



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**ADMINISTRAÇÃO DE DOSE ÚNICA DE GEL DE BETERRABA, RICO
EM NITRATO NÃO MODIFICA A PERFORMANCE E OS PARÂMETROS
METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS DE INDIVÍDUOS FISICAMENTE
ATIVOS**

Julia Teixeira Peixoto de Vasconcellos

Rio de Janeiro

2015

JULIA TEIXEIRA PEIXOTO DE VASCONCELLOS

**ADMINISTRAÇÃO DE DOSE ÚNICA DE GEL DE BETERRABA, RICO
EM NITRATO NÃO MODIFICA A PERFORMANCE E OS PARÂMETROS
METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS DE INDIVÍDUOS FISICAMENTE
ATIVOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência de
Alimentos da Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Vânia Margaret Flosi Paschoalin

Co-orientador: Dr. Thiago da Silveira Alvares

Rio de Janeiro

2015

V331

Vasconcellos, Julia Teixeira Peixoto.

Administração de dose única de gel de beterraba, rico em nitrato não modifica a performance e os parâmetros metabólicos e bioquímicos de indivíduos fisicamente ativos / Julia Teixeira Peixoto de Vasconcellos. -- Rio de Janeiro: UFRJ/ IQ, 2015.

148f.: il.

Orientador: Vânia Margaret Flosi Paschoalin.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, 2015.

1. Beterraba. 2. Óxido Nítrico. 3. Exercício aeróbio. 4. Cortisol. 5. Nitrato e nitrito. I. Paschoalin, Vânia Margaret Flosi. (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDD: 664.001

Julia Teixeira Peixoto de Vasconcellos

**ADMINISTRAÇÃO DE DOSE ÚNICA DE GEL DE BETERRABA, RICO
EM NITRATO NÃO MODIFICA A PERFORMANCE E OS PARÂMETROS
METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS DE INDIVÍDUOS FISICAMENTE
ATIVOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em: _____ dezembro de 2015.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Vânia M. Flosi Paschoalin-IQ/UFRJ
(Orientadora)

Prof.^o Dr.^o Thiago da Silveira Alvares- UFRJ/Macaé
(Coorientador)

Prof.^o Dr.^o Daniel Perrone Moreira - IQ/UFRJ

Prof.^a Dr.^a Josely Correa Koury – UERJ/DNBE

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento, CAPES e FAPERJ, pelo apoio financeiro concedido a mim e ao presente trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade e pelo conteúdo transmitido essencial para que eu alcançasse o grau de mestre.

À Prof^a. Dr^a. Vânia Paschoalin e ao Prof. Dr. Eduardo Mere Del Aguila pelo apoio incansável nas correções da dissertação e pela experiência acadêmica que foi de grande importância para que realizasse um bom trabalho e concluísse esta etapa.

Ao Prof. Dr. Thiago Alvares pelo incentivo a embarcar nesta caminhada e por toda experiência acadêmica transmitida desde o início.

Ao Prof. Dr. Carlos Adam Conte e à Prof^a. Dr^a. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci pela colaboração na realização das análises e correção do artigo.

Ao aluno MSc. Diego Silvestre pela enorme ajuda na coleta e análise de dados durante o mestrado. Ao Prof. Dr. João Pedro Werneck de Castro que colaborou para que a coleta de dados fosse realizada com sucesso.

Aos meus pais e irmão que me apoiaram e deram suporte ao longo de toda jornada, com muito amor e paciência.

Ao meu marido que desde o início do mestrado quando ainda éramos namorados me incentivou e apoiou de todas as formas possíveis.

À todos os meus amigos e pacientes que aceitaram e ser meus voluntários para este estudo que exigiu sacrifício e dedicação.

Aos colegas de laboratório (Laidson, Patrícia, Cynthia, Diego, Davi, Val, Karine, Raquel, Marina,) que contribuíram para minha formação e para um ambiente de trabalho saudável.

RESUMO

Substâncias com propriedades ergogênicas têm sido propostas para otimizar as adaptações fisiológicas inerentes ao exercício físico de alta intensidade. Recentemente, a ingestão de suco da beterraba, um alimento rico em nitrato (NO_3^-), tem sido proposta para melhorar a perfusão sanguínea, recuperação muscular e, conseqüentemente, o desempenho físico. Isto se deve ao efeito dos nutrientes presentes neste alimento estimula a síntese do óxido nítrico (NO), e promove proteção contra danos oxidativos às células. Existe uma grande procura, não apenas entre atletas de alto rendimento, mas também entre atletas amadores/recreacionais, por nutrientes que promovam melhores resultados no desempenho físico. Quatro formulações de beterraba processadas (suco, chips, pó e beterraba cozida) foram estudadas. O potencial antioxidante total (TAP), teor de compostos fenólicos (TPC), teor de açúcares, ácidos orgânicos e NO_3^- foram determinados, sendo que elevados valores de TAP e ácidos orgânicos foram encontrados na beterraba em pó e cozida, entretanto o suco apresentou o maior teor de açúcares, TPC e NO_3^- . Embora todas as formulações de beterraba podem ser consideradas convenientes e vantajosas, e a escolha dependerá da preferência sensorial, além da conveniência e praticidade e concentração de nutrientes necessárias para atingir as recomendações dietéticas, de acordo com as necessidades nutricionais dos consumidores. O efeito de dose única de uma formulação de beterraba foi estudado sobre a produção de metabólitos indiretos na síntese de NO, parâmetros metabólicos e bioquímicos e desempenho físico em indivíduos fisicamente ativos. Foi avaliada a ingestão de 100 g do gel nutricional à base de beterraba (BET) contendo $9.92 \pm 1.97 \text{ mmol NO}_3^-$. Através de estudo randomizado, duplo cego, cruzado e controlado por placebo, 25 corredores saudáveis ($35,76 \pm 6,6$ anos; $\text{VO}_{2\text{pico}} = 59,21 \pm 7,36 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ingeriram uma única dose do gel nutricional à base de beterraba ou gel placebo à base de maçã (PLA), sendo que as intervenções foram separadas por intervalo de 07 dias. Após a suplementação, os voluntários foram submetidos a um protocolo de exercício aeróbio em esteira ergométrica (3 min de aquecimento a 40% do $\text{VO}_{2\text{pico}}$, 4 min a 90% do limiar de gasto energético I - GET I e, posteriormente, a 70% Δ velocidade máxima final - GET I até a fadiga voluntária. O tempo total do exercício até a fadiga (401.5 ± 164.3 vs. 391.7 ± 176.9 s) e o $\text{VO}_{2\text{pico}}$ (58.89 ± 7.55 vs. $59.48 \pm 7.52 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) não diferiram significativamente entre os tratamentos. Pressão arterial sistólica e diastólica assim como os níveis de cortisol e lactato no sangue também não diferiram significativamente entre os tratamentos suplementado e placebo. Pressão arterial sistólica e diastólica, bem como cortisol e lactato no sangue não diferiram significativamente entre BET e PLA. Os níveis de glicose plasmática foram significativamente menores no tratamento BET nos tempos imediatamente após o exercício (AE) (BET: 100.99 ± 21.79 e PLA: $111.59 \pm 24.25 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$) e 20 minutos após o término do exercício (+20) (BET: 80.74 ± 18.11 e PLA: $93.95 \pm 19.32 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$). Teores de NO_2^- e NO_3^- urinários aumentaram significativamente após 90 min de ingestão do gel BET. A administração de dose única de um gel nutricional à base de beterraba promoveu maior excreção de metabólitos relacionados à síntese do NO, mas não foi capaz de melhorar o desempenho físico de atletas recreacionais submetidos a um exercício aeróbio submáximo.

Palavras chave: beterraba, óxido nítrico, exercício aeróbio, cortisol, nitrato, nitrito

ABSTRACT

Several nutrients with ergogenic properties have been proposed with the aim of optimizing the physiological adaptations inherent to high-intensity exercise. Recently, ingestion of beetroot juice, a food rich in nitrate (NO_3^-), has been proposed to improve blood perfusion, muscle recovery and hence the physical performance. This fact was due to the possible effect of the nutrients present in the food to stimulate the synthesis of nitric oxide (NO), but also provide protection against oxidative cell damage. There is a great demand not only among high-performance athletes, but also among amateur / recreational athletes, for nutrients that could promote better results in physical performance. Four beetroot formulations (juice, chips, powder and cooked beetroot) were evaluated. The total antioxidant potential (TAP), phenolic content (TPC), sugar content, organic acids and NO_3^- were determined. Higher measures of TAP and organic acids contents were observed in cooked and powder beetroot when compared with the other formulations, but BJ presented the highest content of total sugars, TPC and NO_3^- . All beetroot formulations can be found suitable and advantageous, according to the taste preferences and conveniences of consumers and the content of each nutrient required to achieve dietary recommendations. This study investigated the acute effect of the intake of 100 g of a beetroot-based nutritional gel (BET) containing $\sim 9.92 \pm 1.97$ mmol NO_3^- , on the synthesis of indirect metabolites of NO, on metabolic and biochemical parameters and on physical performance in physically active individuals. Through double-blind, crossover, placebo-controlled study, 25 healthy runners (35.76 ± 6.6 years; $\text{VO}_{2\text{peak}} = 59.21 \pm 7.36$ ml $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ min $^{-1}$) ingested a single dose of BET and apple-based nutritional placebo gel (PLA) after 07 days of washout. After supplementation, subjects were submitted to an aerobic exercise protocol (running test) on a treadmill (3 min warm up of 40% $\text{VO}_{2\text{peak}}$, 4 min at 90% of gas exchange threshold I (GET I) and 70% Δ maximal end speed – GET I) until volitional fatigue. The total time of severe exercise (401.5 ± 164.3 vs. 391.7 ± 176.9 sec) and $\text{VO}_{2\text{peak}}$ (58.89 ± 59.48 vs. $7:55 \pm 7:52$ mL $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ min $^{-1}$) did not differ significantly after the treatments. Systolic and diastolic blood pressures as well as blood cortisol and lactate did not differ significantly between BET and PLA. Plasma glucose was significantly lower in the BET treatment in times immediately after the end of the exercise (AE) (BET: 100.99 ± 21.79 and PLA: 111.59 ± 24.25 mg $\cdot$ dL $^{-1}$) and 20 min after the end of exercise (+20) (BET:+20: 80.74 ± 18.11 and PLA: 93.95 ± 19.32 mg $\cdot$ dL $^{-1}$). Urinary levels of NO_2^- and NO_3^- increased significantly after 90 min of BET gel ingestion. A single dose of the beetroot-based nutritional gel promoted higher excretion of metabolites related to the synthesis of NO, than PLA, but was not able to improve physical performance in recreational athletes during an aerobic submaximal exercise.

Key words: beetroot, nitric oxide, aerobic exercise, cortisol, nitrate, nitrite

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1.	FONTES VEGETAIS DE NO_3^- E NO_2^-	17
2.2.	BETERRABA (<i>beta vulgaris</i> L)	19
2.3.	METABOLISMO E FISIOLOGIA DO NO, NO_3^- E NO_2^-	20
2.4.	FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA DO NO_3^- PROVENIENTE DA BETERRABA	22
2.5.	RECURSOS ERGOGÊNICOS DE PRATICANTES DE ATIVIDADES FÍSICAS.....	24
3	OBJETIVOS.....	27
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	ESTUDO ORIGINAL 1	28
5	ESTUDO ORIGINAL 2	35
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO	84
8	REFERÊNCIAS	85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA	Página
1. Teor de NO_3^- em vegetais	18

CAPÍTULO 4

TABELA	Página
1. Modificações nos teores de açúcares entre suco de beterraba (BJ), chips (BC), pós (BP) e beterraba cozida (CB) em $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ em base seca	32
2. Modificações nos teores de ácidos orgânicos entre suco de beterraba (BJ), chips (BC), pós (BP) e beterraba cozida (CB) em $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ em base seca	33

CAPÍTULO 5

TABELA	Página
1. Desempenho físico no teste em esteira: VO_2 e tempo (seg) após intervenção nutricional com géis BET e PLA	65

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

FIGURA	Página
1. Estrutura química, atividade e redução do nitrato ao nitrito	17
2. Representação esquemática sobre a disposição do NO_2^- , NO_3^- e NO fisiológicos e exógenos	21
3. Suposto mecanismo pelo qual o NO_3^- na dieta pode reduzir o custo O_2 de exercício humano	26

CAPÍTULO 4

1. Potencial antioxidante total (TAP) de suco de beterraba (BJ), chips (BC), pó (BP) e beterraba cozida (CB) expressado em percentual	31
2. Compostos fenólicos totais (TPC) de suco de beterraba (BJ), chips (BC), pós (BP) e beterraba cozida (CB) expressados em $\text{GAE mg} \cdot \text{g}^{-1}$	32
3. Teores de nitrato (NO_3^-) em suco de beterraba (BJ), chips (BC), pós (BP) e beterraba cozida (CB) expressados em $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	32

CAPÍTULO 5

FIGURA

Página

1. Resumo do desenho experimental (3ª e 4ª visitas)	59
2. Protocolo de exercício aeróbio agudo em esteira (3ª e 4ª visitas) e exemplo das coletas de VO_2 e VCO_2 de um teste realizado por um voluntário do estudo	60
3. Teor de NO_3^- nos géis BET e PLA	61
4. Teores urinários de: NO_2^- (A) e NO_3^- (B) $\text{mmol} \cdot \text{mmol}^{-1}$ creatinina de PLA e BET em tempos: basal (T0), 60 min após ingestão do gel (T60), antes do exercício (BE), após o exercício (AE) e 20 min após o término do exercício (+20).	62
5. A: glicose no sangue; B: Lactato no sangue; C: Pressão arterial sistólica e D: diastólica nos tempos: basal (T0), 60 min após ingestão do gel (T60), antes do exercício (BE), após o exercício (AE) e 20 min após o término do exercício (+20).	63
6. Teores de cortisol no soro dos tratamentos BET e PLA em basal (T0), após o exercício (AE) e 20 min após o término do exercício (+20).	64

ARQUIVOS SUPLEMENTARES – CAPÍTULO 5

FIGURA	Página
I. Teores totais de carboidratos do gel BET e PLA	73
II. Teores urinários de ureia em BET e PLA	74
III. Quociente respiratório (RQ), borg e frequência cardíaca (HR) em BET e PLA durante teste em esteira nas intensidades: aquecimento, moderado e severo	75
TABELA	Página
A. Características dos participantes no início do estudo	76

LISTA DE ANEXOS

ANEXO	Página
I. Detalhes do projeto para comitê de ética	95
II. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	98
III. Lista de alimentos restritos 24h antes dos dias da intervenção .	102
IV. Formulário de Registro alimentar	104
V. Questionário de caracterização do voluntário	105
VI. Certificado de apresentação de trabalho em evento científico ..	107
VII. Carta de aceite do estudo original 1	108

1. INTRODUÇÃO

O interesse da população atlética pela nutrição esportiva é crescente (AHRENDT, 2001; BURNS et al., 2004; PEREIRA; LAJOLO; HIRSCHBRUCH, 2003). Esta tendência está acompanhada do aumento da procura por intervenções nutricionais voltadas para otimizar as adaptações inerentes à atividade física no intuito de melhorar a recuperação muscular e o desempenho físico (MALINAUSKAS et al., 2007).

Diversas substâncias presentes em suplementos alimentares são comprovadamente ergogênicas, como a creatina, a cafeína, bebidas esportivas e suplementos à base de proteínas e aminoácidos. Entretanto, alguns desses produtos são alvo de possíveis contaminações com substâncias banidas ou não permitidas. Este fato torna o uso desses ergogênicos nutricionais arriscado para atletas de alto rendimento que são submetidos ao exame *antidoping* (RODRIGUEZ; DIMARCO; LANGLEY, 2009). Atletas e praticantes de exercício físico que adotam um estilo de vida saudável estão constantemente à procura de ingredientes específicos e suplementos dietéticos que melhorem a saúde e o desempenho físico, sem correr o risco de consumirem substâncias proibidas ou nocivas à saúde (CLEMENTS; LEE; BLOOMER, 2014).

Recentemente, a ingestão da beterraba, um alimento rico em nitrato (NO_3^-), tem sido proposta para melhorar a perfusão sanguínea, a recuperação muscular e, conseqüentemente, o desempenho físico. Tal fato seria devido ao possível efeito dos nutrientes presentes neste alimento em estimular a síntese do óxido nítrico (NO), como também, promover proteção contra danos oxidativos às células. O NO_3^- ingerido através da dieta pode ser reduzido a NO_2^- na cavidade oral por bactérias anaeróbicas que expressam a enzima nitrato redutase (LUNDBERG et al., 2009; SPIEGELHALDER; EISENBRAND; PREUSSMANN, 1976). O NO_2^- chega ao estômago onde, ao entrar em contato com o ácido gástrico, é decomposto de forma não enzimática a NO e outros óxidos de nitrogênio bioativos (LUNDBERG et al., 2009; LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). Outras formas processadas de beterraba, além do suco, como beterraba cozida, chips, pó, podem ser consideradas formas convenientes e

alternativas do consumo do vegetal na sua forma integral. As informações científicas sobre as alterações nutricionais após processamento de beterraba são limitadas.

Um dos objetivos do presente estudo foi comparar o potencial antioxidante total, os teores de fenólicos totais, NO_3^- , açúcares (glicose, frutose e sacarose) e ácidos orgânicos (ácidos cítrico, málico e ascórbico) entre o suco de beterraba, e as outras formas de beterraba processadas, chips, pó e beterraba cozida.

A melhora do desempenho físico em exercícios aeróbios como ciclismo e corrida, após a ingestão de NO_3^- , em concentrações entre 5 e 16.8 mmol NO_3^- foi descrito por diversos autores (BREESE et al., 2013; LANSLEY et al., 2011; MURPHY et al., 2012; VANHATALO et al., 2010; WYLIE; KELLY; et al., 2013). Entretanto, a maior parte dos resultados positivos no desempenho físico ocorre na chamada suplementação "longo prazo" ou "crônica", 06 dias após o início da suplementação do nitrato dietético proveniente da beterraba (BAILEY et al., 2009; CERMAK; GIBALA; VAN LOON, 2012; LANSLEY et al., 2011; THOMPSON, C. et al., 2015; VANHATALO et al., 2010). A suplementação de única dose com NO_3^- foi descrita em um número reduzido de estudos, sendo que em alguns deles não foi observado efeito sobre o desempenho físico (ARNOLD et al., 2015) (CERMAK; GIBALA; et al., 2012).

A suplementação de longo prazo parece promover mudanças no número de mitocôndrias (LARSEN, F. J. et al., 2011), na contratilidade muscular (HERNÁNDEZ et al., 2012), em proteínas que promoveriam melhora no metabolismo do músculo esquelético e na eficiência mecânica (JAMES et al., 2015). Considerados em conjunto, estes resultados parecem indicar que o NO_3^- é capaz de aumentar a eficiência das vias metabólicas oxidativas ao fornecer substratos energéticos necessários para a contração muscular durante o exercício físico, entretanto os mecanismos fisiológicos e metabólicos em estudos de única dose e de longo prazo ainda não estão completamente esclarecidos.

O presente estudo visa contribuir para esclarecer os efeitos bioquímicos, metabólicos e sobre o desempenho físico resultantes da ingestão do NO_3^- , avaliando o efeito desta estratégia nutricional à prática do esporte de alto rendimento.

HIPÓTESE

A hipótese que embasa o estudo é que a ingestão do gel preparado à base de beterraba (BET), fonte de NO_3^- , promoverá um efeito agudo sobre a produção sistêmica de óxido nítrico (NO) o que se refletirá na melhora nos parâmetros metabólicos e bioquímicos e no desempenho físico de corredores submetidos a um protocolo de exercício aeróbio (teste de corrida em esteira ergométrica).

JUSTIFICATIVA

Este estudo visa identificar uma nova estratégia nutricional aplicável à prática do esporte de alto rendimento, avaliando a ingestão aguda do gel preparado à base de beterraba e seus efeitos em melhorar parâmetros bioquímicos e fisiológicos que são alterados por exercício físico intenso. Além disso, espera-se contribuir para o avanço científico, tecnológico e de inovação na prática de atividade física no país.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – FONTES DE NO_3^- E NO_2^-

Nitrato e nitrito possuem estruturas iônicas simples e são produzidos endogenamente, além de estarem presentes na dieta. O nitrato e o nitrito são sais de ácido nítrico e ácido nitroso respectivamente. (OMAR; ARTIME; WEBB, 2012).

