen degradation during simulation of a fatiguing soccer match in elite soccer players examined noninvasively by <sup>13</sup>C-mrs. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 31, n. 11, p. 1587-93, 1999.

RIENZI, E.; DRUST, B.; REILLY, T. *et al.* Investigation of anthropometric and work-rate profiles of elite south american international soccer players. **J Sports Med Phys Fitness.**, v. 40, n. 2, p. 162-9, 2000.

RODEN, M.; PERSEGHIN, G.; PETERSEN, K.F. *et al.* The roles of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glycogen synthesis and turnover in humans. **J Clin Invest.**, v. 97, n. 3, p. 642-8, 1996.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Rev Bras Cienc Farm.**, v. 44, n. 4, p. 563-75, 2008.

ROHDE, H.; ESPERSEN, T.. Work intensity during soccer training and match-play. In: *Science and football*. Reilly T, Lees A, Davids K & Murphy WJ (Eds.). 1988. 68-75.

ROHDE, T.; MACLEAN, D.A.; HARTKOPP, A. *et al.* The immune system and serum glutamine during a triathlon. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.**, v. 74, n. 5, p. 428-34, 1996.

ROLLO, I.; IMPELLIZZERI, F.M.; ZAGO, M. *et al.* Effects of 1 versus 2 games a week on physical and subjective scores of subelite soccer players. **Int J Sports Physiol Perform.**, v. 9, n. 3, p. 425-31, 2014.

ROSTGAARD, T.; IAIA, F.M.; SIMONSEN, D.S. *et al.* A test to evaluate the physical impact on technical performance in soccer. **J Strength Cond Res.**, v. 22, n. 1, p. 283-92, 2008.

ROWLANDS, D.S.; NELSON, A.R.; PHILLIPS, S.M. *et al.* Protein-leucine fed dose effects on muscle protein synthesis after endurance exercise. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 47, n. 3, p. 547-55, 2015.

ROY, B.D. Milk: the new sports drink? a review. **J Int Soc Sports Nutr.**, v. 5, n. , p. 15, 2008.

RUSSELL, M.; PENNOCK, A. Dietary analysis of young professional soccer players for 1 week during the competitive season. **J Strength Cond Res.**, v. 25, n. 7, p. 1816-23, 2011.

RUSU, D.; DROUIN, R.; POULIOT, Y. *et al.* A bovine whey protein extract can enhance innate immunity by priming normal human blood neutrophils. **J Nutr.**, v. 139, n. 2, p. 386-93, 2009.

\_\_\_\_\_.; DROUIN, R.; POULIOT, Y. *et al.* A bovine whey protein extract stimulates human neutrophils to generate bioactive il-1ra through a nf-kappab- and mapk-dependent mechanism. **J Nutr.**, v. 140, n. 2, p. 382-91, 2010.

**SBPC Recomendações da sociedade brasileira de patologia clínica/medicina laboratorial para coleta de sangue venoso.** 2. ed. São Paulo: Minha Editora, 2010.

SAAT, M.; TOCHIHARA, Y.; HASHIGUCHI, N. *et al.* Effects of exercise in the heat on thermoregulation of japanese and malaysian males. **J Physiol Anthropol Appl Human Sci.**, v. 24, n. 4, p. 267-75, 2005.

SABBADINI, E.; BERCZI, I. The submandibular gland: a key organ in the neuro-immuno-regulatory network?. **Neuroimmunomodulation.**, v. 2, n. 4, p. 184-202, 1995.

SALTIEL, A.R. Insulin signaling in the control of glucose and lipid homeostasis. **Handb Exp Pharmacol.**, v. , n. , p. , 2016.

SANTOS, E.D.S.M.D.; ALVES, R.M.; LIMA, C.D.S. Elaboração tecnológica e aceitação sensorial de bebida isotônica orgânica de tangerina (*citrus reticulata* blanco). **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v. 1, n. , p. 87-92, 2013.

SARI-SARRAF, V.; DORAN, D.A.; CLARKE, N.D. *et al.* Effects of carbohydrate beverage ingestion on the salivary iga response to intermittent exercise in the heat. **Int J Sports Med.**, v. 32, n. 9, p. 659-65, 2011.

SCHEDL, H P; MAUGHAN, R J; GISOLFI, C. V. Intestinal absorption during rest and exercise: implications for formulating an oral rehydration solution (ors). Proceedings of a roundtable discussion. April 21-22, 1993. 1994.

SCHULPIS, K.H.; PARTHIMOS, T.; PAPAKONSTANTINO, E.D. *et al.* Evidence for the participation of the stimulated sympathetic nervous system in the regulation of carnitine blood levels of soccer players during a game. **Metabolism.**, v. 58, n. 8, p. 1080-6, 2009.

SDEPANIAN, V.L.; DE MORAIS, M.B.; FAGUNDES NETO, U. Celiac disease: evolution in knowledge since its original centennial description up to the present day. **Arq Gastroenterol.**, v. 36, n. 4, p. 244-57, 1999.

SECHER, N.H.; SEIFERT, T.; VAN LIESHOUT, J.J. Cerebral blood flow and metabolism during exercise: implications for fatigue. **J Appl Physiol (1985).**, v. 104, n. 1, p. 306-14, 2008.

SEIFERT, J.; HARMON, J.; DECLERCQ, P. Protein added to a sports drink improves fluid retention. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, v. 16, n. 4, p. 420-9, 2006.

SELLAR, C.M.; SYROTUIK, D.G.; FIELD, C.J. *et al.* The effect of dietary control and carbohydrate supplementation on the immune and hormonal responses to rowing exercise. **Appl Physiol Nutr Metab.**, v. 31, n. 5, p. 588-96, 2006.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Rev Nutr.**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SHEPHARD, R.J. Biology and medicine of soccer: an update. **J Sports Sci.**, v. 17, n. 10, p. 757-86, 1999.

SHEPHARD, R.J.; SHEK, P.N. Immune responses to inflammation and trauma: a physical training model. **Can J Physiol Pharmacol.**, v. 76, n. 5, p. 469-72, 1998.

SHIBY, V.K.; MISHRA, H.N. Fermented milks and milk products as functional foods--a review. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 53, n. 5, p. 482-96, 2013.

SHIRREFFS, S.M. Markers of hydration status. **J Sports Med Phys Fitness.**, v. 40, n. 1, p. 80-4, 2000.

\_\_\_\_\_. Markers of hydration status. **Eur J Clin Nutr.**, v. 57 Suppl 2, n. , p. S6-9, 2003.

\_\_\_\_\_.; SAWKA, M.N.; STONE, M. Water and electrolyte needs for football training and match-play. **J Sports Sci.**, v. 24, n. 7, p. 699-707, 2006.

\_\_\_\_\_.; WATSON, P.; MAUGHAN, R.J. Milk as an effective post-exercise rehydration drink. **Br J Nutr.**, v. 98, n. 1, p. 173-80, 2007.

SILVA, J.R.; ASCENSÃO, A.; MARQUES, F. *et al.* Neuromuscular function, hormonal and redox status and muscle damage of professional soccer players after a high-level competitive match. **Eur J Appl Physiol.**, v. 113, n. 9, p. 2193-201, 2013.

SILVA, M.; CAVALLI, D.; OLIVEIRA, T. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e petrifilm ec na detecção de coliformes totais e escherichia coli em alimentos. **Food Science and Technology (Campinas).**, v. 26, n. 2, p. 352-9, 2006.

SIMPSON, R.J.; KUNZ, H.; AGHA, N. *et al.* Exercise and the regulation of immune functions. **Prog Mol Biol Transl Sci.**, v. 135, n. , p. 355-80, 2015.

SINGH, T.K.R.; GUELFY, K.J.; LANDERS, G. *et al.* A comparison of muscle damage, soreness and performance following a simulated contact and non-contact team sport activity circuit. **J Sci Med Sport.**, v. 14, n. 5, p. 441-6, 2011.