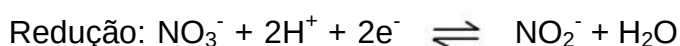


Figura 1. Estrutura química, atividade e redução do nitrato ao nitrito.

O primeiro uso conhecido do nitrato, na forma de nitrato de sódio ou de potássio, foi como conservantes de carnes tem a habilidade de prevenir o crescimento de esporos de *Clostridium botulinum* (SHAHIDI; PEGG, 1992). Além disso, o nitrato tem a capacidade de promover uma coloração rósea tornando as carnes mais atrativas aos consumidores.

Em regiões frias e temperadas os vegetais crescem sob condições de baixa intensidade de luz como estufas, nestes casos os níveis de nitrato nos vegetais são mais elevados do que em regiões nas quais os vegetais são cultivados sob condições naturais com a luz solar (BENFORD et al., 2008; STEINGROVER; STEENHUIZEN; VAN DER BOON, 1993). Nitratos e nitritos podem ser encontrados em solos, vegetais, frutas, plantas em decomposição, esterco, água de abastecimento e em outros resíduos orgânicos. Além disso, são utilizados como ingredientes de fertilizantes. O nitrato complementa o nitrogênio, nutriente fundamental para o desenvolvimento das plantas (CIESLIK; SIKORA, 1998; KREUTZ et al., 2014).

Em um estudo brasileiro foi mostrado que em alguns vegetais como beterraba (*Beta vulgaris* L. var catrine), cenoura (*Daucus carota* L. var brasilia), espinafre (*Spinacea oleracea* L. var nova zelândia) e repolho (*Brassica oleracea* L. var capitata) os níveis de nitrato e nitrito são superiores naqueles de cultivo convencional em relação ao orgânico (KREUTZ et al., 2014). A divergência entre os teores de NO_3^- encontrados na literatura, deve-se a fatores como diferentes metodologias de análise, condições de solo e cultivo, exposição ao sol, umidade, temperatura e técnica de cultivo (orgânica ou convencional) (KREUTZ et al., 2014; LIDDER; WEBB, 2013; WHITE, 1975).

A tabela 1 mostra os teores de nitrato em vegetais (LIDDER; WEBB, 2013)

Tabela 1. Teor de NO_3^- em vegetais

Alto teor	mg · 100g⁻¹
rúcula	259,63
espinafre	213,90
alface	189,10
rabanete	186,78
<u>beterraba</u>	<u>145,70</u>
repolho chinês	138,73
Médio teor	mg · 100g⁻¹
nabo	62,00
repolho	51,15
vagem	49,60
alho poró	39,53
cebolinha	35,65
pepino	24,03
cenoura	22,48
batata	21,70
alho	18,60
pimentão amarelo e vermelho	11,63
pimentão verde	10,85
Baixo teor	mg · 100g⁻¹
cebola	8,53
tomate	6,98

* Lidder & Webb, Br J Clin Pharmacol. 2013.

Em 1962 a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu um limite máximo para o consumo de NO_3^- de alimentos. A recomendação diária aceitável é de 3,7 mg de $\text{NO}_3^- \cdot \text{kg}^{-1}$, o mesmo valor que é adotado pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos. Para um adulto com 70 kg, a recomendação equivale a $\sim 260 \text{ mg} \cdot \text{dia}^{-1}$ (BENFORD et al., 2008; KATAN, 2009 ; WHO 1995).

Em 1979, o NaNO_2^- foi associado ao aparecimento de neoplasias em ratos devido à formação de N-nitrosaminas, e, desde então a ingestão de nitrito de sódio é controlada em vários países (NEWBERNE, 1979). Atualmente estudos classificam como fracas as evidências experimentais em relação a seres humanos, questionando essas restrições e reforçando os benefícios do consumo de vegetais e frutas ricos em nitrato (GILCHRIST; WINYARD; BENJAMIN, 2010; MILKOWSKI et al., 2010).

2.2 – BETERRABA (*Beta vulgaris* L.)

A beterraba (*Beta vulgaris* L.) é um tubérculo da família *Quenopodiaceae* e possui uma coloração vermelho arroxeada devido principalmente à presença de pigmentos chamados de betalaínas (LANGE; BRANDENBURG; BOCK, 1999; VITTI et al., 2003). No ocidente, a beterraba é consumida geralmente cozida (NINFALI; ANGELINO, 2013). Este vegetal representa uma fonte renovável e barata de nutrientes, como carboidratos, e minerais, como potássio e magnésio. Conforme dados da *United States Department of Agriculture*, 100 g de beterraba crua contém 1,61 g de proteínas, 0,17 g de lipídios, 9,56 g de carboidratos e 2,8 g de fibra alimentar, e tem valor energético de 43 kcal (USDA).

A beterraba é uma fonte rica em diversos compostos polifenóis (WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011) e NO_3^- (HORD; TANG; BRYAN, 2009). A beterraba contém predominantemente pigmentos chamados betalaínas, como vulgaxantina I, vulgaxantina II, indicaxantina, betanina, prebetanina, isobetanina e neobetanina que possuem efeito antioxidante e um pool de compostos fenólicos, que incluem os ácidos fenólicos, flavonóides e ácidos orgânicos e inorgânicos (KUJALA et al., 2000; LANGE

et al., 1999). Além disso, a beterraba contém ácido ascórbico, o que contribui para a capacidade antioxidante total (Vasconcellos et al 2016).

2.3 – METABOLISMO E FISIOLOGIA DO NO, NO₃⁻ E NO₂⁻

O NO₃⁻ e NO₂⁻ podem ser provenientes de fontes exógenas ou endógenas. A formação endógena do NO₃⁻ e NO₂⁻ ocorre através do metabolismo do NO.

A produção endógena de NO ocorre através da via L-arginina/NO, na qual o organismo catalisa a formação NO e L-citrulina a partir do substrato L-arginina, de forma dependente da ação de um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) e outros co-fatores enzimáticos (Stuehr et al., 1985; Moncada et al., 1993; Siasos et al., 2006).

NO é uma molécula pequena, de baixo peso molecular, gasosa e altamente reativa e capaz de realizar interações com hemoproteínas, como a hemoglobina. Além de ser um potente vasodilatador endógeno, o NO possui um papel de sinalização celular, citoproteção em patologias como na inflamação, trombose e imunidade, regulação do fluxo sanguíneo, contração muscular, diferenciação de miócitos, respiração celular e homeostase de glicose (LUNDBERG et al., 2008).

O NO formado é extremamente lábil e na presença de O₂ é oxidado, em segundos, a NO₃⁻ e NO₂⁻ (ARCHER, 1993; KIECHLE; MALINSKI, 1993; NATHAN, 1992; STAMLER; MEISSNER, 2001). O O₂ é um regulador do metabolismo do NO₂⁻ nos tecidos e na conversão deste a NO e NO₃⁻. Em hipóxia ou baixas concentrações de O₂, quando o funcionamento da NOS está prejudicado, o NO₂⁻ é reduzido predominantemente a NO e em concentrações fisiológicas de O₂, o NO₂⁻ se converte a NO₃⁻ em maior proporção (CURTIS et al., 2012).

O NO₃⁻ e NO₂⁻ provenientes de fontes alimentares podem estimular a síntese do óxido nítrico NO por diversas vias. A síntese endógena do NO a partir de NO₃⁻ e o NO₂⁻ dietéticos tem sido alvo de vários estudos.

A redução do NO_3^- a NO_2^- em humanos, ocorre quase que exclusivamente na boca, no terço posterior da língua, onde bactérias comensais Gram negativas como *Actinomyces sp*, *Rothia sp* e *Staphylococcus epidermidis*, que expressam a enzima nitrato redutase, realizam a conversão (DUNCAN et al., 1995; SPIEGELHALDER et al., 1976). Apesar da conversão de NO_3^- a NO_2^- se iniciar ao primeiro contato do alimento rico em NO_3^- com a língua, antes mesmo deste ser deglutido, a maior parte da redução a NO_2^- ocorre algumas horas depois da ingestão do alimento via circulação enterosalivar (AFFOURTIT et al., 2015; HORD, 2011; LUNDBERG et al., 2008)

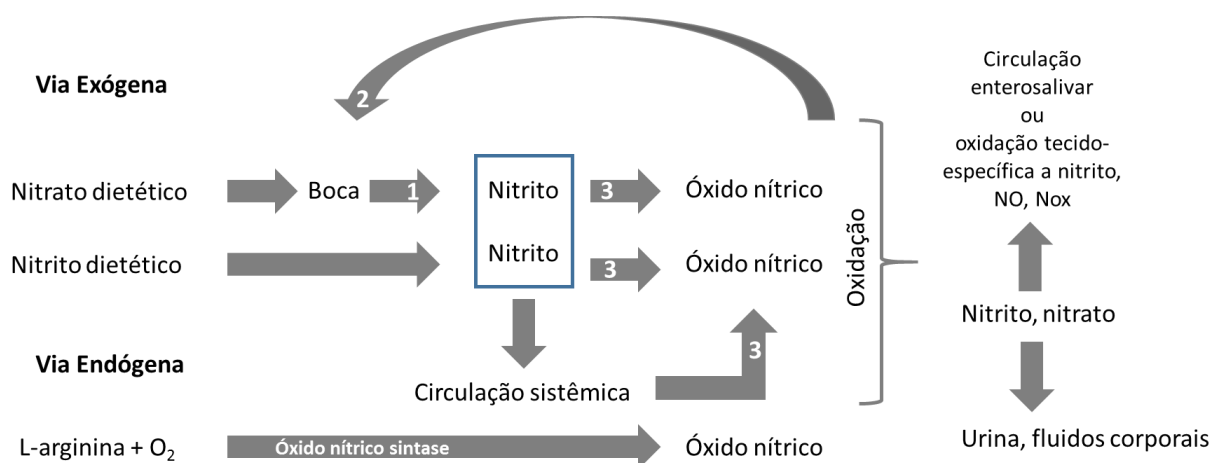
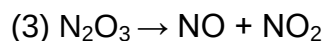
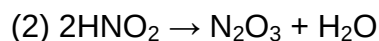


Figura 2. Representação esquemática sobre a disposição do NO_2^- , NO_3^- e NO fisiológicos e exógenos (provenientes da dieta): 1. Ação da nitrato redutase bacteriana na língua e enzimas de mamíferos que têm atividade da nitrato redutase em tecidos; 2. nitrato redutase bacteriana; 3. enzimas de mamíferos com atividade de nitrito redutase (HORD, 2011).

Estudo com a ingestão oral de nitrato de sódio mostrou que esta conversão contribuiu de forma expressiva para o aumento nas concentrações plasmáticas de NO_2^- , e que o uso de antisséptico bucal pode inibir, ao menos em parte, esta conversão (GOVONI et al., 2008).

O NO_3^- dietético é absorvido no trato gastrointestinal superior (WAGNER et al., 1983). No estômago uma parte do NO_2^- reage com o ácido gástrico produzindo ácido nitroso que se decompõe em óxido nítrico e em outras espécies reativas de óxidos de

nitrogênio, a outra parte é absorvida para entrar na circulação plasmática elevando a concentração de NO_2^- (BENJAMIN et al., 1994; MCKNIGHT et al., 1997). As reações de Benjamin et al., (1994), mostram a formação de outras espécies de óxidos de nitrogênio:



Reações adicionais entre nitrito e vitamina C ou polifenóis no estômago também produzem NO (GAGO et al., 2007).

A excreção da maior parte do nitrato ingerido (~65-75%) é feita pelos rins (BARTHOLOMEW; HILL, 1984; GREEN et al., 1981; LIDDER; WEBB, 2013; WAGNER et al., 1983)

2.4 – FARMACONINÉTICA E FARMACODINÂMICA DO NITRATO PROVENIENTE DA BETERRABA

As concentrações sistêmicas de NO_3^- e NO_2^- são importantes para a interpretação dos efeitos biológicos do suco de beterraba. A administração de suco de beterraba, rico em NO_3^- , tem se mostrado efetiva para promover um aumento das concentrações plasmáticas e urinárias deste ânion e também de NO_2^- (KAPIL, VIKAS et al., 2015; KAPIL, VIKAS et al., 2010; KAPIL, V; WEBB; AHLUWALIA, 2010; WEBB et al., 2008; WYLIE et al., 2013).

Os efeitos da administração de suco de beterraba foram avaliados em porções que variaram de 70 mL a 750 mL, com teor de NO_3^- entre 4,2 e 9,3 mmol NO_3^- (LIDDER; WEBB, 2013). Em um estudo recente de dose-resposta, WYLIE; KELLY; et al. (2013) a farmacocinética do NO_2^- e NO_3^- foi avaliada no plasma e as alterações sobre a pressão arterial após ingestão de suco de beterraba rico em NO_3^- . O estudo supracitado demonstrou que o pico plasmático de NO_3^- ocorreu 1 h após a administração das doses

de 4,2 e 8,4 mmol⁻¹ NO₃⁻, já a dose de 16,8 mmol NO₃⁻ obteve o pico 2 horas após a sua ingestão (WYLIE et al., 2013). Em relação às concentrações plasmáticas de NO₂⁻, a dose 4,2 mmol de NO₃⁻, promoveu pico após 2 horas e as outras doses (8,4 e 16,8 mmol NO₃⁻) obtiveram o pico 4 h após a administração (WYLIE et al., 2013).

A principal contribuição deste estudo foi esclarecer que as concentrações plasmáticas de NO₃⁻ e NO₂⁻ aumentam dose-dependentemente até 16,8 mmol NO₃⁻ e que a dose de 8.4 mmol de NO₃⁻ foi apontada como a dose para promover redução na pressão arterial (WYLIE; KELLY; et al., 2013).

WEBB et al. (2008) utilizaram suco de beterraba contendo 45.0±2.6 mmol·l⁻¹ NO₃⁻ (2.79 g·l⁻¹) e as concentrações de nitrato após a ingestão do suco aumentaram rapidamente (30 min) com pico em 1,5 h. Em contraste, as concentrações de NO₂⁻ obtiveram um pico de 2,5 a 3 h. Até 25% da ingestão de NO₃⁻ que entra na circulação enterosalivar fica concentrado na saliva, aonde bactérias anaeróbicas facultativas da cavidade oral irão reduzir a NO₂⁻. (LUNDBERG; GOVONI, 2004; SPIEGELHALDER et al., 1976).

BAIÃO et al. (2015) et al., (2015) verificaram aumento de NO₂⁻ e NO₃⁻ urinário em indivíduos saudáveis que ingeriram uma única dose de 100 mL de suco de beterraba com aproximadamente ~ 1,7 mmol NO₃⁻).

Estudo com indivíduos hipertensos sobre os teores de NO₂⁻ e NO₃⁻ no plasma, urina e saliva, mostrou que os níveis desses ânions foram similares em todos os fluidos biológicos, avaliados após a ingestão de 250 mL de suco de beterraba contendo ~6,4 mmol NO₃⁻ por 4 semanas (KAPIL, VIKAS et al., 2015).

O NO₃⁻ urinário atinge o máximo de sua concentração em 4-6 horas após a ingestão de uma fonte alimentar como a beterraba e retorna ao valor de base no intervalo de 24h. Aproximadamente 65-70% da dose de nitrato é excretada na urina em 24h e menos do que 1% é excretada nas fezes; o restante da dose é secretado no suor ou é degradado na saliva ou outras secreções digestivas por ação bacteriana (BARTHOLOMEW; HILL, 1984; LIDDER; WEBB, 2013).

2.5 – RECURSOS ERGOGÊNICOS DE PRATICANTES DE EXERCÍCIO FÍSICO

Atletas amadores e profissionais vem aumentando seu interesse pela nutrição esportiva nos últimos anos, suplementos e alimentos que aumentam a capacidade aeróbia são os mais procurados pelos corredores. Diversas substâncias presentes em suplementos alimentares são comprovadamente ergogênicas, como a creatina, a cafeína, bebidas esportivas e suplementos a base de proteínas e aminoácidos. Os carboidratos na forma de géis, bebidas e alimentos são os recursos mais comumente utilizados e diversos estudos comprovam sua capacidade de melhorar o desempenho esportivo. Entretanto, alguns desses produtos são alvo de possíveis contaminações com substâncias banidas ou não permitidas. Este fato tornou o uso desses recursos ergogênicos arriscado para atletas de alto rendimento que são submetidos ao exame *antidoping* durante as competições esportivas (AHRENDT, 2001; RODRIGUEZ et al., 2009).

Conforme posicionamento da ADA (*American Dietetic Association*), *Dietitians of Canada*, e do ACSM (*American College of Sports Medicine*), as normas específicas para substâncias nutricionais ergogênicas são mal aplicadas, e suplementos devem ser usados com cautela e após uma avaliação cuidadosa do produto quanto à sua segurança, eficácia e legalidade (RODRIGUEZ et al., 2009).

Dois estudos realizados mostraram que a suplementação de NaNO_3 em indivíduos treinados resultaram em efeitos positivos no desempenho físico como a redução do $\text{VO}_{2\text{máx}}$ durante exercício máximo e o aumento do tempo até alcançar a fadiga em ciclo ergômetro (LARSEN, F. et al., 2007; LARSEN, F. J. et al., 2010). Resultados similares aos do NaNO_3 foram observados com a ingestão do suco da beterraba rico em NO_3^- . LANSLEY et al. (2011) observaram redução do consumo de O_2 e aumento do tempo de exercício até a fadiga, após a ingestão de 500 mL do suco da beterraba ofertado por 6 dias aos voluntários antes do exercício. Neste estudo foi utilizado como placebo suco de beterraba depletado em NO_3^- , permitindo relacionar os benefícios observados ao teor de NO_3^- presente no suco de beterraba. MURPHY et al. (2012) observaram melhora significativa na performance (avaliada através da

velocidade da corrida) e menor percepção de esforço durante o exercício em esteira ergométrica, após o consumo de 200 g de beterraba cozida.

Um estudo com duração de 15 dias mostrou que a ingestão de suco de beterraba contendo 5,2 mmol NO_3^- por dia promoveu redução do consumo de O_2 durante exercício submáximo durante exercício em ciclo ergômetro, além da redução da pressão arterial (VANHATALO et al., 2010).

BREESE et al. (2013) observou que a ingestão de 140 mL de suco por seis dias em nove atletas saudáveis resultou em aumento da tolerância ao exercício de alta intensidade em ciclo ergômetro. A suplementação de longo prazo, em período superior a 6 dias, parece promover aumento no número de mitocôndrias (LARSEN, F. J. et al., 2011), na contratilidade muscular (HERNÁNDEZ et al., 2012), mudanças em proteínas que podem promover melhora no metabolismo muscular esquelético e na eficiência mecânica, como observado na figura 3 (JAMES et al., 2015).

Durante o exercício físico, o débito cardíaco aumenta e o sangue é redistribuído para os músculos ativos. Este ajuste provoca o aumento da oferta de oxigênio para suportar o déficit transiente de O_2 no início do exercício físico.

A possibilidade de que a ingestão do NO_3^- proveniente da ingestão do suco da beterraba possa modular a produção do NO e, conseqüentemente, aumentar a perfusão sanguínea aos tecidos, é de grande interesse por parte de praticantes de atividades físicas aeróbias, pois significa que a produção aeróbia de ATP seja ativada mais rapidamente.