SIRI, W.E.. Body composition from fluids spaces and density: analyses of methods. In: *Techniques for measuring body composition.* Brozek J & Henschel A (Eds.). 1961. 223-44.

SMALL, K.; MCNAUGHTON, L.; GREIG, M. *et al.* The effects of multidirectional soccer-specific fatigue on markers of hamstring injury risk. **J Sci Med Sport.**, v. 13, n. 1, p. 120-5, 2010.



\_\_\_\_\_.; MCNAUGHTON, L.; GREIG, M. *et al.* Effect of timing of eccentric hamstring strengthening exercises during soccer training: implications for muscle fatigability. **J Strength Cond Res.**, v. 23, n. 4, p. 1077-83, 2009.

\_\_\_\_\_.; MCNAUGHTON, L.R.; GREIG, M. *et al.* Soccer fatigue, sprinting and hamstring injury risk. **Int J Sports Med.**, v. 30, n. 8, p. 573-8, 2009.

SONG, Q.; XU, R.; ZHANG, Q. *et al.* Glutamine supplementation and immune function during heavy load training. **Int J Clin Pharmacol Ther.**, v. 53, n. 5, p. 372-6, 2015.

SOUGLIS, A.; BOGDANIS, G.C.; GIANNOPOULOU, I. *et al.* Comparison of inflammatory responses and muscle damage indices following a soccer, basketball, volleyball and handball game at an elite competitive level. **Res Sports Med.**, v. 23, n. 1, p. 59-72, 2015.

\_\_\_\_\_.; PAPAPANAGIOTOU, A.; BOGDANIS, G.C. *et al.* Comparison of inflammatory responses to a soccer match between elite male and female players. **J Strength Cond Res.**, v. 29, n. 5, p. 1227-33, 2015.

SOUSA, M.; TEIXEIRA, V.H.; SOARES, J. Dietary strategies to recover from exercise-induced muscle damage. **Int J Food Sci Nutr.**, v. , n. , p. , 2013.

SPACCAROTELLA, K.J.; ANDZEL, W.D. Building a beverage for recovery from endurance activity: a review. **J Strength Cond Res.**, v. 25, n. 11, p. 3198-204, 2011.

\_\_\_\_\_.; ANDZEL, W.D. The effects of low fat chocolate milk on postexercise recovery in collegiate athletes. **J Strength Cond Res.**, v. 25, n. 12, p. 3456-60, 2011.

STAPLES, A.W.; BURD, N.A.; WEST, D.W.D. *et al.* Carbohydrate does not augment exercise-induced protein accretion versus protein alone. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 43, n. 7, p. 1154-61, 2011.

STEENSBERG, A.; FEBBRAIO, M.A.; OSADA, T. *et al.* Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. **J Physiol.**, v. 537, n. Pt 2, p. 633-9, 2001.

STEVENS, B.R.; ROSS, H.J.; WRIGHT, E.M. Multiple transport pathways for neutral amino acids in rabbit jejunal brush border vesicles. **J Membr Biol.**, v. 66, n. 3, p. 213-25, 1982.

STRØYER, J.; HANSEN, L.; KLAUSEN, K. Physiological profile and activity pattern of young soccer players during match play. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 36, n. 1, p. 168-74, 2004.

STØLEN, T.; CHAMARI, K.; CASTAGNA, C. *et al.* Physiology of soccer: an update. **Sports Med.**, v. 35, n. 6, p. 501-36, 2005.

SUDA, Y.; UMEDA, T.; WATANEBE, K. *et al.* Changes in neutrophil functions during a 10-month soccer season and their effects on the physical condition of professional Japanese soccer players. **Luminescence**, v. 28, n. 2, p. 121-8, 2013.

SUREDA, A.; FERRER, M.D.; TAULER, P. *et al.* Effects of exercise intensity on lymphocyte h<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and antioxidant defences in soccer players. **Br J Sports Med**, v. 43, n. 3, p. 186-90, 2009.

SUZUKI, K.; YAMADA, M.; KURAKAKE, S. *et al.* Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. **Eur J Appl Physiol**, v. 81, n. 4, p. 281-7, 2000.

SVENSSON, M.; DRUST, B. Testing soccer players. **J Sports Sci**, v. 23, n. 6, p. 601-18, 2005.

SZILAGYI, A. Adult lactose digestion status and effects on disease. **Can J Gastroenterol Hepatol**, v. 29, n. 3, p. 149-56, 2015.

TEE, J.C.; BOSCH, A.N.; LAMBERT, M.I. Metabolic consequences of exercise-induced muscle damage. **Sports Med**, v. 37, n. 10, p. 827-36, 2007.

THOMAS, J.R. *et al.* **Métodos de pesquisa em atividade física**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

THOMAS, K.; MORRIS, P.; STEVENSON, E. Improved endurance capacity following chocolate milk consumption compared with 2 commercially available sport drinks. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 1, p. 78-82, 2009.

THORPE, R.; SUNDERLAND, C. Muscle damage, endocrine and immune marker response to a soccer match. **J Strength Cond Res**, v. 26, n. 10, p. 2783-90, 2012.

THORPE, R.T.; STRUDWICK, A.J.; BUCHHEIT, M. *et al.* Monitoring fatigue during the in-season competitive phase in elite soccer players. **Int J Sports Physiol Perform**, v. 10, n. 8, p. 958-64, 2015.

TIDBALL, J.G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 5, p. R1173-87, 2010.

TIDD, J. *et al.* **Gestão da inovação**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman Editora, 2015.

TIPTON, K.D.; ELLIOTT, T.A.; CREE, M.G. *et al.* Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 12, p. 2073-81, 2004.

\_\_\_\_\_; ELLIOTT, T.A.; FERRANDO, A.A. *et al.* Stimulation of muscle anabolism by resistance exercise and ingestion of leucine plus protein. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 2, p. 151-61, 2009.

TSUBAKIHARA, T.; UMEDA, T.; TAKAHASHI, I. *et al.* Effects of soccer matches on neutrophil and lymphocyte functions in female university soccer players. **Luminescence**, v. 28, n. 2, p. 129-35, 2013.

TURNER, N.J.; BADYLAK, S.F. Regeneration of skeletal muscle. **Cell Tissue Res.**, v. 347, n. 3, p. 759-74, 2012.

VELDERS, M.; DIEL, P. How sex hormones promote skeletal muscle regeneration. **Sports Med.**, v. 43, n. 11, p. 1089-100, 2013.

VENTER, R.E. Perceptions of team athletes on the importance of recovery modalities. **Eur J Sport Sci.**, v. 14 Suppl 1, p. S69-76, 2014.

VERHOEVEN, S.; VANSCHOONBEEK, K.; VERDIJK, L.B. *et al.* Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men. **Am J Clin Nutr.**, v. 89, n. 5, p. 1468-75, 2009.

VETTERLI, L.; CAROBBIO, S.; POURNOURMOHAMMADI, S. *et al.* Delineation of glutamate pathways and secretory responses in pancreatic islets with  $\beta$ -cell-specific abrogation of the glutamate dehydrogenase. **Mol Biol Cell.**, v. 23, n. 19, p. 3851-62, 2012.

VOGEL, H.J. Lactoferrin, a bird's eye view. **Biochem Cell Biol.**, v. 90, n. 3, p. 233-44, 2012.

VOLTERMAN, K.A.; OBEID, J.; WILK, B. *et al.* Effect of milk consumption on rehydration in youth following exercise in the heat. **Appl Physiol Nutr Metab.**, v. 39, n. 11, p. 1257-64, 2014.

VONK, R.J.; PRIEBE, M.G.; KOETSE, H.A. *et al.* Lactose intolerance: analysis of underlying factors. **Eur J Clin Invest.**, v. 33, n. 1, p. 70-5, 2003.