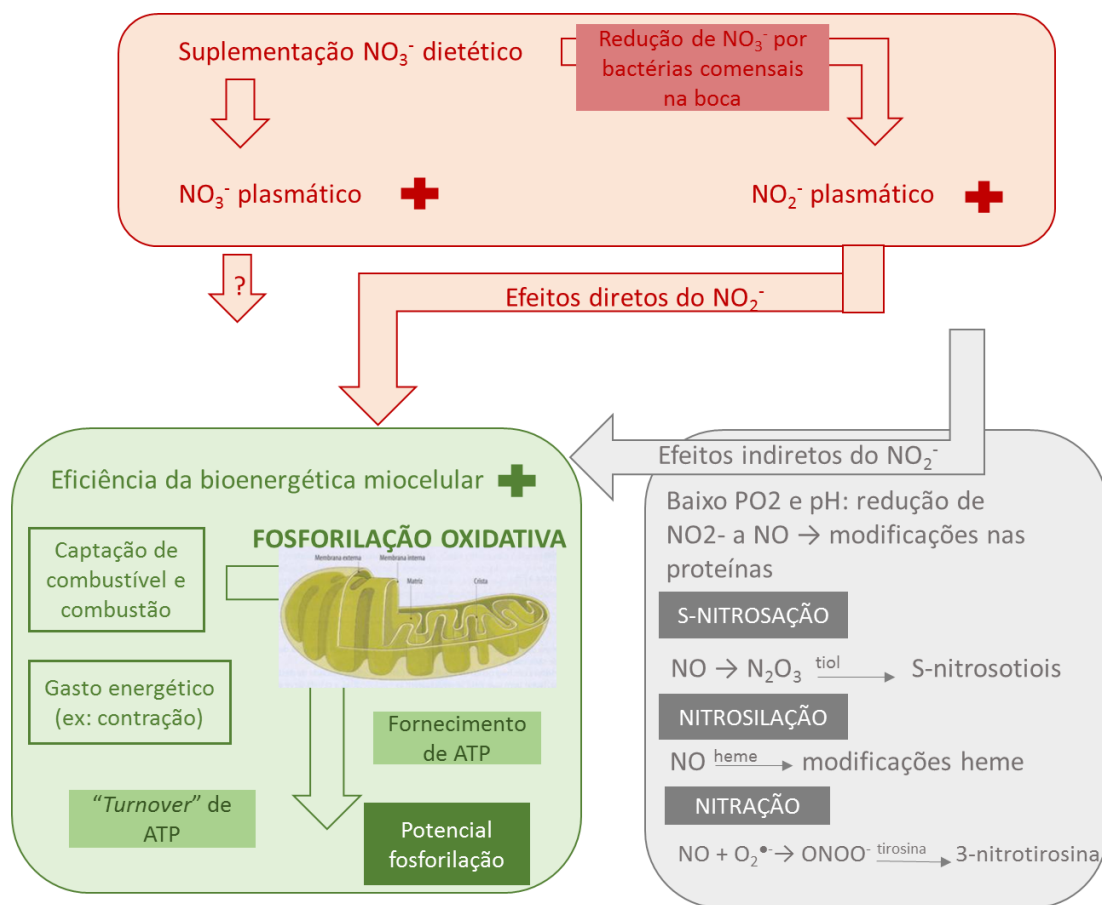


Figura 3. Suposto mecanismo pelo qual o NO_3^- na dieta pode reduzir o custo O_2 de exercício humano (AFFOURTIT et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1– OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito agudo da ingestão de um gel preparado à base de beterraba (fonte de NO_3^-) sobre a produção sistêmica de óxido nítrico (NO), sobre parâmetros metabólicos e bioquímicos e sobre o desempenho físico em indivíduos submetidos a exercício aeróbio.

3.2– OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (1) Comparar o potencial antioxidante total e fenólicos totais, teor de açúcares, ácidos orgânicos e NO_3^- entre suco de beterraba (BJ), chips (BC), pó (BP) e beterraba cozida (CB);
- (2) Desenvolver o gel BET com teor de NO_3^- adequado para a população atlética;
- (3) Desenvolver o gel PLA pobre em NO_3^- e com características semelhantes ao gel BET;
- (4) Avaliar a capacidade aeróbia máxima dos voluntários através do consumo máximo de oxigênio ($\text{VO}_{2\text{pico}}$) antes da intervenção nutricional;
- (5) Quantificar a produção sistêmica do NO através do seu indicador indireto (NO_2^-) na urina, antes e após a intervenção nutricional e exercício aeróbio;
- (6) Avaliar o desempenho aeróbio físico dos voluntários, após a intervenção nutricional e exercício aeróbio;
- (7) Avaliar se há correlação entre a produção de NO na urina e a pressão arterial;
- (8) Avaliar marcadores metabólicos e bioquímicos no sangue e urina após intervenção nutricional e exercício aeróbio.

4. ESTUDO ORIGINAL 1

Estudo Original: Comparison of Total Antioxidant Potential, and Total Phenolic, Nitrate, Sugar, and Organic Acid Contents in Beetroot Juice, Chips, Powder, and Cooked Beetroot

Referência publicação. Food Sci. Biotechnol. 25(1): 1-6 (2016)



Comparison of Total Antioxidant Potential, and Total Phenolic, Nitrate, Sugar, and Organic Acid Contents in Beetroot Juice, Chips, Powder, and Cooked Beetroot

Julia Vasconcellos¹, Carlos Conte-Junior², Davi Silva¹, Anna Paola Pierucci³, Vania Paschoalin¹, and Thiago Silveira Alvares^{1,4,*}

¹Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-909, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

²Department of Food Technology, Fluminense Federal University, 24230-340, Niterói-RJ, Brazil

³Nutrition Institute, Department of Basic Nutrition and Experimental, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-090, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

⁴Nutrition Institute, Nucleus of Basic Nutrition and Dietetics, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-909, Rio de Janeiro, Brazil

Received May 18, 2015

Revised August 22, 2015

Accepted September 10, 2015

Published online February 29, 2016

*Corresponding Author

Tel: +55-22-2759-3431

Fax: +55-21-2562-7266

E-mail: alvares@macae.ufrrj.br

pISSN 1226-7708

eISSN 2092-6456

© KoSFoST and Springer 2016

Abstract Beetroot is a vegetable rich in nitrate (NO_3^-), antioxidants and phenolic compounds that are related to improvements in cardiovascular function and exercise performance. However, it is unknown if convenient forms of beetroot administration provide different amounts of these nutrients. The total antioxidant potential (TAP), total phenolic (TPC), sugar, organic acid, and NO_3^- contents of beetroot juice (BJ), chips (BC), powder (BP), and cooked beetroot (CB) were compared. Significant ($p < 0.01$) differences in chemical compositions and functional properties were found between beetroot formulations. Higher amounts of TAP and organic acids were observed in BC and BP, compared with the other formulations. BJ exhibited the highest contents of total sugars, TPC, and NO_3^- . All beetroot formulations were suitable and advantageous based on taste preferences and convenience for consumers and for nutrient amounts required to meet dietary recommendations.

Keywords: vegetable, antioxidant, beetroot, drying method

Introduction

Consumption of vegetables has been associated with reduced risks of cancer, type 2 diabetes mellitus, hypertension, coronary heart disease, and stroke (1,2). Great interest has developed in consumption of antioxidants from foods in order to balance the level of free radical production for normal cell function. There is now considerable interest in elucidation of potential antioxidant and phenolic compounds of foods. Furthermore, consumption of nitrate-rich vegetables (NO_3^-) has been proposed for enhancement of cardiovascular function (3).

Beta vulgaris L., or beetroot, is a vegetable of the *Chenopodiaceae* family that is widely consumed in traditional western cooking (4). This vegetable represents a renewable and cheap source of nutrients, like carbohydrates (5). However, specific interest in beetroot has arisen due to the fact that it is a rich source of a number of polyphenolic compounds (6,7) and NO_3^- (3).

Beetroot contains pigments called betalains that are composed of vulgaxanthin I, vulgaxanthin II, indicaxanthin, betanin, prebetanin, isobetanin, and neobetanin, and a pool of phenolic compounds that includes phenolic acids, flavonoids, and organic and inorganic acids

(4,8). Furthermore, beetroot also contains smaller amounts of other compounds, such as ascorbic acid, which may further increase the total antioxidant capacity. Previous studies have demonstrated the potential antioxidant effect of betalains (9) and their bioavailability in humans (10). The results of these studies have indicated important information for stimulation of people to consume foods such as beetroot that are rich in betalain as a nutritional strategy to provide protection against oxidative stress-related disorders.

Recently, consumption of NO_3^- rich beetroot juice has been proposed for enhancement of blood perfusion (10), restoration of endothelial function (11), and improvement in exercise performance (12,13). These properties may be due to the effect of NO_3^- present in beetroot juice for stimulation of endogenous synthesis of nitric oxide (NO).

Drinking beetroot juice and eating beetroot chips and/or beetroot powder can provide a convenient and alternative source in place of consumption of the whole vegetable. Limited scientific information is available concerning nutritional aspects of different forms of beetroot. This study was carried out to compare the total antioxidant potentials and total phenolic, NO_3^- , sugar (glucose, fructose, and sucrose) and organic acid (citric, malic, and ascorbic acids) contents

of beetroot juice, chips, powder, and cooked beetroot.

Materials and Methods

Samples All beetroots used in this study were *Beta vulgaris* L., Family *Chenopodiaceae*. Conventional beetroot was acquired in the city of Rio de Janeiro in Southeastern of Brazil (22°54'S 43°10'W) between March-April of 2013. Each beetroot formulation (beetroot juice-BJ, beetroot chips-BC, Beetroot powder-BP and cooked beetroot-CB) was subjected to 3 extraction trials with subsequent analysis in triplicate.

Beetroot juice (BJ) Beetroots were thoroughly washed in tap water, sanitized using a chlorine solution (0.5%), and processed in a centrifuge blender (Model CE700; Black & Decker®, Uberaba, Brazil). The resulting juice had a 91.55±0.75% moisture content without any chemical additives.

Beetroot chips (BC) Beetroots were sliced (3-8 cm wide and 2-4 mm thick), frozen at -20°C for 48 h, and subsequently freeze-dried (Model Liotop P1040; Liobras, Sao Carlos, Brazil). The final product had an 11.4±0.68% moisture content. For BC analysis, freeze-dried samples were crushed in a portable blender (Pratic® Cadence, Navegantes, Brazil), weighed, and diluted.

Beetroot powder (BP) Beetroot powder was obtained from BJ as described above. BJ was dried in a Mini Spray Dryer (Model Büchi 190; Büchi Laboratoriums Technik AG, Flawil, Switzerland) at respective inlet and outlet temperatures of 180 and 65±3°C with a 0.7 mm nozzle and a 6 mL/min feed. Powder was collected and stored in a desiccator until analysis. The final product had a 3.67±0.87% moisture content without any chemical additives. BP samples were weighed and diluted prior to analysis.

Cooked beetroot (CB) Beetroots were peeled and boiled at 100°C for 40 min in a 10 L pot in approximately 6 L of distilled and deionized water. After boiling, beetroots were sliced. Cooked beetroot had a 90.67±0.50% moisture content. Beetroots were put into a juice extractor (Model CE700; Black & Decker®) and processed into juice for further analysis.

Total antioxidant potential (TAP) analysis Beetroot samples (1 g of dry weight) from each formulation were vortexed (Phoenix®, Araraquare, Brazil) with 9 mL of deionized water and centrifuged at 4,500×g for 10 min at 4°C. Supernatants were filtered throughout a 0.45 µm cellulose membrane filter (MF Millipore®, Darmstadt, Germany) and the resulting filtered beetroot samples were transferred to amber vials and stored at -80°C prior to testing. TAP analysis was performed using HPLC following the method of Glód *et al.* (14). The injection volume was 20 µL and the HPLC system was equipped with

a 5 µm reversed-phase C18 column (Kromasil®, Bohus, Sweden) (250 ×4.6 mm, I.D.) and a fluorescence detector (Model RF-10AXL; Shimadzu®, Kyoto, Japan) monitoring excitation and emission at respective wavelengths of 312 and 428 nm. The mobile phase at 1.0 mL/min was a 100 mM sodium phosphate buffer at pH 6.6. The TAP value was obtained based on a percentage difference as (15):

$$\text{TAP (\%)} = \left[\frac{(S_{\text{HTPA}}^0 - S_{\text{HTPA}})}{S_{\text{HTPA}}^0} \right] \cdot 100$$

where S_{HTPA} is the surface area of the chromatogram generated via a Fenton reaction (14) with the beetroot sample, and S_{HTPA}^0 is the surface area of the chromatogram generated via a Fenton reaction without a beetroot sample. Results were expressed as TAP (%).

Total phenolic content (TPC) analysis TPC analysis was performed as described previously by Sánchez-Rangel *et al.* (16). Beetroot samples (1 g of dry weight for each formulation) were homogenized in 20 mL of 100% methanol (17) by vortexing (Phoenix®) and centrifuged at 10,000×g for 15 min at 4°C. Absorbance values at 765 nm were determined using an Asys UVM340 microplate reader spectrophotometer (Biochrom, Holliston, MA, USA). Absorbance values were compared to a gallic acid standard curve and results were expressed as gallic acid equivalents (GAE) mg·g⁻¹ on a dry weight basis.

Nitrate (NO₃⁻) analysis Beetroot samples were dissolved, diluted, centrifuged, filtered, and stocked following the above mentioned method for TAP analysis. Prior to analysis, a further dilution of 1:800 was performed. NO₃⁻ analysis was performed using HPLC as described previously by Alvares *et al.* (18) with modification of the sample preparation procedure described above for TAP analysis. NO₃⁻ was converted to nitrite (NO₂⁻) enzymatically using nitrate reductase EC 1.6.6.2 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) from *Aspergillus spp.* with filtered beetroot samples. After conversion, 100 µL of the filtered beetroot sample was incubated at 24°C with 10 µL of 316 mM of 2,3-diaminonaphthalene (DAN) in 0.62 M HCl for 10 min, followed by addition of 5 µL of 2.8 M NaOH and immediately subjected to HPLC analysis. The HPLC device was equipped with a 5 µm reversed-phase C8 column (Discovery®, Bellefonte, PA, USA) (150×4.6 mm, I.D.) with a 5 µm reversed-phase C18 guard column (Ascentis®, Bellefonte, PA, USA) (50×4.6 mm, I.D.) and a fluorescence detector (Model RF-10AXL; Shimadzu®) monitoring respective excitation and emission wavelengths at 375 nm and 415 nm. The mobile phase at 1.3 mL/min was a 15 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) and methanol (50:50, v/v). Results were expressed as mg·kg⁻¹ of NO₃⁻ on a dry weight basis.

Sugar analysis Beetroot sample dissolution, dilution, homogenization, centrifugation, filtration, and storage were performed as described above for TAP analysis. Sucrose, fructose, and glucose analyses were performed as described previously by Hernández *et al.* (19), with modification of the method flow, mobile phase, and temperature as

cited below. A volume of 20 μL of each filtered beetroot sample was used and analysis was performed using an HPLC system equipped with a 5 μm carbohydrate analytical column (Prevail®, Deerfield, IL, USA) (250x4.6 mm, I.D.) with a 5 μm guard column (Prevail®) (7.5x4.6 mm, ID) and an evaporative light scattering detector (Model LT II; Shimadzu®) at 40°C. The mobile phase at 1.1 mL/min was acetonitrile and water (75:25, v/v) for isocratic elution. Results were expressed as $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ on a dry weight basis.

Organic acid (OA) analysis Beetroot samples were dissolved or diluted, homogenized, centrifuged, and stored as performed above for TAP analysis. Organic acid (OA) analysis was performed as previously described by Bavec *et al.* (20) for citric, malic, and ascorbic acids. A volume of 20 μL of each filtered beetroot sample was analyzed using an HPLC system equipped with an HPX-87H Aminex fermentation monitoring column (Bio-Rad Laboratories Inc®, Hercules, CA, USA) (150x7.8 mm, I.D.), a cation H^+ Micro-Guard column (Bio-Rad) (30x4.6 mm, I.D.), and a photodiode array detector (Model SPD-M20A; Shimadzu®) monitoring absorbance at 210 nm. The mobile phase at 0.6 mL/min was 4 mM sulfuric acid for isocratic elution. Results were expressed as $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ on a dry weight basis.

Total solids analysis Total solids analysis in juice was performed using by using an infrared moisture analyzer (MA35M; Sartorius®, Goettingen, Germany) (21).

Data analysis A one-way analysis of variance (ANOVA) was used for identification of differences in TAP, TPC, NO_3^- , and sugar and organic acid contents between BJ, BC, BP, and CB. When a significant F value was found, additional post-hoc tests with Bonferroni adjustment were performed. Statistical significance was set at the $p<0.01$. Values were expressed as a mean $\pm$ standard deviation (SD). All analyses were performed using the commercially available statistical package IBM SPSS® Statistics version 22 for Mac (Chicago, IL, USA).

Results and Discussion

Total antioxidant potential (TAP) TAP values of BC, BP, CB, and BJ are shown in Fig. 1. Significantly ($p<0.01$) higher values were found for BC ($95.70\pm0.53\%$) and BP ($95.31\pm0.68\%$) than for CB ($85.79\pm0.61\%$) and BJ ($80.48\pm0.25\%$). There was no significant ($p>0.01$) difference between BC and BP. Higher TAP (%) values for BP and BC were related to drying of those formulations that removed water, thereby concentrating nutrients (22). Drying probably increased antioxidant activities due to concentration of bioactive molecules in the food matrix without large loss. TAP (%) differences between different beetroot formulations may also have been related to high levels of ascorbic and citric organic acids with antioxidant activities (23,24). Some betalain antioxidants can be effectively stabilized by ascorbic

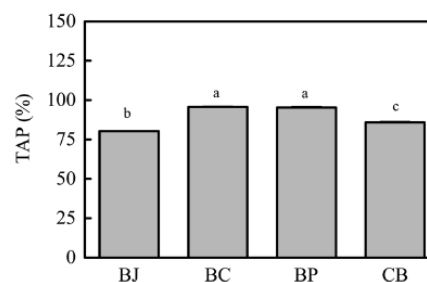


Fig. 1. Total antioxidant potential (TAP) of beetroot juice (BJ), beetroot chips (BC), beetroot powder (BP), and cooked beetroot (CB) expressed as a percentage. Values are presented as a mean $\pm$ SD. Different letters indicate significance at $p<0.01$.

acid (25), and in BC and BP formulations high contents of ascorbic acid may have contributed to an increase in TAP (%) values.

A study conducted by Figiel *et al.* (26) demonstrated a greater antioxidant potential of raw beetroots in comparison with freeze dried beetroots. Jiménez-Monreal *et al.* (27) found no significant losses in the TAP (%) value when comparing CB and raw beetroots. In this study, TAP values of CB were compared with processed beetroots and not with natural, unprocessed vegetables, as was done previously. Amongst the formulations evaluated here, CB and BP were both processed using heat treatment. BC exhibited high TAP (%) values with no difference between BP and BJ. Therefore, beetroot TAP should be further studied before and after processing.

Total phenolic content (TPC) TPC values for BC, BP, CB, and BJ are shown in Fig. 2. BJ ($3.67\pm0.61\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) and CB ($2.79\pm0.23\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) exhibited significantly ($p<0.01$) higher TPC values than BC ($0.75\pm0.06\text{ GAE mg}\cdot\text{g}^{-1}$) and BP ($0.51\pm0.07\text{ GAE mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

No significant ($p>0.01$) difference in TPC values between BC and BP was observed (Fig. 2). The BC and BP forms of beetroot that underwent freeze drying or spray drying showed lower TPC values than BJ and CB, probably due to selective loss of compounds during the drying process as phenolics are hydrosoluble compounds that may have been lost with water. BJ was not subjected to thermal processing or drying and the TPC dry weight basis values obtained were higher than for other formulations.

Recommendations for the daily intake of phenolics and other antioxidants have not yet been established. Chun *et al.* (28) estimated the American average daily intake of phenolics from fruits and vegetables at 450 mg of GAE of fresh weight (FW). Asparagus had the highest TPC value of $64.15\pm2.46\text{ of GAE mg}\cdot100\text{ g}^{-1}$ of FW. In this study, levels of TPC on a FW basis were 66.29 ± 5.46 and $26.08\pm2.12\text{ GAE mg}\cdot100\text{ g}^{-1}$ in BC and CB, respectively. BP exhibited 49.35 ± 6.78 and BJ exhibited $31.04\pm5.16\text{ mg}\cdot100\text{ g}^{-1}$.

NO_3^- analysis The NO_3^- contents of the 4 beetroot forms analyzed in this study are shown in Fig. 3. BJ ($12,252.90\pm1105.30\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) showed significantly ($p<0.01$) higher NO_3^- concentrations than

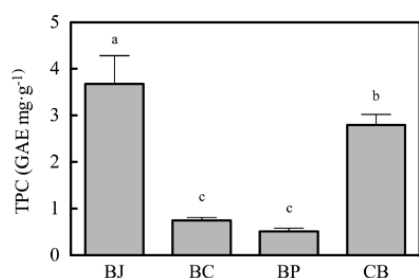


Fig. 2. Total phenolic contents (TPC) of beetroot juice (BJ), beetroot chips (BC), beetroot powder (BP), and cooked beetroot (CB) expressed in GAE mg·g⁻¹. Values are presented as means±SD. Different letters indicate significance at $p < 0.01$.