WALSH, N.P.; GLEESON, M.; PYNE, D.B. *et al.* Position statement. part two: maintaining immune health. **Exerc Immunol Rev.**, v. 17, p. 64-103, 2011.

\_\_\_\_\_; GLEESON, M.; SHEPHARD, R.J. *et al.* Position statement. part one: immune function and exercise. **Exerc Immunol Rev.**, v. 17, p. 6-63, 2011.

WARHOL, M.J.; SIEGEL, A.J.; EVANS, W.J. *ET AL.* Skeletal muscle injury and repair in marathon runners after competition. **Am J Pathol.**, v. 118, n. 2, p. 331-9, 1985.

WARREN, J.D.; BLUMBERGS, P.C.; THOMPSON, P. D. Rhabdomyolysis: a review. **Muscle Nerve.**, v. 25, n. 3, p. 332-47, 2002.

WATSON, P.; LOVE, T.D.; MAUGHAN, R.J. *et al.* A comparison of the effects of milk and a carbohydrate-electrolyte drink on the restoration of fluid balance and exercise capacity in a hot, humid environment. **Eur J Appl Physiol.**, v. 104, n. 4, p. 633-42, 2008.

WILKINSON, D.J.; HOSSAIN, T.; HILL, D.S. *et al.* Effects of leucine and its metabolite,  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (hmb) on human skeletal muscle protein metabolism. **J Physiol.**, v. 1, n. 591(Pt 11), p. 2911-23, 2013.

\_\_\_\_\_; SMEETON, N.J.; WATT, P. W. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. **Prog Neurobiol.**, v. 91, n. 3, p. 200-19, 2010.

WILKINSON, S.B.; TARNOPOLSKY, M.A.; MACDONALD, M.J. *et al.* Consumption of fluid skim milk promotes greater muscle protein accretion after resistance exercise than does consumption of an isonitrogenous and isoenergetic soy-protein beverage. **Am J Clin Nutr.**, v. 85, n. 4, p. 1031-40, 2007.

WILLIAMS, C.; SERRATOSA, L. Nutrition on match day. **J Sports Sci.**, v. 24, n. 7, p. 687-97, 2006.

WILLIAMS, S.J.; KENDALL, L. Perceptions of elite coaches and sports scientists of the research needs for elite coaching practice. **J Sports Sci.**, v. 25, n. 14, p. 1577-86, 2007.

WIŚNIK, P.; CHMURA, J.; ZIEMBA, A.W. *et al.* The effect of branched chain amino acids on psychomotor performance during treadmill exercise of changing intensity simulating a soccer game. **Appl Physiol Nutr Metab.**, v. 36, n. 6, p. 856-62, 2011.

WOJCIK, J.R.; WALBER-RANKIN, J.; SMITH, L.L. *et al.* Comparison of carbohydrate and milk-based beverages on muscle damage and glycogen following exercise. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, v. 11, n. 4, p. 406-19, 2001.

WRIGHT, D.C.; HUCKER, K.A.; HOLLOSZY, J.O. *et al.* Ca<sup>2+</sup> and ampk both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. **Diabetes.**, v. 53, n. 2, p. 330-5, 2004.

XU, G.; KWON, G.; CRUZ, W.S. *et al.* Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the mtor-signaling pathway by pancreatic beta-cells. **Diabetes.**, v. 50, n. 2, p. 353-60, 2001.

ZACHWIEJA, J.J.; COSTILL, D.L.; PASCOE, D.D. *et al.* Influence of muscle glycogen depletion on the rate of resynthesis. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 23, n. 1, p. 44-8, 1991.

ZAWADZKI, K.M.; YASPELKIS, B.B.3.; IVY, J.L. Carbohydrate-protein complex increases the rate of muscle glycogen storage after exercise. **J Appl Physiol.**, v. 72, n. 5, p. 1854-9, 1992.