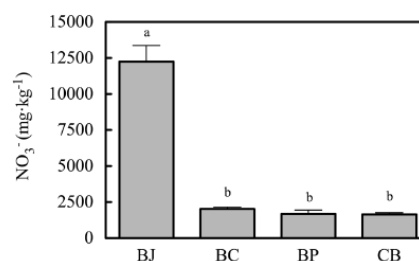


Fig. 3. Nitrate (NO₃⁻) contents of beetroot juice (BJ), beetroot chips (BC), beetroot powder (BP), and cooked beetroot (CB) expressed in mg·kg⁻¹. Values are presented as means±SD. Different letters indicate significance at $p < 0.01$.

(2,031.2±144.00 mg·kg⁻¹), BP (1,683.50±264.48 mg·kg⁻¹), and CB (1,649.66±114.26 mg·kg⁻¹). There were no significant ($p > 0.01$) differences in NO₃⁻ concentrations between BC, BP and CB. Losses of hydrophilic CB may have been due to dilution in cooking water.

A study conducted by Raczuk *et al.* (29) evaluated 20 CB samples and reported NO₃⁻ contents of 1,306±405 mg·kg⁻¹ of FW. This value was higher than the CB contents reported herein of 153.9±10.66 mg·kg⁻¹ of FW. Values may have differed due to analytical techniques used as the HPLC method is more sensitive and specific, compared with other spectrophotometric methods, such as the Griess reaction (30).

NO₃⁻ present in beetroot juice promotes enhanced performance during cycling and running (12,13). Athletes and consumers seeking a healthy lifestyle are constantly looking for specific ingredients, sometimes called super foods, and dietary supplements that improve health and physical performance (31). The BP formulation can be added to drinks or water, salads, soups, and yogurts, and BC can be consumed as a snack during physical exercise. Both formulations can be practical forms of dietary nitrate ingestion, being consumed by athletes before training or competitions.

Sugar analysis Glucose, fructose, sucrose and total sugar contents for BC, BP, CB, and BJ are shown in Table 1. Formulations showed significant ($p < 0.01$) differences in total sugar contents in a descending order of BJ (963.41±13.98 mg·g⁻¹), BC (627.96±11.39 mg·g⁻¹), BP (444.05±26.08 mg·g⁻¹), and CB (249.51±0.22 mg·g⁻¹). Sucrose was the dominant sugar in all 4 beetroot formulations while glucose and fructose were present in smaller amounts, probably because the

root is the storage organ of plants and energy in beetroots is stored in the form of sucrose (32).

Beetroot juice had significantly ($p < 0.01$) higher sugar contents, compared with the other beetroot formulations since juice was not subjected to thermal processing or drying. CB exhibited the lowest level of total sugars, compared with BJ, BC, and BP, probably due to loss of sugars via solubilization in water during the cooking procedure (33). Drying processes promote water removal that can lead to loss of water-soluble components of the food matrix. On the other hand, the drying processes for both BC and BP concentrated sugars, leading to higher sugar contents than for CB and lower sugar contents than for BJ. Similar results were observed in a previous study conducted by Rodríguez-Sevilla *et al.* (33) who reported a significant reduction of total sugars in beetroot processed at 121°C for 15 min in an autoclave (46.9±1.06 mg·g⁻¹ of FW for total sugars and 43.4±0.76 mg·g⁻¹ of FW for sucrose), compared with raw beetroot (73.0±10.16 mg·g⁻¹ of FW for total sugars and 66.8±9.34 mg·g⁻¹ of FW for sucrose). Bach *et al.* (32) reported a reduction of up to 72% in the sugar contents of different types of beetroot after boiling with mean values of total sugars of 5 variations of raw and cooked beetroots of 54.57±9.00 and 39.60±3.90 mg·g⁻¹, respectively.

Lower levels of total sugars and sucrose observed in this study for CB (22.50±0.05 mg·g⁻¹ of sucrose and 23.26±0.04 mg·g⁻¹ of total sugars on a wet weight basis) than for other beetroot formulations may have been influenced by a prolonged cooking time of 40 min. The previously mentioned studies used cooking times of 15 and 8 min (32). The difference in the sugar content reported by Bach *et al.* (32) and this study may have been due to differences in the varieties

Table 1. Changes in sugar contents between beetroot juice (BJ), beetroot chips (BC), beetroot powder (BP), and cooked beetroot (CB) in mg·g⁻¹ on a dry weight basis

Presentation form	Fructose	Glucose	Sucrose	Total sugars
BJ (mg·g ⁻¹)	18.05±0.54 ^a	14.95±0.21 ^a	930.40±13.65 ^a	963.41±13.98 ^a
BC (mg·g ⁻¹)	13.23±0.84 ^b	11.46±0.25 ^b	603.27±10.30 ^b	627.96±11.39 ^b
BP (mg·g ⁻¹)	7.69±0.07 ^c	6.87±0.05 ^c	429.48±25.96 ^c	444.05±26.08 ^c
CB (mg·g ⁻¹)	3.63±0.02 ^d	4.51±0.01 ^c	241.37±0.25 ^d	249.51±0.22 ^d

^{a-d}Values are presented as means±SD. Different letters in the same column indicate significance at $p < 0.01$.

Table 2. Changes in organic acid contents between beetroot juice (BJ), beetroot chips (BC), beetroot powder (BP), and cooked beetroot (CB) in $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ on a dry weight basis

Presentation form	Citric acid	Ascorbic acid	Malic acid	Total organic acids
BJ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	9.81 $\pm$ 0.32 ^{bl}	3.62 $\pm$ 0.09 ^c	15.36 $\pm$ 0.69 ^b	28.80 $\pm$ 0.94 ^c
BC ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	13.34 $\pm$ 3.85 ^a	5.79 $\pm$ 0.78 ^b	16.39 $\pm$ 0.90 ^b	35.53 $\pm$ 3.97 ^b
BP ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	16.21 $\pm$ 0.68 ^a	11.57 $\pm$ 0.49 ^a	20.14 $\pm$ 0.76 ^a	47.93 $\pm$ 1.32 ^a
CB ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	3.67 $\pm$ 0.09 ^c	1.68 $\pm$ 0.11 ^d	8.57 $\pm$ 0.15 ^c	13.93 $\pm$ 0.24 ^d

^{bl}Values are presented as means $\pm$ SD. Different letters in the same column indicate significance at $p < 0.01$.

of beetroot analyzed.

In a study of raw beetroot, Bavec *et al.* (20) reported 21.03 $\pm$ 4.66 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of FW for total sugars, 18.88 $\pm$ 4.85 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of FW for sucrose, 0.65 $\pm$ 0.20 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of FW for glucose, and 1.49 $\pm$ 0.19 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of FW for fructose. The total sugar content of BJ was greater than for other beetroot forms in this study. However, considering different formulation portions on a wet weight basis, the BC and BP formulations had higher sugar contents per g (556.13 $\pm$ 10.09 and 427.75 $\pm$ 25.13 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively). Thus, technological processes can be advantageous for preservation and for increasing the nutritional value of foods due to concentration of compounds. Consumption of BC can be recommended for endurance athletes before, during, and after exercise due to a high carbohydrate content. The American College of Sports Medicine (ACSM) (34) recommendation for carbohydrate intake during exercise ranges from 30 to 60 $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$. A BC serving portion of 17 chips (54 g) would achieve the ACSM recommendation of 30 g of carbohydrates, and the BC formulation is more convenient than other beetroot formulations, such as 8 cups of CB (1.3 kg), 3 cups of BJ (370 mL), or 11 tablespoons of BP (30 g) (34).

Organic acid (OA) analysis Organic acid contents of BC, BP, BJ, and CB are shown in Table 2. BP (47.93 $\pm$ 1.32 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) and BC (35.53 $\pm$ 3.97 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) showed significantly ($p < 0.01$) higher values of total organic acids than both BJ (28.80 $\pm$ 0.94 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) and CB (13.93 $\pm$ 0.24 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$). For all formulations, the dominant organic acids were malic acid, followed by citric, and ascorbic acids. The malic acid content did not differ significantly ($p > 0.01$) between BJ and BC while significantly ($p < 0.01$) higher citric acid levels were found in BC and BP than in other formulations. However, no significant ($p > 0.01$) difference in the malic acid content was observed between BC and BP. BP had 2x the amount of ascorbic acid found in BC and 10x more than CB.

Spray drying and freeze drying may have positively contributed to preservation of organic acids in beetroot. The BC and BP formulations, both subjected to drying, exhibited the highest levels of organic acids. During the drying process, ascorbic acid degradation was reported to be moisture and temperature-dependent (35). Concentration of nutrients as a result of drying processes were probably responsible for higher levels of organic compounds in BC and BP formulations than in BJ and CB. Higher amounts of ascorbic acid observed in BP than in BC may have also been the result of spray-drying concentration (36).

Bavec *et al.* (20) observed levels of malic and ascorbic acids in

beetroots varying between 1.63 $\pm$ 0.07 and 0.30 $\pm$ 0.06 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of FW, respectively. Jiratanan and Liu (37) observed ascorbic acid levels of 0.15 $\pm$ 0.00 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ for raw beetroot and 0.12 $\pm$ 0.00 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ for beetroot cooked for 45 min at 115°C. Reported values of citric, malic, and ascorbic acids were similar to BJ and CB values reported herein, although previously reported values were lower than values for BP and BC reported herein. BP and BC formulations were concentrated due to drying, whereas previously reported values for BJ and CB were stated on a FW basis that included water content.

Drying techniques applied in this study resulted in higher concentrations of ascorbic acid in smaller beetroot amounts. Spray drying effectively encapsulates ascorbic acid. Pierucci *et al.* (36) used pea proteins to encapsulate ascorbic acid and obtained good results for vitamin release kinetics.

The Institute of Medicine (IOM) (38) has recommended levels of ascorbic acid for adult men and women of 90 and 75 $\text{mg} \cdot \text{day}^{-1}$, respectively. To achieve vitamin C recommendations using beetroot formulations, 1/2 cup or 5 chips (16 g) of BC, or 1 full tablespoon (8 g) of BP should be consumed, whereas it would be necessary to consume 4 cups (530 g), and more than 1 cup (267 mL) of CB and BJ, respectively. The BC and BP formulations are, therefore, more advantageous forms of beetroot since a smaller amount is sufficient to reach the daily ascorbic acid recommendation for adults.

In conclusion, consideration of all formulations on a dry weight basis indicates that the BC and BP formulations have higher organic acid contents and total antioxidant potentials than the BJ and CB formulations. However, BJ can also be advantageous if the purpose is to achieve optimum ingestion of sugars, nitrates, and phenolic compounds.

Comparisons on a FW basis of 4 beetroot formulations were made in order to inform the scientific community and consumers about nutrient contents and functional properties of beetroots, and for comparison of serving portions of beetroot formulations. Different beetroot formulations can be advantageous based on convenience and delivery of recommended dietary nutrient intake amounts, and to meet consumer preferences.

Distinct formulations used for the administration of beetroot can increase consumption of beetroot for different nutritional needs associated with improvements in cardiovascular function and exercise performance. However, future studies for investigation of the effects of different beetroot formulations for prevention of disease associated with oxidative stress, including cardiovascular disease,

and for improving exercise performance, are needed.

Acknowledgments Ricky Toledano aided preparation of the English version of this manuscript. The Research Foundation of the State of Rio de Janeiro-FAPERJ (Process # E-26/111.297/2013 and E-26/110.309/2014) and the National Counsel of Technological and Scientific Development-CNPq (Process # 442977/2014-0) provided financial support. LioFoods® of Sao Paulo, Brazil provided support for preparation of beetroot chips.

Disclosure The authors declare no conflict of interest.

References

- Liu RH. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Adv. Nutr.* 4: 384-392 (2013)
- Boeing H, Bechthold A, Bub A, Ellinger S, Haller D, Kroke A, Leschik-Bonnet E, Müller MJ, Oberitter H, Schulze M, Stehle P, Watzl B. Critical review: Vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *Eur. J. Nutr.* 51: 637-663 (2012)
- Hord NG, Tang Y, Bryan NS. Food sources of nitrates and nitrites: The physiologic context for potential health benefits. *Am. J. Clin. Nutr.* 90: 1-10 (2009)
- Lange W, Brandenburg WA, De bock TS. Taxonomy and cultonymy of beet (*Beta vulgaris* L.). *Bot. J. Linn. Soc.* 130: 81-96 (1999)
- United State Department of Agriculture (USDA). National Nutrient Database for Standard Reference. Available from: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/list>. Accessed Aug. 10, 2013.
- Koubaier HBH, Snoussi A, Essaidi I, Chaabouni MM, Thonart P, Bouzouita N. Betalain and phenolic compositions, antioxidant activity of tunisian red beet (*Beta vulgaris* L. *conditiva*) roots and stems extracts. *Int. J. Food Prop.* 17: 1934-1945 (2014)
- Wootton-Beard PC, Ryan L. Combined use of multiple methodologies for the measurement of total antioxidant capacity in uk commercially available vegetable juices. *Plant Food. Hum. Nutr.* 67: 142-147 (2012)
- Kujala TS, Loponen JM, Kikka KD, Pihlaja K. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: Distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *J. Agr. Food Chem.* 48: 5338-5342 (2000)
- Georgiev VG, Weber J, Kneschke EM, Denev PN, Bley T, Pavlov AI. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Betalain Extracts from Intact Plants and Hairy Root Cultures of the Red Beetroot *Beta vulgaris* cv. Detroit Dark Red. *Plant Food. Hum. Nutr.* 65: 105-111 (2010)
- KapilV, Webb AJ, Ahluwalia A. Inorganic nitrate and the cardiovascular system. *Heart* 96: 1703-1709 (2010)
- Stokes KY, Dugas TR, Tang Y, Garg H, Guidry E, Bryan NS. Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. *Endocrinol. Metab.* 296: 1281-1288 (2009)
- Murphy M, Elliot K, Heuertz RM, Weiss E. Whole beetroot consumption acutely improves running performance. *J. Acad. Nutr. Diet.* 112: 548-552 (2012)
- Vanhatalo A, Fulford J, Bailey SJ, Blackwell JR, Winyard PG, Jones AM. Dietary nitrate reduces muscle metabolic perturbation and improves exercise tolerance in hypoxia. *J. Physiol-London* 15: 5517-5528 (2011)
- Glód BK, Piszcz P, Czajka K, Zarzycki PK. A New Total antioxidant potential measurements using rp-hplc assay with fluorescence detection. *J. Chromatogr. Sci.* 49: 401-404 (2011)
- Wantusiak PM, Głód BK. Application of UV detection in HPLC in the total antioxidant potential assay. *Cent. Eur. J. Chem.* 10: 1786-1790 (2012)
- Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* 5: 5990-5999 (2013)
- Mohdaly AAA, Hassanien MFR, Mahmoud A, Sarhan MA, Smetanska I. Phenolics extracted from potato, sugar beet, and sesame processing by-products. *Int. J. Food Prop.* 16: 1148-1168 (2013)
- Alvares TS, Conte CA, Paschoalin VM, Silva JT, Meirelles CM, Bhambhani YN, Gomes PS. Acute L-arginine supplementation increases muscle blood volume but not strength performance. *Appl. Physiol. Nutr. Me.* 37: 115-126 (2012)
- Hernández JL, González-Castro MJ, Alba NI, García CC. High-performance liquid chromatographic determination of mono- and oligosaccharides in vegetables with evaporative light-scattering detection and refractive index detection. *J. Chromatogr. Sci.* 36: 293-298 (1998)
- Bavec M, Turinek M, Grobelnik-MLakar S, Slatnar A, Bavec F. Influence of industrial and alternative farming systems on contents of sugars, organic acids, total phenolic content, and the antioxidant activity of red beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* Rote Kugel). *J. Agr. Food Chem.* 58: 11825-11831 (2010)
- Sun Q, Han Z, Wang L, Xiong L. Physicochemical differences between sorghum starch and sorghum flour modified by heat-moisture treatment. *Food Chem.* 145: 756-764 (2014)
- Ratti C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review. *J. Food Eng.* 49: 311-319 (2001)
- Ravichandran K, Saw NMMT, Mohdaly AAA, Gabr MMA, Kastell A, Riedel H, Cai Z, Knorr D, Smetanska I. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Res. Int.* 50: 670-675 (2013)
- Attoe EL, Von Elbe JH. Degradation kinetics of betanin in solutions as influenced by oxygen. *J. Agr. Food Chem.* 30: 708-712 (1982)
- Herbach KM, Stintzing FC, Carle R. Betalain stability and degradation-Structural and chromatic aspects. *J. Sci. Food Agr.* 71: R41-R50 (2006)
- Figiel A. Drying kinetics and quality of beetroots dehydrated by combination of convective and vacuum-microwave methods. *J. Food Eng.* 98: 461-470 (2010)
- Jiménez-Monreal AM, García-Diz L, Martínez-Tomé M, Mariscal M, Murda MA. Influence of cooking methods on antioxidant activity of vegetables. *J. Food Sci.* 74: H97-H103 (2009)
- Chun OK, Kim D-O, Smith N, Schroeder D, Han JT, Lee CY. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J. Sci. Food Agr.* 85: 1715-1724 (2005)
- Raczuk J, Wadas W, Glozak K. Nitrates and nitrites in selected vegetables purchased at supermarkets in Siedlce, Poland. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 65: 15-20 (2014)
- Tsilas D, Fuchs I, Gutzki FM, Frölich JC. Measurement of nitrite and nitrate in plasma, serum and urine of humans by high-performance liquid chromatography, the Griess assay, chemiluminescence and gas chromatography-mass spectrometry: Interferences by biogenic amines and N(G)-nitro-L-arginine analogs. *J. Chromatogr. B* 715: 441-444 (1998)
- Clements WT, Lee SR, Bloomer RJ. Nitrate ingestion: A review of the health and physical performance effects. *Nutrients* 6: 5224-5264 (2014)
- Bach V, Mikkelsen L, Kidmose U, Edelenbos M. Culinary preparation of beetroot (*Beta vulgaris* L.): The impact on sensory quality and appropriateness. *J. Sci. Food Agr.* 95: 1852-1859 (2015)
- Rodríguez-Sevilla MD, Villanueva-Suárez MJ, Redondo-Cuenca A. Effects of processing conditions on soluble sugars content of carrot, beetroot and turnip. *Food Chem.* 66: 81-85 (1999)
- American Dietetic Association; Dietitians of Canada; American College of Sports Medicine, Rodríguez NR, Di Marco NM, Langley S. American College of Sports Medicine position stand. Nutrition and athletic performance. *Med. Sci. Sport. Exerc.* 41: 709-731 (2009)
- Santos PHS and Silva MA. Retention of vitamin c in drying processes of fruits and vegetables-A review. *Dry Technol.* 26: 1421-1437 (2008)
- Pierucci AP, Andrade LR, Baptista EB, Volpato NM, Rocha-Leão MH. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *J. Microencapsul.* 23: 654-662 (2006)
- Jiratanan T, Liu RH. Antioxidant activity of processed table beets (*Beta vulgaris* var. *conditiva*) and green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agr. Food Chem.* 52: 2659-2670 (2004)
- Institute of Medicine (US) Subcommittee on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. DR Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Assessment. Washington (DC): National Academies Press (US) (2000)

5. ESTUDO ORIGINAL 2

Estudo Original: A Single Dose of Beetroot-based Nutritional Gel Rich in Nitrate Does Not Improve Performance and Changes in Metabolic and Biochemical Parameters in Physically Active Individuals

Manuscrito em preparação.