ZIEGLER, F.L.F.; SGARBIERI, V.C. Caracterização químico-nutricional de um isolado protéico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. **Revista de Nutrição.**, v. 22, n. 1, p. 61-70, 2009.

ZIMMER, P.; BAUMANN, F.T.; BLOCH, W. *et al.* Impact of a half marathon on cellular immune system, pro-inflammatory cytokine levels, and recovery behavior of breast cancer patients in the aftercare compared to healthy controls. **Eur J Haematol.**, v. 96, n. 2, p. 152-9, 2016.

VAN LOON, L.J.; KRUIJSHOOP, M.; VERHAGEN, H. *et al.* Ingestion of protein hydrolysate and amino acid-carbohydrate mixtures increases postexercise plasma insulin responses in men. **J Nutr.**, v. 130, n. 10, p. 2508-13, 2000a.

\_\_\_\_\_.; SARIS, W.H.; KRUIJSHOOP, M. *et al.* Maximizing postexercise muscle glycogen synthesis: carbohydrate supplementation and the application of amino acid or protein hydrolysate mixtures. **Am J Clin Nutr.**, v. 72, n. 1, p. 106-11, 2000b.

VAN LOON, L.J.C.; GIBALA, M.J. Dietary protein to support muscle hypertrophy. **Nestle Nutr Inst Workshop Ser.**, v. 69, p. 79-89; discussion 89-95, 2011.

ØRTENBLAD, N.; NIELSEN, J.; SALTIN, B. *et al.* Role of glycogen availability in sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  kinetics in human skeletal muscle. **J Physiol.**, v. 589, n. Pt 3, p. 711-25, 2011.

# ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeitos de uma bebida formulada na recuperação pós-exercício

**Pesquisador:** Emerson Silami Garcia

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 32153514.5.0000.5149

**Instituição Proponente:** PRO REITORIA DE PESQUISA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 799.259

**Data da Relatoria:** 19/09/2014

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Somos favoráveis à aprovação do projeto "Efeitos de uma bebida formulada na recuperação pós-exercício" do Pesquisador Prof. Dr. Emerson Silami Garcia.

#### **Situação do Parecer:**

Aprovado

#### **Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 22 de Setembro de 2014

---

**Assinado por:**

**Telma Campos Medeiros Lorentz**  
(Coordenador)

## ANEXO 2

AVALIADO: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

SIM	NÃO	PERGUNTA
		1. O seu médico já lhe disse alguma vez que você apresenta um problema cardíaco?
		2. Você apresenta dores no peito com frequência?
		3. Você apresenta episódios freqüentes de tonteira ou sensação de desmaio?
		4. Seu médico alguma vez já lhe disse que sua pressão sanguínea era muito alta?
		5. Seu médico alguma vez já lhe disse que você apresenta um problema ósseo ou articular, como uma artrite, que tenha sido agravado pela prática de exercícios, ou que possa ser por eles agravado?
		6. Existe alguma boa razão física, não mencionada aqui, para que você não siga um programa de atividade física, se desejar fazê-lo?
		Você tem mais de 65 anos e não está acostumado a se exercitar vigorosamente?

**Se você respondeu:**

<b>SIM A UMA OU MAIS PERGUNTAS</b>	<p><b>Se você não consultou seu médico recentemente, consulte-o por telefone ou pessoalmente, ANTES de intensificar suas atividades físicas /ou de ser avaliado para um programa de condicionamento físico. Diga a seu médico que perguntas você respondeu com um SIM a este questionário conhecido como PAR-Q ou mostre a cópia deste questionário.</b></p>
<b>NÃO A TODAS AS PERGUNTAS</b>	<p>Se você respondeu este questionário corretamente, você pode ter uma razoável garantia de apresentar as condições adequadas para: Um programa de exercícios gradativos. – um aumento gradual na intensidade dos exercícios adequados promove um bom desenvolvimento do condicionamento físico, ao mesmo tempo em que minimiza ou elimina o desconforto associado.</p>

### PROGRAMAS

Após a avaliação médica, procure se aconselhar com seu médico acerca de suas condições para:

- Atividades físicas irrestrita, começando a partir de baixos níveis de intensidade e aumentando progressivamente.
- Atividade física limitada ou supervisionada que satisfaça suas necessidades específicas, pelo menos em uma base inicial. Verifique em sua continuidade os programas ou serviços especiais.
- 

### Adiar o início do programa de exercícios.

Na vigência de uma enfermidade temporária de menor gravidade, tal como um resfriado comum.

## ANEXO 3

### RECORDATÓRIO ALIMENTAR

AVALIADO: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

<b>Refeição</b>	<b>Alimento</b>	<i>Quantidade</i> (Medida Caseira)
<b>Desjejum</b> Hora: Local:		
<b>Colação</b> Hora: Local:		
<b>Almoço</b> Hora: Local:		
<b>Lanche</b> Hora: Local:		
<b>Jantar</b> Hora: Local:		
<b>Ceia</b> Hora: Local:		



## ANEXO 4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
Campus Universitário – 36570-000 Viçosa, Minas Gerais – Tel.(31) 38993371 – Fax:(31)38992208

PROPOSTA DE PROJETO DE PESQUISA

TERMO DE COOPERAÇÃO DE INSTITUIÇÃO PATÍCIPE DO PROJETO

Título do Projeto Proposto:

**“Efeitos de uma bebida láctea achocolatada formulada na recuperação pós-exercício”**

Declaramos para os devidos fins que se fazem necessários junto à UFMG que a UFV – Universidade Federal de Viçosa, por intermédio do Departamento de Tecnologia de Alimentos, fará parte da equipe do projeto supracitado na qualidade de Instituição Associada, dispondo suas instalações, equipamentos e pessoal conforme consta na proposta como contrapartida e apoio para execução.

Por ser a expressão da verdade, dato e assino o presente.

Viçosa, 04 de junho de 2014.

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti  
Pró-Reitor de Pesquisa e  
Pós-Graduação

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação - UFV

Representante Legal

## ANEXO 5

AVALIADO: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

<b>6</b>	<b>SEM NENHUM ESFORÇO</b>
<b>7</b>	<b>EXTREMAMENTE LEVE</b>
<b>8</b>	
<b>9</b>	<b>MUITO LEVE</b>
<b>10</b>	
<b>11</b>	<b>LEVE</b>
<b>12</b>	
<b>13</b>	<b>UM POUCO INTENSO</b>
<b>14</b>	
<b>15</b>	<b>INTENSO (PESADO)</b>
<b>16</b>	
<b>17</b>	<b>MUITO INTENSO</b>
<b>18</b>	
<b>19</b>	<b>EXTREMAMENTE INTENSO</b>
<b>20</b>	<b>MÁXIMO ESFORÇO</b>

Borg (1982)

FONTE: Borg G. Psychological bases of perceived exertion. Med Sci Sports Exerc. 1982 14(5):377-81.

## ANEXO 6

AVALIADO: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

### ESCALA DE LIKERT PSICOFÍSICA

0	Ausência completa de dor
1	Dor leve sentida apenas quando é tocado (a) / aparece vagamente
2	Dor moderada sentida apenas quando é tocado (a) / dor ligeira persistente
3	Leve dor ao subir ou descer escadas
4	Leve dor ao caminhar sobre uma superfície plana / constantemente dolorosa
5	Dor moderada, rigidez ou fraqueza ao caminhar / constantemente muito dolorosa
6	A dor limita a minha capacidade de mover

Fonte: Impellizzeri FM, *et al.* Convergent evidence for construct validity of a 7-Point Likert Scale of lower limb muscle soreness. Clin J Sport Med. 2007 17(6):494-6.