A single dose of beetroot-based nutritional gel rich in nitrate does not improve performance or modify metabolic and biochemical parameters in physically active Individuals

Abstract: The consumption of beetroot has been proposed in order to enhance blood perfusion, restore endothelial function and improve exercise performance. This may be due to the possible effect of nitrate (NO_3^-) present in this food in stimulating the synthesis of nitric oxide (NO). The aim of the present study was to test the acute effects of a new formulation, rich in inorganic NO_3^- , of a beetroot-based nutritional gel ($\sim 9.92 \pm 1.97 \text{ mmol NO}_3^- \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), to be consumed by physically active individuals, on NO production, physical performance and metabolic and biochemical parameters. Using a double blind, placebo controlled and crossover design, 25 healthy runners ($35.76 \pm 6.06 \text{ yr}$; $\text{VO}_{2\text{peak}} = 59.21 \pm 7.36 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ingested a single dose of a beetroot-based nutritional gel (BET) or a placebo apple-based nutritional gel (PLA) ($\sim 0.33 \pm 0.15 \text{ mmol NO}_3^- \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), separated by a 07-d washout. After supplementation, subjects performed a test protocol for fatigue on a treadmill (3 min warm up of 40% $\text{VO}_{2\text{peak}}$, 4 min at 90% of gas exchange threshold I (GET I) and 70% Δ maximal end speed – GET I). Time trial performance (401.5 ± 164.3 vs. $391.7 \pm 176.9 \text{ sec}$) and $\text{VO}_{2\text{peak}}$ (58.89 ± 7.55 vs. $59.48 \pm 7.52 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) did not differ significantly between the PLA and BET groups, respectively. Systolic and diastolic blood pressures, as well as serum cortisol, urinary urea and blood lactate, did not differ significantly between the BET and PLA treatments. Plasma glucose was significantly lower in the BET treatment compared to the PLA at the immediate end of the exercise (AE) (100.99 ± 21.79 vs. $111.59 \pm 24.25 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$) and 20 min after the end of the exercise (+20) (80.74 ± 18.11 vs. $93.95 \pm 19.32 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$). Urinary NO_2^- (BET: 0.049 ± 0.018 vs PLA: $0.001 \pm 0.000 \text{ mmol} \cdot \text{mmol}^{-1} \text{ creatinine}$) and NO_3^- (BET: 1.987 ± 0.309 vs. PLA: $0.8232 \pm 0.099 \text{ mmol} \cdot \text{mmol}^{-1} \text{ creatinine}$) levels increased significantly after 90 min of BET ingestion. A single dose of a beetroot-based nutritional gel promoted higher metabolite excretion related to NO synthesis, compared to PLA ingestion, but did not improve physical performance of recreational athletes in an aerobic submaximal exercise.

Keywords: Beetroot gel, nitrate, nitric oxide, plasmatic biochemical parameters endurance exercise, cortisol

1. Introduction

The interest of the athletic population in sports nutrition is increasing (AHRENDT, 2001; BURNS et al., 2004). In recent years, several studies and research have been conducted on the influence of selective nutrition (isolated use of nutrients) and nutritional supplements in improving the health, performance and functional capacity of individuals (CLEMENTS et al., 2014). This trend is accompanied by the increased demand for targeted nutritional interventions to optimize the adjustments inherent to physical activity in order to improve muscle recovery and physical performance (MALINAUSKAS et al., 2007).

Beetroot, or *Beta vulgaris* L., is a plant rich in nutrients, such as sugars and phenolic compounds, ascorbic acid and nitrate (NO_3^-) (Vasconcellos et al 2015). Vasconcellos et al, (2015) have shown that different forms of beetroot, like beetroot chips, juice, powder, as well as cooked beetroot, still preserve compounds and nutrients even after processing and potentially maintain the health benefits related to the consumption of whole fruits and vegetables (LIU, 2013). Recently, NO_3^- presented in beetroot, has been proposed as being able to enhance blood perfusion (KAPIL, V; WEBB; AHLUWALIA, 2010), restore endothelial function (BRYAN; IVY, 2015; STOKES et al., 2009) and improve exercise performance by reducing maximum volume of oxygen ($\text{VO}_{2\text{peak}}$) (AFFOURTIT et al., 2015; LANSLEY et al., 2011). This is due to the possible effects of the nutrients present in this food item in stimulating the synthesis of nitric oxide (NO).

Dietary NO_3^- can be reduced to NO_2^- in the oral cavity by anaerobic bacteria expressing nitrate reductase, and be transformed further to NO via various pathways

(LUNDBERG et al., 2008). Nitrate supplementation from a beetroot source, before competition has become increasingly popular among athletes and could represent a legal and healthy way to enhance performance in elite athletes (BOORSMA; WHITFIELD; SPRIET, 2014). There is evidence that NO_2^- reduction to NO is facilitated by hypoxia and low pH at the muscular level (LUNDBERG et al., 2008).

Several authors observed improvements in physical performance in endurance exercises (running and cycling) after the ingestion of NO_3^- (dose ranging between 5 to 16.8 mmol NO_3^-) (BREESE et al., 2013; MURPHY et al., 2012; VANHATALO et al., 2010; WYLIE; KELLY; et al., 2013). The most positive results in physical performance occur when the dietary supplementation of NO_3^- from beetroot starts at approximately 6 days before the intervention, in a "long-term" or "chronic" supplementation (BAILEY et al., 2009; CERMAK; GIBALA; et al., 2012; LANSLEY et al., 2011; THOMPSON, C. et al., 2015; VANHATALO et al., 2010). Some studies, while investigating the effects of a single dose of NO_3^- supplementation, found no results in physical performance (ARNOLD et al., 2015; CERMAK; GIBALA; et al., 2012). Long-term supplementation appears to promote changes in the number of mitochondria (LARSEN, F. J. et al., 2011), muscular contractility (HERNÁNDEZ et al., 2012), and changes in proteins that would promote improvements in skeletal muscle metabolism and mechanical efficiency (JAMES et al., 2015). Taken together, these results seem to indicate that NO_3^- is capable of increasing the efficiency of the oxidative metabolic pathways necessary to provide energy substrates for muscle contraction during exercise, although the physiological and metabolic mechanisms in single-dose and long-term studies are not yet completely understood.

In this context, the present study aims to clarify biochemical and metabolic changes and effect on performance resulting from the ingestion of NO_3^- , evaluating the effect of this nutritional strategy on the practice of high performance sports. The high NO_3^- content of a beetroot-based nutritional gel and antioxidant compounds have been recently evaluated (Morgado et al 2015 personal communication, and da silva 2015). The high NO_3^- and carbohydrate contents of the gel presented in a small volume (100 g), makes it advantageous for athletes by replacing sport drinks in order to avoid possible stomach discomfort due to the large volume of fluid consumed when ingesting these drinks (da silva 2015). Furthermore, it is expected that the gel should be easier to transport to sporting events than sport drinks and beetroot juice.

To test the acute effect of a new formulation of a beetroot-based nutritional gel rich in NO_3^- , 25 recreational athletes were recruited to participate in a randomized, double blind, controlled placebo, crossover design study in a high intensity aerobic exercise on a treadmill, and biochemical and metabolic parameters were evaluated. These parameters include urinary urea, creatinine, NO_2^- and NO_3^- , serum cortisol, blood glucose and lactate, in addition to blood pressure and $\text{VO}_{2\text{peak}}$.

2. Material and methods

2.1. Participants

Twenty five healthy runners (11 women: 36.27 ± 5.57 yr, 58.19 ± 3.54 kg, 26.13 ± 4.38 %BF, 52.79 ± 4.57 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ $\text{VO}_{2\text{peak}}$ and 14 men: 35.36 ± 6.59 yr, 73.50 ± 8.27 kg, 16.24 ± 2.91 %BF, 64.31 ± 4.71 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ $\text{VO}_{2\text{peak}}$, which were classified by the ACSM (2014), as excellent (99% percentile).

They were fully informed of the nature and purpose of the investigation and provided written consent to participate in the present study. The inclusion criteria were to be physically active and have more than one year of running experience, keeping a minimum training frequency of three and a maximum of five times a week, supervised by a physical educator. The exclusion criteria were any known cardiovascular, pulmonary, renal (kidney stones or other diseases) and metabolic diseases (asthma, diabetes, hypertension, hyperlipidemia, tobacco, etc.) or musculoskeletal injuries and/or use of steroids and any kind of nutritional supplements. Individuals with intolerance and/or allergies to any of the beetroot and/or the natural red dye components were also excluded. All volunteers signed a free and informed consent in accordance with institutional guidelines and Resolution n. ° 446/12 of the National Health Council. All experimental procedures were performed in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki and were approved by the institutional ethics committee of the Universitario Clementino Fraga Filho Hospital, Rio de Janeiro (under No. 21826513.3.0000.5257).

2.1.1. Dietary intervention

All participants ingested 100 g oral doses of either the beetroot-based nutritional gel (BET) or a placebo apple-based nutritional gel (PLA) in a double blind, crossover, placebo-controlled and randomized experimental design. Each participant was provided with two black sachets with 50 g each and 300 ml of water, with the recommendation to intake the mixture within 15 min. The NO_3^- dose (100 g of BET $\sim 9.92 \pm 1.97 \text{ mmol NO}_3^-$

· 100 g⁻¹) was chosen based on scientific evidence that has demonstrated improvement in physical performance (WYLIE; KELLY; et al., 2013).

2.1.2. Dietary control

On the day before the visits, the participants were instructed to avoid foods rich in NO₃⁻ and NO₂⁻ for 24 hours (Appendix I) and filled a 24h-food record before each visit. Subjects were asked to refrain the use of antibacterial mouthwash, in order not to impair conversion of NO₃⁻ to NO₂⁻ by bacteria in the oral cavity (GOVONI et al., 2008) and the intake of alcohol, caffeine for 24 h before testing.

2.2. Experimental design

All volunteers performed four visits with 7 days washout periods between the last two visits. During the first visit, volunteers were familiarized with the aerobic treadmill protocol.

For the second, third and fourth visits participants were advised to fast for 8 h and follow their normal exercise training but avoid intense exercise in the previous 24 h.

On the second visit, the VO_{2peak} of each volunteer was evaluated using an indirect calorimeter model CPX (VacuMed[®], California, EUA) (CUNHA et al., 2010).

On the third and fourth visits, the experimental protocol displayed in Figure 1 was performed. After an overnight fasting, and before the nutritional intervention, venous

blood and urine samples and blood pressure values for the baseline measurements were collected.

2.2.1. Exercise Protocol

The acute aerobic exercise protocol was carried out as described by BREESE et al. (2013), adjusted for a treadmill. Ventilation and expired oxygen and carbon dioxide concentrations were measured for the duration of the treadmill run, and measurements were averaged over 10 s intervals. The *gas exchange threshold I* (GET I) was determined using the V-slope Method (BEAVER; WASSERMAN; WHIPP, 1986) as the first disproportionate increase in CO₂ production (VCO₂) relative to the increase in VO₂, and subsequently verified by an increase in the ventilatory equivalent for VO₂ (VE/VO₂) with no increase in VE/VCO₂.

The test began with a 3 min warm-up at 40% of VO_{2peak} followed by 4 min of moderate intensity at 90% of the GET I and a subsequent severe intensity to volitional fatigue at 70% of the difference (Δ) between GET I and VO_{2peak}, using the following equation:

$$\text{Final speed} = [(\text{maximum final speed in VO}_{2\text{peak}} - \text{GET I}) \times 70\%] + \text{GET I}$$

The treadmill acute aerobic exercise protocol (3rd and 4th visits) and VO₂ collections on the test performed by the volunteers on BET and PLA treatments is described in Figure 2.

2.3. Blood Pressure, Heart Rate (HR), and Ratings of Perceived Exertion measurements

Supine blood pressure was measured in the right arm after a 5 min rest. Exercise HR was measured during the test by a cardio tachometer, model T31 (Polar®, Kempele, Finlandia).

Perceived exertion ratings were measured using an adapted Borg 0 to 10 point scale (BORG, 2000). Both HR and perceived exertion ratings were recorded at every minute after completing the warm-up stage.

2.4. Blood and Urine Samples

Blood drawn from the antecubital vein was collected in tubes containing EDTA and a gel clot activator, centrifuged at $1,500 \times g$ for 10 min at 4°C to separate the plasma and serum, and was then stored at -80°C for subsequent analyses.

Capillary blood was obtained by a transcutaneous puncture. Through pressure at the tip of the selected finger and local friction, perforation was held in place with a specific lancet in order to reach a 2 to 3 mm depth.

Urine samples were taken in appropriate sterile containers, aliquoted and stored at -80°C for subsequent analyses.

2.5. Chromatographic Analyses

Nitrite (NO_2^-) Analyses

In the case of the gels, samples were dissolved in water at a concentration of 9 % were then centrifuged at $4,500 \times g$ for 10 min. The supernatants were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ cellulose membrane filter (MF Millipore[®], Darmstadt, Germany) and the resulting filtered samples were stored at -80°C . Urine samples were diluted (1:10) and filtered through 10 kDa cutoff ultrafilters (Vivaspin 500; GE[®] Healthcare Life Sciences; Uppsala, Sweden) at $14,000 \times g$ for 15 min to remove high molecular weight proteins. The NO_2^- analysis, an indirect NO producer, in urine was conducted according to (BAIÃO et al, 2015; ÁLVARES et al., 2012) except for the step of conversion of NO_3^- to NO_2^- by nitrate reductase enzyme. This step was only performed for nitrate analysis. The results were expressed as $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ and $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of NO_2^- , in the case of the gels (PLA and BET) and urine samples, respectively.

Nitrate (NO_3^-) Analysis

Urine samples were diluted (1:10) and filtered through through 10 kDa cutoff ultrafilters (Vivaspin 500; GE[®] Healthcare Life Sciences; Uppsala, Sweden) at $14,000 \times g$ for 15 min to remove high molecular weight proteins. They were then diluted again (1:2000). The NO_3^- analysis was performed as described previously by ÁLVARES et al. (2012) with some adaptations. NO_3^- in the filtered samples was converted to NO_2^- enzymatically by nitrate reductase EC 1.6.6.2 (Roche Diagnostics[®], Mannheim, Germany) from *Aspergillus sp.* After the conversion of NO_3^- to NO_2^- , 100 μL of each filtered sample was incubated at 24°C with 10 μL of $316 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of 2,3-diaminonaphthalene (DAN) in $0.62 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl for 10 min, followed by the addition of 5 μL of $2.8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH and immediately analyzed by HPLC. The HPLC device was equipped with a $5\text{-}\mu\text{m}$ reversed-

phase C8 column (Discovery[®], Bellefonte, USA) (150 x 4.6 mm, I.D.) guarded by a 5- μ m reversed-phase C18 guard column (Ascentis[®], Bellefonte, PA, USA) (50 x 4.6 mm, I.D.) and a fluorescence detector model RF-10AXL (Shimadzu[®], Kyoto, Japan), monitoring excitation and emission wavelengths at 375 nm and 415 nm, respectively. The mobile phase (1.3 mL.min⁻¹) was 15 mmol.L⁻¹ sodium phosphate buffer (pH 7.5) and methanol (50:50, v/v) at a gradient elution. The results were expressed in mmol.L⁻¹ of NO₃⁻ urine samples, respectively.

2.6. Colorimetric Analysis

Urea Analysis

Urine samples were diluted (1:3) then diluted again with urea assay buffer (1:10). The urea analyses in urine were performed by a colorimetric method in 96-well plates (absorbance: 570 nm) in a VICTOR[™] X4 spectrophotometer (PerkinElmer[®], Boston, USA), as described in the manufacturer's instructions (Sigma –Aldrich[®] Co, St Louis, USA).

Creatinine Analysis

Urine samples were diluted (1:10) and filtered through 10 kDa cutoff ultrafilters (Vivaspin 500; GE Healthcare Life Sciences; Uppsala, Sweden) at 14,000 x *g* for 15 min at 4°C. They were then diluted again as needed with creatinine assay buffer. The creatinine analyses in urine were performed by a colorimetric method in 96-well plates (absorbance: 570 nm) in a VICTOR[™] X4 spectrophotometer (PerkinElmer[®], Boston,

USA), as described in the manufacturer's instructions (Sigma –Aldrich® Co, St Louis, USA).

2.7. ELISA Assays

Cortisol Analysis

Serum samples were completely thawed and mixed. Cortisol analysis were carried out by ELISA (enzyme linked immunosorbent assays) in 96-well plates (absorbance: 450 nm) in a VICTOR™ X4 spectrophotometer (PerkinElmer®, Boston, USA). The analyses were performed as described in the manufacturer's instructions (Sigma – Aldrich® Co, St Louis, USA).

2.8. Lactate and glucose analysis

Capillary blood glucose and lactate were analyzed within 30 s of collection on a Yellow Springs Instrument (YSI Life Sciences, Inc., Yellow Springs, OH, USA).

2.9. Gel preparation

Beetroot-based nutritional gel (BET)

All beetroots used in the present study belong to the *Chenopodiaceae* family and *Beta vulgaris* L. species. Conventional beetroot was acquired in the city of Rio de Janeiro (Southeast of Brazil - 22° 54' S 43° 10' W).

The beetroots were thoroughly washed in tap water, sanitized with a chlorine solution and put in a centrifuge blender, model CE700 (Black & Decker®, Uberaba, Brazil).

The same beetroots used in the preparation of the juice were used to prepare beetroot chips according to Vasconcellos et al, (2016). The beetroots were sliced (3-8 cm wide and 2-4 mm thick) and frozen at -20 °C for 48 hours. Subsequently, the sliced beetroots were freeze-dried in a Liotop P1040 freeze-drier (Liobras[®], Sao Carlos, Brazil). Chips were then crushed in a portable blender (Cadence[®], Navegantes, Brazil), and mixed with beetroot juice and carboxymethyl cellulose to form a gel. The BET gel had 85.87 ± 9.85 g total carbohydrate content in 100 g, respectively.

Placebo apple-based gel (PLA)

The placebo apple-based gel was prepared by removing the NO_3^- from the beetroot juice. The beetroot juice was transferred to a sterile bottle containing a NO_3^- specific A-520E anion-exchange resin (Purolite[®], Bala Cynwyd, USA). After 1 h on an orbital shaker, the suspension was loaded onto a sterile glass column (Glass chromatography column, 3 cm x 55 cm, I.D. from Sigma–Aldrich[®] Co, St Louis, USA) and eluted with the use of a vacuum pump. Fuji apple (*Malus pumila* species) puree was prepared by liquefying the apples in a portable blender (Cadence[®], Navegantes, Brazil), which were then mixed to the NO_3^- -depleted beetroot juice, carmine and beetroot dyes and carboxymethyl cellulose. The PLA gel had 54.75 ± 0.29 g total carbohydrate content in 100 g.

2.9.1. NO_3^- and carbohydrate Analysis of BET and PLA gels

For the NO_3^- analysis of the gels, each sample was weighed, diluted and separated in 4 aliquots and analyzed in triplicate (4×3 ; $N = 12$). Samples were dissolved in water at a concentration of 9 % and were then centrifuged at $4,500 \times g$ for 10 min. The supernatants were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ cellulose membrane filter (MF Millipore®) and the resulting samples were stored at -80°C . NO_3^- analyses were performed by the same method described above for urine. Before the analysis, a 1:8000 dilution was performed. The results were expressed in $\text{mmol} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

The total carbohydrate analyses were performed as described previously by HERNANDEZ et al. (1998) with some modifications regarding method flow, mobile phase, and temperature, as cited below. A $20 \mu\text{L}$ volume of each filtered sample was used. The analysis was performed using an HPLC system equipped with a $5\text{-}\mu\text{m}$ carbohydrate analytical column (Prevail®, Deerfield, USA) ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, I.D.), guarded by a $5\text{-}\mu\text{m}$ guard column (Prevail®, Deerfield, USA) ($7.5 \times 4.6 \text{ mm}$, I.D.) and an evaporative light scattering detector model ELSD LT II (Shimadzu®, Kyoto, Japan) at 40°C . The mobile phase ($1.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) was acetonitrile and water (75:25, v/v) at an isocratic elution.

3. Statistical analyses

All assumptions for using parametric tests were verified. The normality of all data was tested by the Shapiro-Wilk test. Differences in urinary NO_2^- e NO_3^- , urea, creatinine and BP (systolic and diastolic), between conditions (PLA and BET) were assessed using two-factor repeated measures ANOVA 2×5 for condition $\times$ time, of data collection (0,

60, 90 - BE, AE, +20, min). Analysis of lactate and blood glucose, between conditions (PLA and BET) were assessed using two-factor repeated measures ANOVA 2 x 4 for condition x time, of data collection (0, 90 - BE, AE, +20 min). Analysis of cortisol, Heart Rate and respiratory Quotient between conditions (PLA and BET) were assessed using two-factor repeated measures ANOVA 2 x 3 for condition x time, of data collection (0, AE, +20 min) for cortisol and (warm up, moderate and severe) for HR and RQ. Post-hoc analysis of significance within-subject effects was performed with adjustments for multiple comparisons using the Bonferroni correction. Analysis of Borg scale conducted using one-factor repeated measures ANOVA to establish differences between conditions. Differences in exercise time and VO_2 were analyzed using two-tailed, paired samples t-tests. The null hypothesis was rejected when $P < 0.05$. Statistical procedures were completed using Graphpad Prisma for windows version 5.

4. Results and Discussion

4.1. Gel NO_3^- content

NO_3^- content of the placebo apple-based nutritional gel (PLA) and beetroot-based nutritional gel (BET) were 0.33 ± 0.15 and $9.92 \pm 1.97 \text{ mmol} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ($p=0.014$), respectively (Figure 3). This result shows that the PLA formulation was effective in reducing NO_3^- content. The selected BET NO_3^- dose for the study was based on evidence of dose-response studies and other literature results regarding beetroot and exercise (AFFOURTIT et al., 2015; WYLIE; KELLY; et al., 2013).

BET and PLA gels showed 85.87 ± 9.85 g and 54.75 ± 0.29 g total carbohydrate content in 100 g, respectively. Despite the total carbohydrate values present significant differences between them, as evidence in the literature seems to be no difference in performance when a smaller or a larger amount of carbohydrate is ingested before exercise, for a review (JEUKEENDRUP; KILLER, 2010). In addition, in the present study blood glucose levels pre exercise (BE) 90 min before ingestion of the gel did not differ significantly.

4.2. Exercise Performance

A single dose of beetroot gel did not promote significant differences in the VO_{2peak} (4.00 ± 0.95 vs. 3.93 ± 0.84 l $\cdot$ min⁻¹) and time to fatigue (390.90 ± 158.50 vs. 395.4 ± 179.60 sec) between the BET and PLA supplementation, respectively (table 1). These results are in accordance with studies in the literature that investigated the effects of a single dose of NO₃⁻ rich beetroot juice (ARNOLD et al., 2015; CERMAK; RES; et al., 2012; PUYPE et al., 2015; WILKERSON et al., 2012) and supplementation with NaNO₃ (BESCÓS et al., 2011) and did not report improvements in physical performance.

VANHATALO et al. (2010) demonstrated that acute supplementation with ~ 5.2 mmol NO₃⁻ $\cdot$ day⁻¹ with beetroot juice did not promote any effects on the VO_{2peak} and GET. However, after 15 days of this supplementation these parameters were significantly elevated. This result indicates distinct effects on physiological responses to exercise with regard to acute and chronic supplementation.

Positive results regarding physical performance were observed by most studies that offered long-term beetroot supplementation, a fact that corroborates evidence pointing towards benefits in muscle energy metabolism, increasing the efficiency of mitochondrial ATP synthesis and/or cell efficiency ATP-consuming processes (AFFOURTIT et al., 2015). Long-term (4-6 days) studies with NO_3^- supplementation (doses ranging from 5.2 to 12.8 mmol/day) and recreational athletes, showed increases in performance in cycle ergometers (BAILEY et al., 2009; CERMAK; GIBALA; et al., 2012; LANSLEY et al., 2011; THOMPSON, C. et al., 2015; VANHATALO et al., 2010). The cumulative effects of NO_3^- supplementation may be one of the likely explanations for the no results regarding performance found in the present study. In contrast, a recent meta-analysis concluded that, when compared to placebo, NO_3^- did not significantly affect time trial performance or performance during graded exercise testing (HOON et al., 2013). In the present study, a single dose of BET gel was not enough to promote changes in oxygen consumption and, consequently, in physical performance.

Despite the evidence demonstrating that NO_3^- supplementation in performance benefits are more often observed in inactive to recreationally active individuals (HOON et al., 2013), the present study did not observe improvements in performance.

According to evidence, aerobically trained individuals have specific physiological adaptations that may limit possible benefits from NO_3^- supplementation (JAMES et al., 2015). These adaptations are related with the increases in the number of mitochondria (LARSEN, F. J. et al., 2011) and increased skeletal muscle capillary density (BRODAL; INGJER; HERMANSEN, 1977). Maybe another explanation for physical performance

improvement could be the existence of “responsive” and “non-responsive” individuals to NO_3^- supplementation (PEELING et al., 2014).

4.2.3 Glucose and lactate analysis

Blood glucose was higher ($p < 0.05$) in AE and +20 in the PLA group when compared to the BET supplementation group (figure 5A). These findings corroborate the findings of WYLIE; MOHR; et al. (2013), that observed lower plasma glucose concentrations in high intensity intermittent exercise after beetroot juice supplementation ($\sim 8.2 \text{ mmol /140 mL}$ of NO_3^-). NO plays a key role in glucose uptake during contraction in skeletal muscles according to the literature (MCCONELL; KINGWELL, 2006; MCCONELL et al., 2012; MERRY et al., 2010).

Blood lactate did not differ between the BET and PLA groups, but presented significant differences over time, indicating that the aerobic exercise intensity was the same for both treatments. WYLIE; MOHR; et al. (2013) also found no changes in lactate levels when comparing NO_3^- and PLA supplementation. These authors discuss the possible explanation that blood measurements [lactate] are not sufficiently sensitive in reflecting possible differences in muscle anaerobic energy turnover and H^+ accumulation between the beetroot and placebo supplementations. However, in the present study, lactate showed the expected behavior during the test, remaining constant at time T0 and BE ($p > 0.05$), and high in the AE, followed by a drop on time + 20 ($p < 0.0001$) (figure 5B).

4.2.4. Blood Pressure, Heart Rate (HR), and Perceived Exertion Ratings

HR and Borg increased linearly with exercise intensity, but did not differ between the BET and PLA supplementation. These results show that the exercise intensity was the same, and that there was no influence of the BET and PLA nutritional intervention on these indicators.

Systolic and diastolic BP of the BET and PLA treatments did not differ significantly. These results are in agreement with some of the literature. MURPHY et al. (2012) did not observe significant differences in BP after a single portion (~ 8mmol of NO_3^- in the form of baked beetroot. A long-term NO_3^- supplementation study (~ 8mmol $\cdot$ day⁻¹ for 6 days) did not show changes in BP in trained cyclists (CERMAK; GIBALA; et al., 2012). WILKERSON et al. (2012) in a study with a single-dose supplementation (~ 6,2 mmol NO_3^-) in trained cyclists also observed no BP alterations. It seems that besides the influence of single dose to long-term supplementation, the fitness status can negate the NO_3^- supplementation effects on BP, as discussed above.

Effects on Systolic BP reduction in athletes after beet juice supplementation for 6 days are reported in the literature by several authors (BAILEY et al., 2009; LANSLEY et al., 2011).

Studies in healthy but untrained subjects verified a reduction in SBP with a single dose supplementation of NO_3^- from beets (BOND JR et al., 2013; THOMPSON, K. G. et al., 2014; WYLIE; KELLY; et al., 2013). VANHATALO et al. (2010) gave a single dose of beetroot juice (~5,2 mmol/500mL) to healthy individuals and observed significant differences in both SBP and DPB. However, the baseline values of the aforementioned study (127 ± 6 and 72 ± 5 mmHg) proved higher than those found in the present study at

T0 PLA (109.83 ± 12.43 and 61.55 ± 6.90 mmHg) and T0 BET (106.41 ± 13.76 and 62.82 ± 7.60 mm Hg) (VANHATALO et al., 2010), which may be associated with the fitness status of the volunteers.

4.3. NO_3^- and NO_2^- analyses

Urinary NO_2^- and NO_3^- levels in mmol were corrected by creatinine, also in mmol (HOBBS et al., 2012). Urine responses indicate that the NO_3^- dose used in the current study was sufficient to cause higher excretion of metabolites related to the synthesis of NO, evidenced by the high levels of NO_2^- observed in the BET supplementation. Urinary $[\text{NO}_2^-]$ was significantly higher in the BET group when compared to the PLA in the BE (0.049 ± 0.018 vs 0.001 ± 0.000 mmol $\cdot$ mmol⁻¹ creatinine) and AE (0.027 ± 0.011 vs. 0.001 ± 0.000 mmol $\cdot$ mmol⁻¹ creatinine) times (Figure 4 A). The NO_2^- peak occurred at 90 min (BE) and was maintained until the end of the exercise at AE.

The NO_3^- content administered in exercise performance studies has ranged from about 4 to 12 mmol, and improvement in performance is reported with higher doses (JAMES et al., 2015).

Urinary $[\text{NO}_3^-]$ was significantly higher in the BET group in BE and AE times compared to the PLA group. This result proves that the NO_3^- supplementation through the beetroot gel was effective (Figure 4B). Previous studies showed that the NO_3^- plasma peak = between 1-3 hours after ingestion, but this peak may occur earlier according to the nitrate source (kind of vegetables) or formulation (gels and capsules) (AFFOURTIT et al., 2015).

There is evidence that 70% of the ingested NO_3^- is excreted in urine, and that its maximum concentration occurs at 4-6 h with a return to baseline within 24 hr (BARTHOLOMEW; HILL, 1984; PANNALA et al., 2003). In the present study, urinary NO_3^- peaked at 90 min after gel supplementation. The maximum excretion peak may be changed according to physical conditions of the subjects, exercise and/or different doses.

A single study with a chard- and rhubarb-based sports gel rich in NO_3^- showed $[\text{NO}_2^-]$ and $[\text{NO}_3^-]$ plasma peaks at 90 min and 1 hour, respectively, showing an earlier peak compared to studies with similar NO_3^- doses from beetroot juice (MUGGERIDGE et al., 2014). Pharmacokinetic studies are also needed on gels, to identify effects related to the digestibility and bioavailability of the gels when compared to other forms of dietary NO_3^- supplementation.

4.4. Cortisol analysis

Cortisol levels did not differ between the BET and PLA treatments ($p=0.508$), although this hormone behaved as expected with exercise (Figure 6). Times T0 and AE showed significantly lower values than +20 in both BET and PLA supplementations. Cortisol peaks occurred between 20-30 min after the end of the exercise. This behavior, of a transient increase in cortisol levels after intense aerobic exercise, which continues into the rest period is also described in the literature (GAWEL et al., 1979).

4.5. Urea

Urea values in urine did not differ ($p=0.42$) between the BET and PLA treatments. It is likely that the increase in urinary urea due to the high intensity aerobic exercise alone would occur 24 hours after the end of the exercise, as noted in a study after a 100 km run (DECOMBAZ et al., 1979). Hyperammonemia is a condition common to intense or exhausting exercise and as the ammonia is converted into urea to be excreted. Since ammonia is a marker of fatigue one of the objectives was to evaluate this marker and the effect after exercise and beetroot supplementation.

5. Conclusions

A single dose of the new NO_3^- -rich beetroot-based nutritional gel formulation, promoted higher excretion of metabolites related to NO synthesis, but did not enhance the physical performance of recreational athletes in an aerobic submaximal exercise. In addition, the BET gel did not changed cortisol, blood lactate and urinary urea levels in recreational athletes.

These results bring into question the ergogenic potential of NO_3^- for acutely increasing the performance of recreational athletes.

Further studies are recommended in order to evaluate the long-term supplementation of NO_3^- gels in physically active individuals.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support and fellowships from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES and LioFoods® from São Paulo, Brazil for providing the beetroot chips.

Figure captions

Figure 1. Summary of the treadmill exercise test protocol, performed on 3rd and 4th visits, on BET and PLA treatments.

Figure 2. Treadmill acute aerobic exercise protocol performed on 3rd and 4th visits and VO₂ collections on the test performed by the volunteers on BET and PLA treatments.

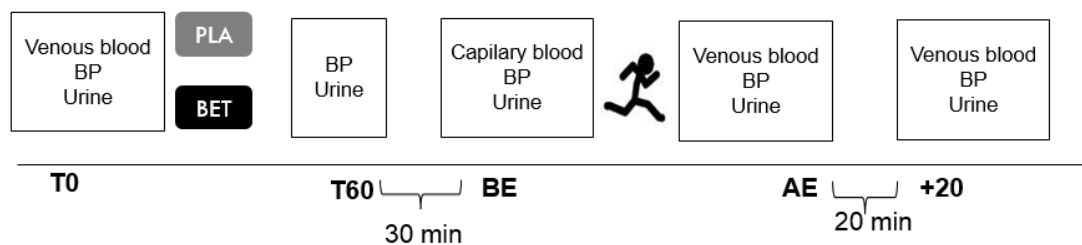
Figure 3. NO₃⁻ content of BET and PLA gels. Values are presented as means±SD. *indicates significance at p<0.003.

Figure 4. Urinary NO₂⁻ (**panel A**) and NO₃⁻ (**panel B**) mmol · mmol⁻¹ creatinine at the baseline (T0), 60 min after gel ingestion (T60), before exercise (BE), after exercise (AE) and 20 min after the end of the exercise (+20). Values are presented as means±SEM. * indicates significance at p<0.05; ** indicates significance at p<0.001 between PLA and BET treatments. Different letters indicate significance in p<0.05, at different time intervals within the same treatment.

Figure 5. Blood and hemodynamic parameters at: baseline (T0), 60 min after gel ingestion (T60), before exercise (BE), after exercise (AE) and 20 min after the end of the exercise (+20). Values are presented as means $\pm$ SD. * indicates significance at $p<0.05$ between PLA and BET treatments. Different letters indicate significance in $p<0.05$, at different time intervals within the same treatment.

Figure 6. Serum cortisol levels at: baseline (T0), after exercise (AE) and 20 min after the end of the exercise (+20). Values are presented as means $\pm$ SD. Different letters indicate significance in $p<0.05$, at different time intervals within the same treatment.

Figure 1.



T0 - baseline

T60 - 60 min after gel ingestion

BE - Before exercise

AE - After exercise

+20 - 20 min after end of exercise

BP - Blood pressure

PLA Placebo gel

BET Beetroot gel

 Treadmill exercise

Figure 2.

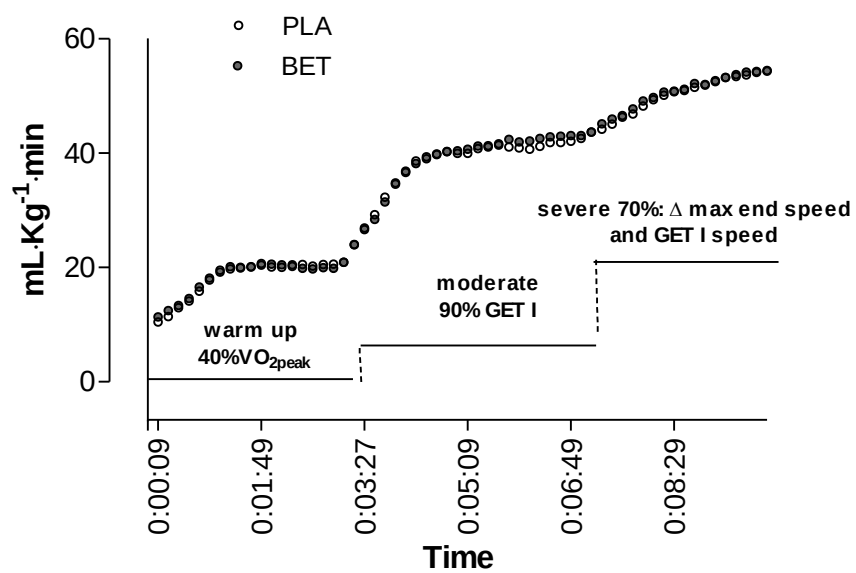


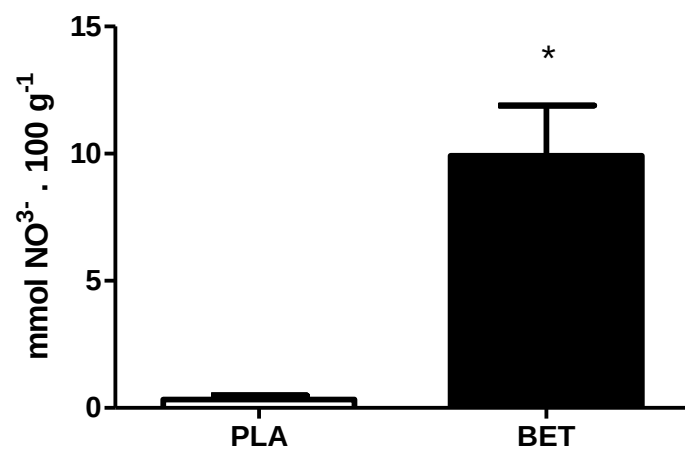
Figure 3.

Figure 4.