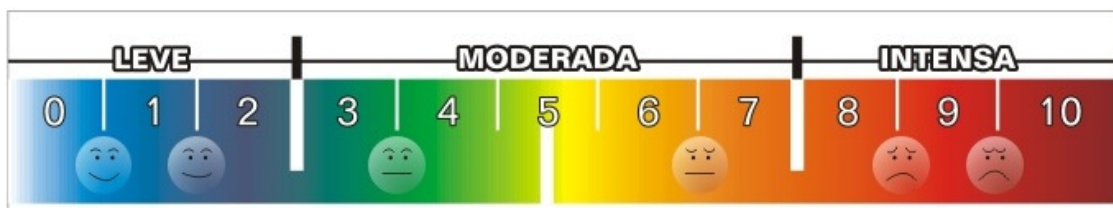
## ANEXO 7

AVALIADO: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

### Visual Analogue Scale

Você tem dor?

Como você classifica sua dor?



Fonte: Gift AG. Visual analogue scales: measurement of subjective phenomena. Nurs Res. 1989 38(5):286-8.

## ANEXO 8

AVALIADO: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

### ESCALA DE RECUPERAÇÃO PERCEBIDA

<b>10</b>	<b>Muito bem recuperado / altamente energizado</b>
<b>9</b>	
<b>8</b>	<b>Bem recuperado / pouco energizado</b>
<b>7</b>	
<b>6</b>	<b>Moderadamente recuperado</b>
<b>5</b>	<b>Recuperado adequadamente</b>
<b>4</b>	<b>Um pouco recuperado</b>
<b>3</b>	
<b>2</b>	<b>Não bem recuperado / um pouco cansado</b>
<b>1</b>	
<b>0</b>	<b>Muito mal recuperado / extremamente cansado</b>

Fonte: Laurent, CM, Green, JM, Bishop, PA, Sjøkvist, J, Schumacker, RE, Richardson, MT, and Curtner-Smith, M. A practical approach to monitoring recovery: development of a perceived recovery status scale. J Strength Cond Res 25(3): 620–628, 2011.

## ANEXO 9

AVALIADO: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

### ESCALA DE SENSAÇÃO DE SEDE



Engell *et al.* (1987)

Fonte: Engell DB, *et al.* Thirst and fluid intake following graded hypohydration levels in humans. *Physiol Behav.* 1987 40(2):229-36.

## **ANEXO 10**

### **TESTE DE ACEITAÇÃO (ESCALA HEDÔNICA)**

Por favor, avalie a amostra utilizando a escala abaixo para dizer o quanto você gostou ou desgostou do produto. Indique a posição que melhor reflita o seu julgamento quanto a impressão global, aparência, consistência e sabor.

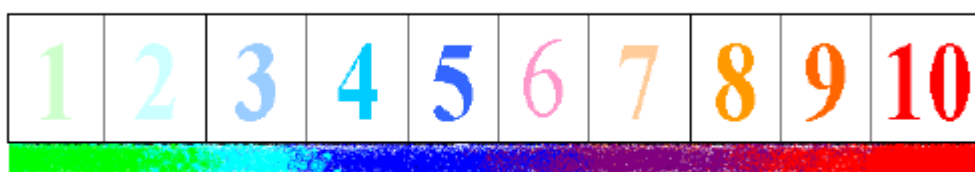
9. gostei extremamente
8. gostei muito
7. gostei moderadamente
6. gostei ligeiramente
5. indiferente
4. desgostei ligeiramente
3. desgostei moderadamente
2. desgostei muito
1. desgostei extremamente

Fonte: Meilgaard M, Civille G, Carr B. Sensory Evaluation Techniques, Fourth Edition: CRC Press/Taylor & Francis; 2007.

## ANEXO 11

AVALIADO: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

### SENSAÇÃO DE CONFORTO GASTRO-INTESTINAL



Jeukendrup *et al* (2000)

**Sensação de inchaço**

**Náusea**

**Flatulência**

**Refluxo**

Fonte: Jeukendrup AE, *et al*. Relationship between gastro-intestinal complaints and endotoxaemia, cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. *Clin Sci (Lond)*. 2000 98(1):47-55.