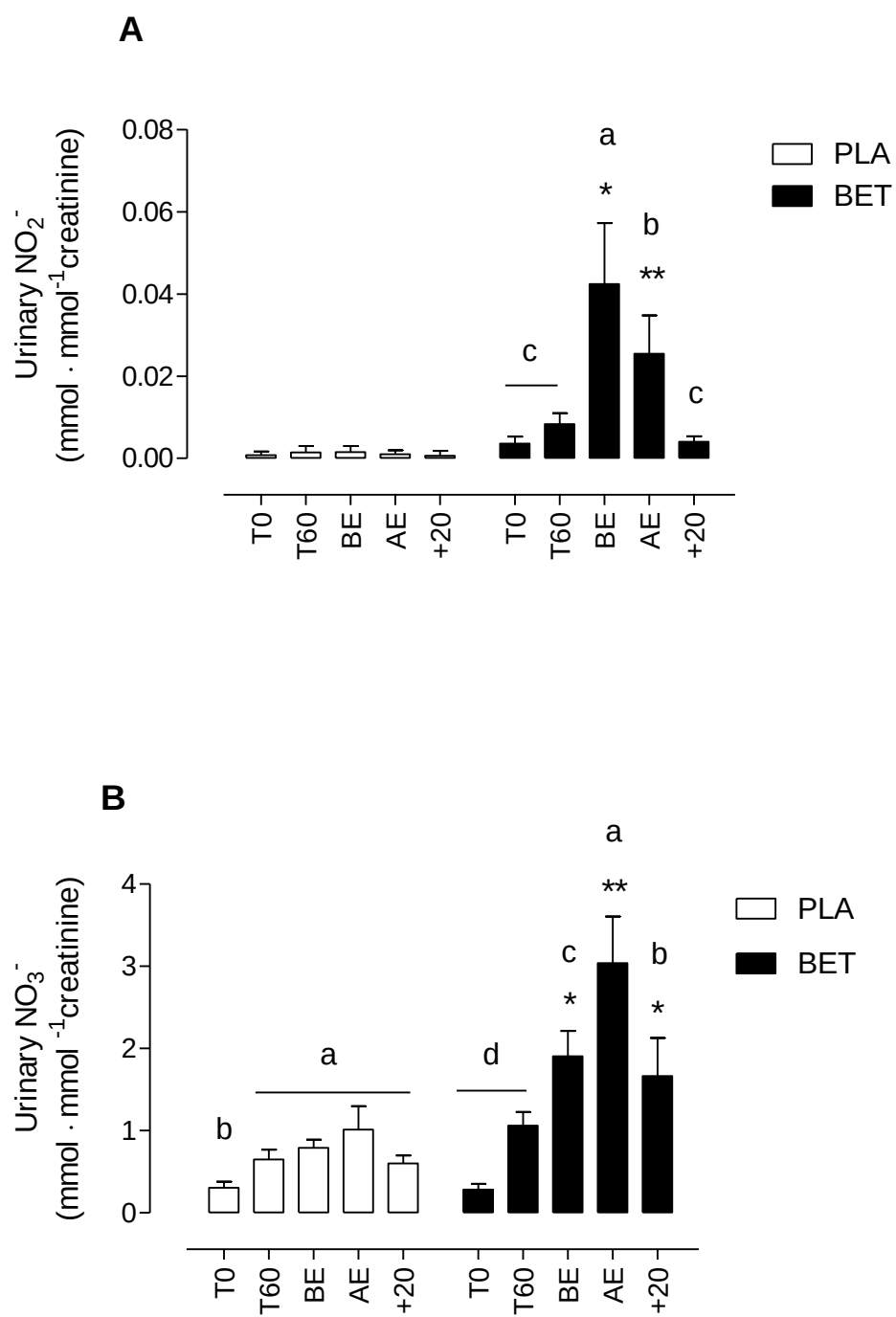


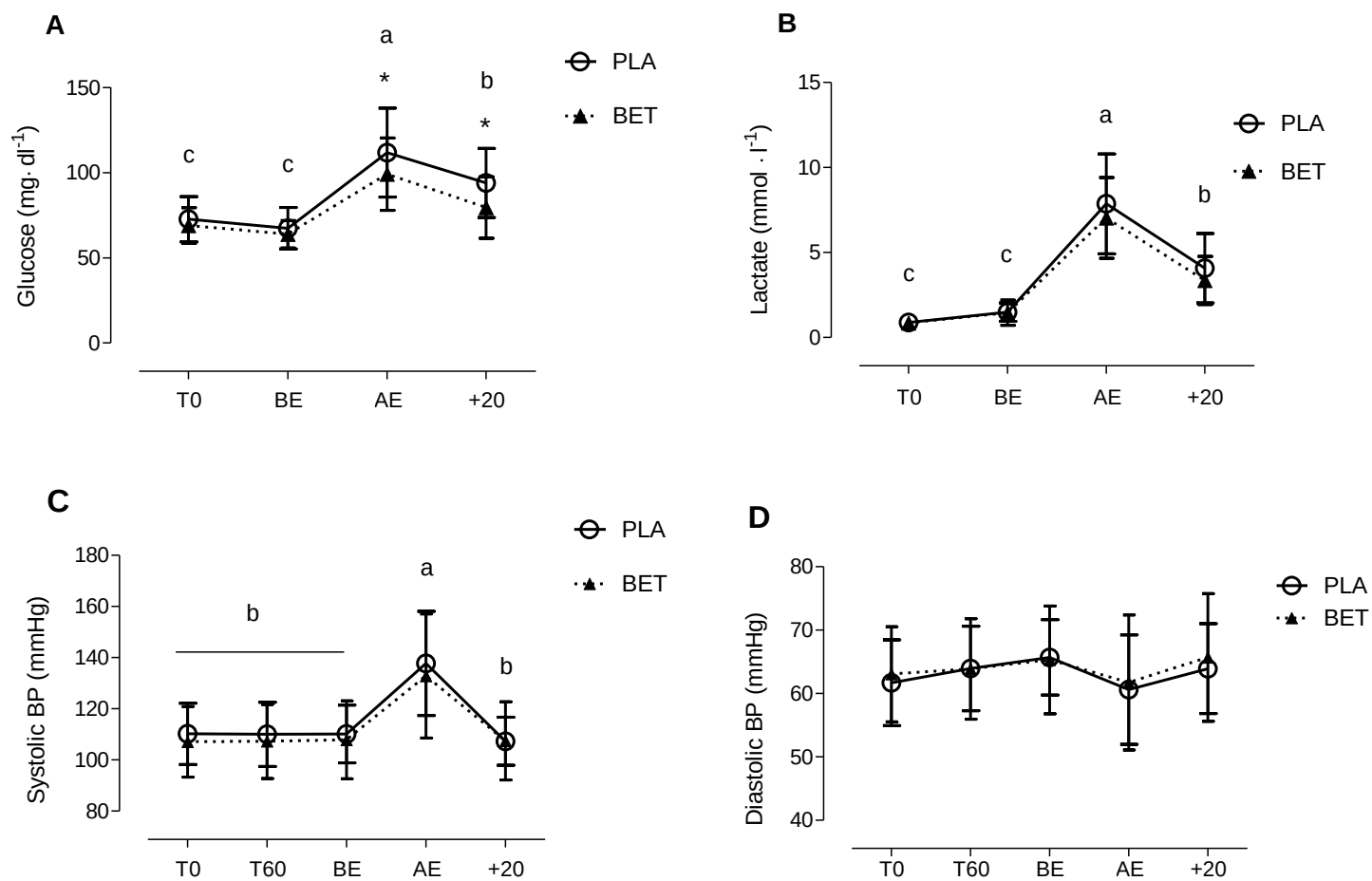
Figure 5.

Figure 6.

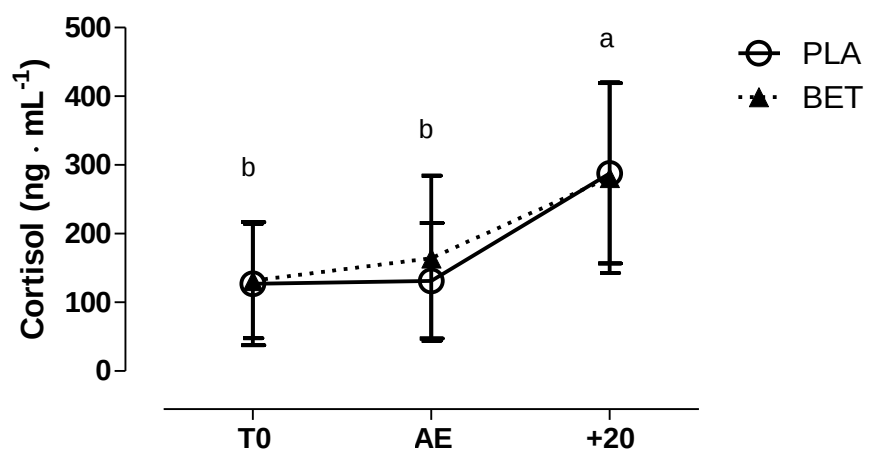


Table 1. Physical performance on treadmill test: VO_2 and time (sec) after nutritional intervention with the BET and PLA gels.

Men and Women	PLA	BET
Moderate intensity		
baseline VO_2 ($\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$)	1.43 ± 0.47	1.40 ± 0.44
endpoint VO_2 ($\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$)	2.85 ± 0.65	2.89 ± 0.78
Severe intensity		
baseline VO_2 ($\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$)	2.88 ± 0.64	2.92 ± 0.81
peak $\text{VO}_{2\text{peak}}$ ($\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$)	3.93 ± 0.84	4.00 ± 0.95
time (sec)	395.4 ± 179.60	390.90 ± 158.50

Values are presented as means $\pm$ SD.

References

Affourtit, C., et al. (2015). "On the mechanism by which dietary nitrate improves human skeletal muscle function." Frontiers in physiology **6**.

Ahrendt, D. M. (2001). "Ergogenic aids: counseling the athlete." American Family Physician **63**(5): 913-922.

Álvares, T. S., et al. (2012). "Acute l-arginine supplementation increases muscle blood volume but not strength performance." Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism **37**(1): 115-126.

Arnold, J. T., et al. (2015). "Beetroot juice does not enhance altitude running performance in well-trained athletes." Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism.

ACSM. Health-Related Physical Fitness Testing and Interpretation p. 1994 - 2945, 2014.

Bailey, S. J., et al. (2009). "Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans." Journal of Applied Physiology **107**(4): 1144-1155.

Bartholomew, B. and M. Hill (1984). "The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate." Food and Chemical Toxicology **22**(10): 789-795.

Bescós, R., et al. (2011). "Acute administration of inorganic nitrate reduces VO₂peak in endurance athletes." Med Sci Sports Exerc **43**(10): 1979-1986.

Bond Jr, V., et al. (2013). "Cardiorespiratory function associated with dietary nitrate supplementation." Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism **39**(2): 168-172.

Boorsma, R. K., et al. (2014). "Beetroot juice supplementation does not improve performance of elite 1500-m runners." Med Sci Sports Exerc **46**: 2326-2334.

Borg, G. (2000). Escalas de Borg para a dor eo esforço: percebido, Manole.

Breese, B. C., et al. (2013). "Beetroot juice supplementation speeds O₂ uptake kinetics and improves exercise tolerance during severe-intensity exercise initiated from an elevated metabolic rate." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **305**(12): R1441-R1450.

Brodal, P., et al. (1977). "Capillary supply of skeletal muscle fibers in untrained and endurance-trained men." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **232**(6): H705-H712.

Bryan, N. S. and J. L. Ivy (2015). "Inorganic nitrite and nitrate: evidence to support consideration as dietary nutrients." Nutrition Research **35**(8): 643-654.

Burns, R. D., et al. (2004). "Intercollegiate student athlete use of nutritional supplements and the role of athletic trainers and dietitians in nutrition counseling." Journal of the American Dietetic Association **104**(2): 246-249.

Cermak, N. M., et al. (2012). "Nitrate supplementation's improvement of 10-km time-trial performance in trained cyclists." International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism **22**(1): 64.

Cermak, N. M., et al. (2012). "No improvement in endurance performance after a single dose of beetroot juice." International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism **22**(6): 470.

Clements, W. T., et al. (2014). "Nitrate ingestion: a review of the health and physical performance effects." Nutrients **6**(11): 5224-5264.

Cunha, F., et al. (2010). "Influence of cardiopulmonary exercise testing protocol and resting VO₂ assessment on % HR_{max}, % HRR, % VO_{2max} and % VO_{2R} relationships." International journal of sports medicine **31**(5): 319-326.

da Silva, D. V., et al. (2015). Physicochemical, nutritional and sensory analyses of a nitrate-enriched beetroot gel and its effect on plasmatic nitric oxide and blood pressure. Food & Nutrition Research. In press.

Decombaz, J., et al. (1979). "Biochemical changes in a 100 km run: free amino acids, urea, and creatinine." European journal of applied physiology and occupational physiology **41**(1): 61-72.

Gawel, M., et al. (1979). "Exercise and hormonal secretion." Postgraduate medical journal **55**(644): 373-376.

Govoni, M., et al. (2008). "The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash." Nitric Oxide **19**(4): 333-337.

Hernández, A., et al. (2012). "Dietary nitrate increases tetanic $[Ca^{2+}]_i$ and contractile force in mouse fast-twitch muscle." The Journal of physiology **590**(15): 3575-3583.

Hernandez, J. L., et al. (1998). "High-Performace Liquid Chromatographic Determination of Mono-and Oligosaccharides in Vegetables with Evaporative Light-Scattering Detection and Refractive Index Detection." Journal of Chromatographic Science **36**(6): 293-298.

Hobbs, D. A., et al. (2012). "Blood pressure-lowering effects of beetroot juice and novel beetroot-enriched bread products in normotensive male subjects." British Journal of Nutrition **108**(11): 2066-2074.

Hoon, M. W., et al. (2013). "The effect of nitrate supplementation on exercise performance in healthy individuals: a systematic review and meta-analysis." Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab **23**(5): 522-532.

James, P. E., et al. (2015). "Nitrate pharmacokinetics: Taking note of the difference." Nitric Oxide.

Jeukendrup, A. E. and S. C. Killer (2010). "The myths surrounding pre-exercise carbohydrate feeding." Annals of Nutrition and Metabolism **57**(Suppl. 2): 18-25.

Kapil, V., et al. (2010). "Inorganic nitrate and the cardiovascular system." Heart **96**(21): 1703-1709.

Lansley, K. E., et al. (2011). "Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of walking and running: a placebo-controlled study." Journal of Applied Physiology **110**(3): 591-600.

Larsen, F. J., et al. (2011). "Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans." Cell metabolism **13**(2): 149-159.

Liu, R. H. (2013). "Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet." Advances in Nutrition: An International Review Journal **4**(3): 384S-392S.

Lundberg, J. O., et al. (2008). "The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics." Nature Reviews Drug Discovery **7**(2): 156-167.

Malinauskas, B., et al. (2007). "Supplements of interest for sport-related injury and sources of supplement information among college athletes." Adv Med Sci **52**: 50-54.

McConnell, G. K. and B. A. Kingwell (2006). "Does nitric oxide regulate skeletal muscle glucose uptake during exercise?" Exercise and sport sciences reviews **34**(1): 36-41.

McConnell, G. K., et al. (2012). "Skeletal muscle nitric oxide signaling and exercise: a focus on glucose metabolism." American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism **303**(3): E301-E307.

Merry, T. L., et al. (2010). "Skeletal muscle glucose uptake during contraction is regulated by nitric oxide and ROS independently of AMPK." American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism **298**(3): E577-E585.

Muggeridge, D. J., et al. (2014). "Acute whole body UVA irradiation combined with nitrate ingestion enhances time trial performance in trained cyclists." Nitric Oxide.

Murphy, M., et al. (2012). "Whole beetroot consumption acutely improves running performance." Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics **112**(4): 548-552.

Pannala, A. S., et al. (2003). "The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans." Free Radical Biology and Medicine **34**(5): 576-584.

Peeling, P., et al. (2014). "Beetroot Juice Improves on-Water 500 m Time-Trial Performance, and Laboratory-Based Paddling Economy in National and International-Level Kayak Athletes." International journal of sport nutrition and exercise metabolism.

Puype, J., et al. (2015). "No effect of dietary nitrate supplementation on endurance training in hypoxia." Scandinavian journal of medicine & science in sports **25**(2): 234-241.

Stokes, K. Y., et al. (2009). "Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **296**(5): H1281-H1288.

Thompson, C., et al. (2015). "Dietary nitrate improves sprint performance and cognitive function during prolonged intermittent exercise." European journal of applied physiology: 1-10.

Thompson, K. G., et al. (2014). "Influence of dietary nitrate supplementation on physiological and cognitive responses to incremental cycle exercise." Respiratory physiology & neurobiology **193**: 11-20.

Vanhatalo, A., et al. (2010). "Acute and chronic effects of dietary nitrate supplementation on blood pressure and the physiological responses to moderate-intensity and incremental exercise." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **299**(4): R1121-R1131.

Vasconcellos, J., et al. (2016). "Comparison of Total Antioxidant Potential, and Total Phenolic, Nitrate, Sugar, and Organic Acid Contents in Beetroot Juice, Chips, Powder, and Cooked Beetroot". Food Science and Biotechnology 25(1): 1-6.

Wilkerson, D. P., et al. (2012). "Influence of acute dietary nitrate supplementation on 50 mile time trial performance in well-trained cyclists." European journal of applied physiology **112**(12): 4127-4134.

Wylie, L. J., et al. (2013). "Beetroot juice and exercise: pharmacodynamic and dose-response relationships." Journal of Applied Physiology **115**(3): 325-336.

Wylie, L. J., et al. (2013). "Dietary nitrate supplementation improves team sport-specific intense intermittent exercise performance." European journal of applied physiology **113**(7): 1673-1684.

Supplementary files

Subject characteristics

The data in Table A were obtained during the second visit, to characterize the volunteers (12 women and 14 men). The average standard deviation and baseline values such as weight, height, body mass index (BMI), body fat percentage (BF%), total body water percentage (TBW%), absolute $\text{VO}_{2\text{peak}}$ ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) and relative ($\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) values are presented. The BF% and TBW% were measured by bioelectrical impedance scale (Tanita® BC 533).

List of NO_3^- rich foods

A list of the foods to be avoided was distributed to the participants before the onset of the study. Most NO_3^- and NO_2^- comes from the diet (vegetable and meat products) contain the highest levels of NO_3^- and bean products contain the highest levels of NO_2^- , which may alter the results of the analyses.

Meat Group: beef, pork, lamb, mutton and liver, embedded (ham, turkey breast, sausage, sausage, bologna) and fish.

Dairy Product Group: cheeses in general.

Vegetable Group: beetroot, lettuce, celery, spinach, pumpkin, canned vegetables, broccoli, arugula, chinese cabbage, escarole, fennel, leek and parsley.

Grain Group: beans.

Beverage Group: gaseous mineral water, malted drinks such as beer, whiskey, wine and teas (mainly herbal and black).

Figure captions:

Figure I. $(\text{CH}_2\text{O})_n$ content of BET and PLA gels.

Figure II. Urea levels in urine in BET and PLA treatments. Values represent means $\pm$ SEM.

Figure III. Respiratory quotient (RQ), borg and heart rate (HR) during the treadmill test at the following intensities: warm-up, moderate and severe. Values represent means $\pm$ SD. Different letters indicate significance in $p < 0.05$, at different time intervals within the same treatment.

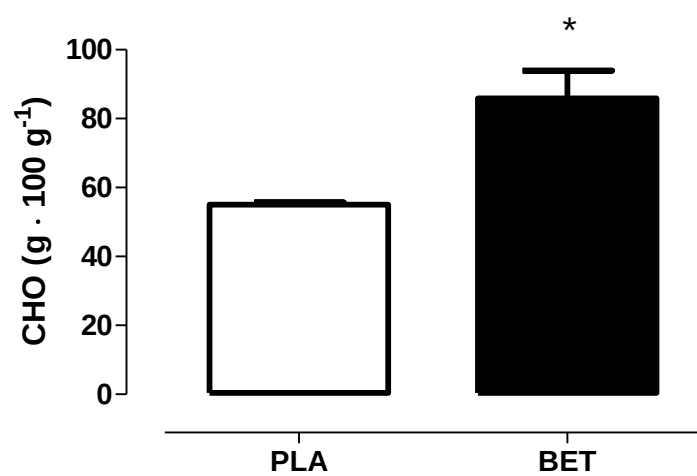
Figure. I

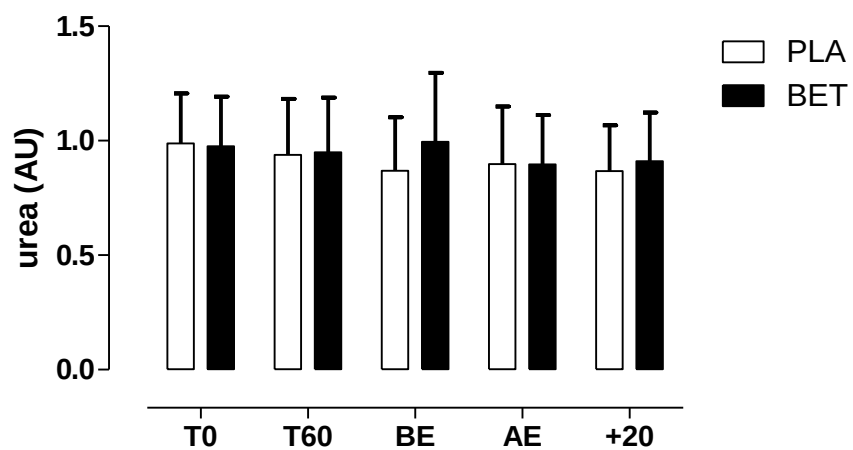
Figure II.

Figure III.

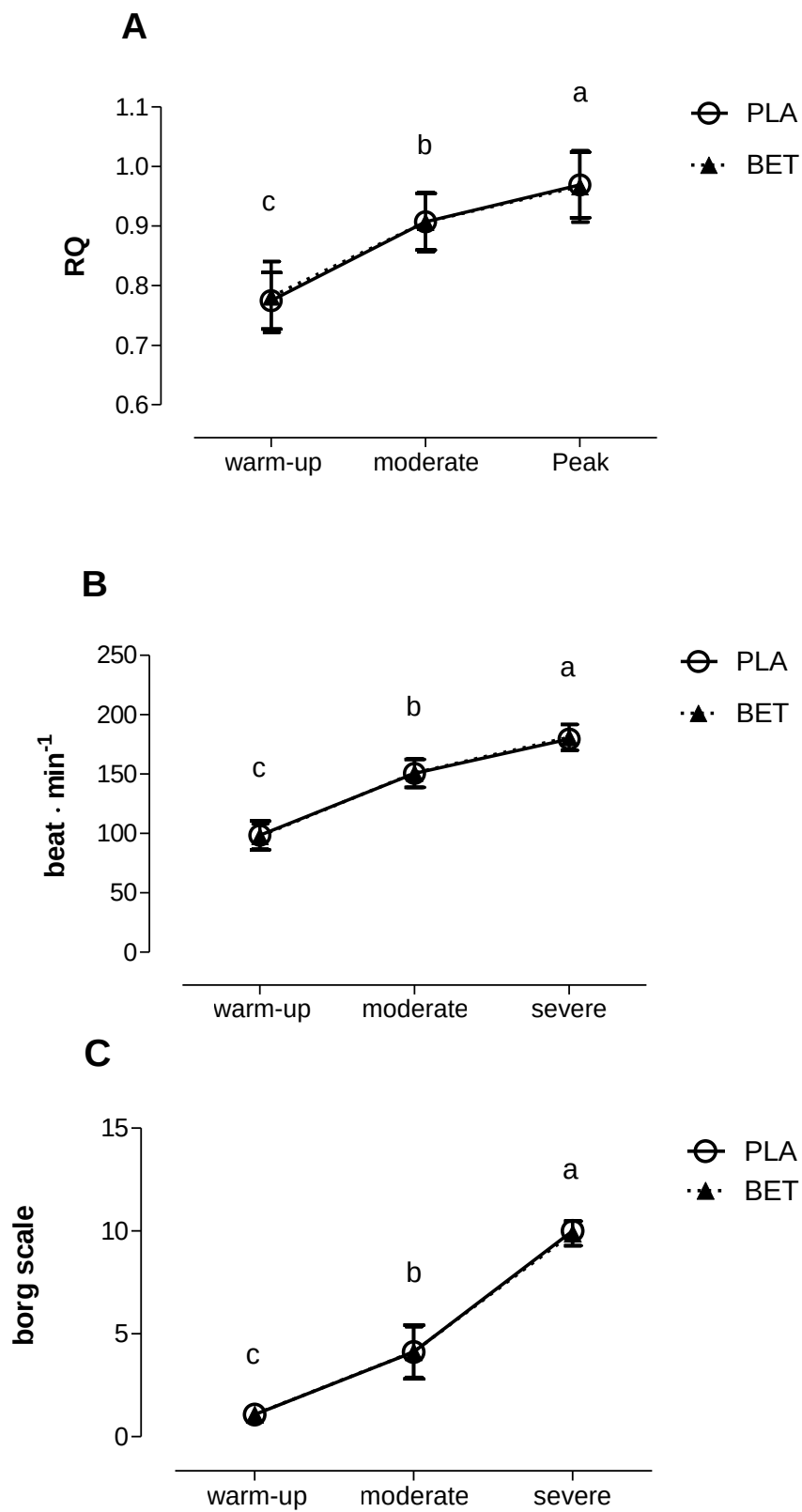


Table A. Characteristics of the participants at the onset of the study.

Gender	Women (n=11)	Men (n=14)
Age (yr)	36.27 ± 5.57	35.36 ± 6.59
Weight (kg)	58.19 ± 3.54**	73.50 ± 8.27**
Height (cm)	163.0 ± 3.69**	174.1 ± 5.93**
BMI (kg.m ⁻²)	21.90 ± 1.09*	24.28 ± 2.70*
BF %	26.17 ± 4.18***	16.24 ± 2.91***
TBW %	51.21 ± 2.93***	58.49 ± 2.35***
VO _{2peak} L·min ⁻¹	3.07 ± 2.26***	4.70 ± 3.94***
VO _{2peak} mL·kg ⁻¹ ·min ⁻¹	52.79 ± 4.57***	64.31 ± 4.71***

The values are mean ± standard deviation. BMI = body mass index;

BF = body fat; TBW = total body water; VO_{2peak} = peak oxygen

uptake. * indicates significance at p<0.05; ** indicates significance

at p<0.0005; *** indicates significance at p<0.0001

6. DISCUSSÃO

O consumo de suco de beterraba, chips e/ou beterraba em pó, como fonte de nitrato, pode ser uma fonte conveniente e alternativa em substituição ao vegetal na sua forma integral e não-processada. Entretanto, informações da composição nutricional das diferentes formas de beterraba precisam ser estabelecidas para orientar a escolha dos consumidores de acordo com a finalidade pretendida.

Com o objetivo de comparar o potencial antioxidante total (TAP) e total de fenólicos, teor de NO_3^- , açúcares (glicose, frutose e sacarose) e ácidos orgânicos (cítrico, málico e ascórbico) no suco de beterraba (BJ), chips (BC), pó (BP) e na beterraba cozida (CB), foi realizado um estudo sistemático de diferentes formas de beterraba processada. (Vasconcellos et al 2015).

Valores significativamente ($p < 0.01$) maiores de TAP foram encontrados em BC ($95.70 \pm 0.53\%$) e BP ($95.31 \pm 0.68\%$) quando comparados aos de CB ($85.79 \pm 0.61\%$) e BJ ($80.48 \pm 0.25\%$). Estes níveis superiores de TAP (%) para a BP e BC poderiam ser resultado do processo de secagem das formulações que promoveu a remoção de água, concentrando, assim, os nutrientes (RATTI, 2001). O processo de secagem provavelmente aumentou as atividades antioxidantes devido à concentração das moléculas bioativas na matriz dos alimentos sem grandes perdas de atividade biológica. As diferenças no nível de TAP entre as diferentes formulações de beterraba também podem ser relacionadas aos teores elevados de ácidos orgânicos, ascórbico e cítrico, que contribuem que são compostos antioxidantes, uma vez que as formulações BC e BP apresentaram teores mais elevados desses compostos em comparação às outras formulações, como discutido no texto abaixo (ATTOE; VON ELBE, 1982; RAVICHANDRAN et al., 2013).

Os níveis de compostos fenólicos totais (TPC) foram significativamente ($p < 0.01$) maiores em BJ ($3.67 \pm 0.61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) e CB ($2.79 \pm 0.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) em comparação à BC ($0.75 \pm 0.06 \text{ GAE mg} \cdot \text{g}^{-1}$) e BP ($0.51 \pm 0.07 \text{ GAE mg} \cdot \text{g}^{-1}$). As formulações BC e BP, que não diferiram significativamente ($p > 0.01$) entre si, foram submetidas aos processos de liofilização e *spray-drying*, respectivamente, o que pode ter promovido uma perda seletiva de compostos, uma vez que os compostos fenólicos são hidrossolúveis e

podem ter sido perdidos com a remoção da água. Esta possibilidade é reforçada pela análise da formulação BJ, que não foi submetida a nenhum processo térmico ou de secagem e, os valores de TPC obtidos em BJ foram superiores aos das outras formulações.

BJ ($12.252,90 \pm 1.105,30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) apresentou teor de NO_3^- significativamente maior ($p < 0,01$) do que BC ($2.031,20 \pm 144,00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), BP ($1.683,50 \pm 264,48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), e CB ($1.649,66 \pm 114,26 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Nenhuma diferença significativa ($p > 0,01$) foi encontrada no teor de NO_3^- entre BC, BP e CB. Perdas hidrofílicas em CB podem ter ocorrido devido à diluição e perda na água de cocção. NO_3^- presente em BJ foi capaz de promover melhora do desempenho em exercícios em ciclo ergômetro e corrida (MURPHY et al., 2012; VANHATALO et al., 2011). Atletas e consumidores que buscam um estilo de vida saudável estão constantemente à procura de ingredientes específicos, às vezes denominados “super alimentos” e suplementos dietéticos que melhoram a saúde e desempenho físico (CLEMENTS et al., 2014). A formulação BP pode ser adicionada à água ou bebidas, sopas, saladas, e iogurtes, e BC pode ser consumido como um lanche durante o exercício físico. Ambas as formulações podem ser formas práticas de ingestão de NO_3^- na dieta, a serem consumidas pelos atletas antes do treino ou em períodos de competições.

Além dessas formas processadas da beterraba, o gel nutricional à base de beterraba pode ser utilizado por atletas, assim como os tradicionais géis de carboidratos, antes e durante o exercício físico, em substituição a bebidas esportivas, a fim de evitar possíveis desconfortos devido ao grande volume de líquido ingerido (da Silva et al 2015). Da Silva et al 2015 demonstraram que o comportamento reológico do gel de beterraba pode proporcionar um escoamento adequado do sachê onde é armazenado para a cavidade oral durante a ingestão do gel.

As quatro formulações mostraram diferenças significativas ($p < 0,01$) nos teores de açúcar total, sendo que as preparações foram listadas a seguir em ordem decrescente: BJ ($963,41 \pm 13,98 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), BC ($627,96 \pm 11,39 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), BP ($444,05 \pm 26,08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), e CB ($249,51 \pm 0,22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). A sacarose foi o açúcar predominante em todas as formulações de beterraba, enquanto glicose e frutose estavam presentes em quantidades menores, provavelmente porque a raiz é o órgão de armazenamento e de

energia em plantas, e em beterrabas o armazenamento de carboidratos ocorre sob a forma de sacarose (RODRÍGUEZ-SEVILLA; VILLANUEVA-SUÁREZ; REDONDO-CUENCA, 1999). A formulação BJ apresentou teores de açúcares significativamente ($P < 0,01$) elevados, em comparação com as outras formulações de beterraba, preservados talvez porque o preparo do suco não prevê tratamento térmico ou secagem. CB apresentou teor reduzido de açúcares totais, em comparação com BJ, BC e BP, provavelmente devido à perda de açúcares através de solubilização em água durante o processo de cozimento (RODRÍGUEZ-SEVILLA et al., 1999).

Processos tecnológicos podem ser vantajosos para a preservação e para aumentar o valor nutritivo dos alimentos devido à concentração de compostos e nutrientes. O consumo de BC pode ser recomendado para atletas de resistência antes, durante e depois do exercício físico, devido a seu elevado teor de carboidratos. A recomendação do *American College of Sports Medicine* (ACSM) para a ingestão de carboidratos durante o exercício varia de 30 a 60 g · h⁻¹ (RODRIGUEZ et al., 2009). Uma porção de 17 chips de BC (54 g) alcançaria a recomendação da ACSM de 30 g de carboidratos. A formulação BC é mais conveniente do que outras formulações de beterraba, como 8 copos de CB (1,3 kg), 3 xícaras de BJ (370 ml) ou 11 colheres de sopa de BP (30 g) (RODRIGUEZ et al., 2009). As formulações BC e BP são mais adequadas para atingir a recomendação diária de ácido ascórbico e BJ, para atingir uma ingestão ótima de açúcares, nitratos, e compostos fenólicos.

BP (47.93 ± 1.32 mg·g⁻¹) e BC (35.53 ± 3.97 mg·g⁻¹) apresentaram valores significativamente ($p < 0.01$) maiores de ácidos orgânicos totais do que BJ (28.80 ± 0.94 mg·g⁻¹) e CB (13.93 ± 0.24 mg·g⁻¹). BP teve 2x a quantidade de ácido ascórbico encontrado em BC e 10x a mais do que CB. A secagem por spray drying e liofilização pode ter contribuído positivamente para a preservação de ácidos orgânicos na beterraba. Ambas formulações, BC e BP, que foram submetidas à secagem, exibiram os níveis maiores de ácidos orgânicos totais. Foi relatado que a degradação do ácido ascórbico é dependente de umidade e temperatura (SANTOS; SILVA, 2008). As formulações chips de beterraba (BC) e pó de beterraba (BP) contêm maiores teores de ácidos orgânicos e potenciais totais de antioxidantes do que o suco (BJ) e a beterraba cozida (CB).

Recentemente, o NO_3^- presente na beterraba vem sendo proposto por melhorar o desempenho físico em exercícios aeróbios e promover redução do $\text{VO}_{2\text{pico}}$ após a suplementação (AFFOURTIT et al., 2015).

Os teores de NO_3^- presentes no gel placebo à base de maçã (PLA) e no gel nutricional à base de beterraba (BET) foram $0,33 \pm 0,15$ e $9,92 \pm 1,97 \text{ mmol} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ($p = 0,014$), respectivamente (Figura 3). Este resultado mostra que a formulação do gel PLA foi eficaz na redução do teor de NO_3^- .

Uma única dose de gel de beterraba não promoveu diferenças significativas no $\text{VO}_{2\text{pico}}$ ($4,00 \pm 0,95$ vs. $3,93 \pm 0,84 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$) e tempo até a fadiga ($390,90 \pm 158,50$ vs. $395,4 \pm 179,60$ seg) entre a suplementação de BET e PLA, respectivamente (Tabela 1).

Estes resultados corroboram com estudos da literatura que investigaram o efeito de uma única dose de suco de beterraba rico em NO_3^- (Cermak, Res et al. 2012, Wilkerson, Hayward et al. 2012, Arnold, Oliver et al. 2015, Puype, Ramaekers et al. 2015) e da suplementação de NaNO_3 (Bescós, Rodríguez et al. 2011) e não obtiveram melhora no desempenho físico. VANHATALO et al. (2010) demonstraram que a suplementação aguda de $\sim 5.2 \text{ mmol NO}_3^- \cdot \text{dia}^{-1}$ com suco de beterraba não promoveu efeito no $\text{VO}_{2\text{pico}}$ e no GET, entretanto após 15 dias de suplementação esses parâmetros se elevaram significativamente. Este resultado indica efeitos distintos nas respostas fisiológicas ao exercício proveniente da suplementação aguda e crônica.

Resultados positivos na performance física foram verificados por grande parte dos estudos que ofertaram suplementação crônica de beterraba, fato que corrobora com evidências apontando benefícios no metabolismo energético muscular, aumento da eficiência da síntese mitocondrial de ATP e/ou eficiência de processos celulares de consumo de ATP (affourtit et al 2015). Os efeitos cumulativos da suplementação do NO_3^- podem ser uma das prováveis explicações pelos resultados negativos em desempenho encontrados no presente estudo. Estudos com a suplementação de NO_3^- em longo prazo (4-6 dias) e dose variando de 5,2 a 12,8 mmol/dia com atletas recreacionais, mostraram aumento no desempenho em ciclo ergômetro (BAILEY et al., 2009; CERMAK; GIBALA; et al., 2012; LANSLEY et al., 2011; THOMPSON, C. et al., 2015; VANHATALO et al., 2010). Segundo evidências, indivíduos aerobiamente

treinados possuem adaptações fisiológicas específicas que podem limitar possíveis benefícios provenientes da suplementação de NO_3^- (JAMES et al., 2015). Essas adaptações estão relacionadas com aumento no número de mitocôndrias (LARSEN, F. J. et al., 2011) e aumento da densidade capilar da musculatura esquelética (BRODAL et al., 1977).

As concentrações de glicose no sangue foram mais elevadas ($p < 0,05$) em AE e +20 em PLA do que na suplementação BET (figura 5A). Esses achados estão de acordo com Wylie, Mohr et al. (2013), que encontraram menor concentração de glicose no plasma durante o exercício intermitente de alta intensidade após a suplementação com suco de beterraba ($\sim 8,2 \text{ mmol} / 140 \text{ ml}$ de NO_3^-) do que no tratamento placebo.

O lactato no sangue não diferiu entre BET e PLA, mas apresentou diferenças significativas entre o tempo, mostrando que o exercício aeróbio obteve a mesma intensidade para ambos tratamentos. WYLIE; MOHR; et al. (2013) também não encontraram mudanças no lactato, entre suplementação de NO_3^- e PLA. Contudo, no presente estudo o lactato mostrou o comportamento esperado durante o teste em esteira, se mantendo constante nos tempos T0 e BE ($p > 0.05$), e elevado em AE, seguido de um aumento no tempo +20 ($p < 0.0001$) (figure 5B).

A pressão arterial (BP) sistólica e diastólica não diferiram significativamente entre a suplementação de BET e PLA. Esses resultados estão de acordo com alguns estudos da literatura. MURPHY et al. (2012) não verificaram alterações significativas na BP após uma única porção de $\sim 8 \text{ mmol}$ de NO_3^- na forma de beterraba assada. Estudo com suplementação crônica de NO_3^- ($\sim 8 \text{ mmol} \cdot \text{day}^{-1}$ for 6 days) não observou modificações na BP em ciclistas treinados (Cermak et al 2012). WILKERSON et al. (2012) em estudo com suplementação de única dose ($\sim 6,2 \text{ mmol NO}_3^-$) com ciclistas treinados também não observaram alterações na BP. Parece que além da influência da suplementação aguda para a crônica (4-6 dias), o condicionamento físico pode anular os efeitos da suplementação com NO_3^- na sobre a BP, como citado acima.

Efeitos de redução na SBP em atletas após suplementação de suco de beterraba durante 6 dias, são demonstrados na literatura por diversos autores (BAILEY et al., 2009; LANSLEY et al., 2011).

Concentrações de NO_2^- na urina foram significativamente elevadas em BET comparado a PLA nos tempos BE ($0,049 \pm 0,018$ vs $0,001 \pm 0,000$ mmol $\cdot$ mmol⁻¹ creatinina) e AE ($0,027 \pm 0,011$ vs. $0,001 \pm 0,000$ mmol $\cdot$ mmol⁻¹ creatinina) (Figura 4 A). O pico de NO_2^- ocorreu em 90 min (BE) e se manteve até o término do exercício em AE.

Concentrações de NO_3^- na urina foram significativamente elevadas em BET comparado a PLA nos tempos BE e AE comparado ao PLA. Este resultado comprova que a suplementação de NO_3^- através do gel de beterraba foi eficaz (Figura 4 B). Existe uma consistência em estudos na literatura sobre o pico plasmático de NO_3^- entre 1-3 h após a ingestão, contudo este pico pode variar conforme a fonte (tipo do vegetal) e formulação como géis, cápsulas ou KNO_3 o pico pode ocorrer aproximadamente 1 h após a ingestão (AFFOURTIT et al., 2015).

Existem evidências de que 70 % do NO_3^- ingerido é excretado pela urina e que sua concentração máxima ocorre entre 4–6 h com retorno ao estado basal em 24 h (BARTHOLOMEW; HILL, 1984; PANNALA et al., 2003). No presente estudo, o NO_3^- urinário obteve seu pico com 90 min após a suplementação dos géis, resultados diferentes podem ser explicados pelas varias divergências em ambos estudos, como diferente condicionamento físico dos sujeitos, presença de intervenção com exercício físico e diferentes doses 3.6 mmol NO_3^- no estudo supracitado e $\sim 9.92 \pm 1.97$ mmol $\text{NO}_3^- \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ no presente estudo.

Os níveis de cortisol não diferiram entre os tratamentos BET e PLA ($p = 0,508$), no entanto, esse hormônio obteve um comportamento esperado ao longo do exercício (figura 6). Nos tempos T0 e AE os valores apresentaram-se significativamente mais baixos do que em + 20 em ambos tratamentos. O pico de cortisol ocorreu 20-30 minutos após o término do exercício. Este comportamento é descrito na literatura, após exercício aeróbio intenso há um aumento transiente dos níveis de cortisol, que se prolonga até ao período de descanso (Gawel, Park et al., 1979).

Os valores urinários de ureia não diferiram ($p=0.42$) entre as suplementações BET e PLA. É provável que o aumento urinário de ureia decorrente do exercício aeróbio de alta intensidade só ocorra 24h após o término do exercício, como foi observado em estudo após corrida de 100 km (Décombaz et al, 1979) Eur. J. Appl. Physiol. 41, 61-72). Outro fator que contribui para os resultados encontrados é que não houve ingestão de proteínas durante as visitas BET e PLA do estudo, não promovendo aumento de excreção de ureia na urina.

7. CONCLUSÃO

Todas as formulações de beterraba podem ser convenientes e vantajosas, e a escolha dependerá da preferência sensorial, além da conveniência e praticidade e concentração de nutrientes necessárias para atingir as recomendações dietéticas, de acordo com as necessidades nutricionais dos consumidores.

Uma dose única da nova formulação do gel nutricional à base de beterraba rico em NO_3^- , proporcionou maior excreção de metabolitos relacionados com a síntese de NO, mas não melhorou o desempenho físico de atletas recreacionais em um exercício aeróbio submáximo. Além disso, o gel BET não promoveu alterações em níveis de cortisol e lactato sanguíneos e ureia urinário nos mesmos atletas do estudo.

Estes resultados trazem um questionamento sobre o potencial ergogênico do NO_3^- para aumentar o desempenho de forma aguda em atletas recreacionais.

Estudos adicionais são recomendados para avaliar a suplementação de longo prazo de gel de NO_3^- nesta mesma população.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFOURTIT, C. et al. On the mechanism by which dietary nitrate improves human skeletal muscle function. **Frontiers in physiology**, v. 6, 2015.

AHRENDT, D. M. Ergogenic aids: counseling the athlete. **American Family Physician**, v. 63, n. 5, p. 913-922, 2001.

ÁLVARES, T. S. et al. Acute l-arginine supplementation increases muscle blood volume but not strength performance. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 37, n. 1, p. 115-126, 2012.

ACSM, Health-Related Physical Fitness Testing and Interpretation [Online]. In: ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription, edited by Pescatello LS, Arena R, Riebe D, Thompson PD. Lippincott Williams & Wilkins, p. 1994–2945. www.acsm.org/acess-public-information/books-multimedia. 2014. Edição 9

ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **The FASEB journal**, v. 7, n. 2, p. 349-360, 1993.

ARNOLD, J. T. et al. Beetroot juice does not enhance altitude running performance in well-trained athletes. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, 2015.

ATTOE, E. L.; VON ELBE, J. H. Degradation kinetics of betanin in solutions as influenced by oxygen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 708-712, 1982.

BAIÃO, D. D. S. et al. Beetroot juice increase nitric oxide metabolites in both men and women regardless of body mass. **International journal of food sciences and nutrition**, p. 1-7, 2015.

BAILEY, S. J. et al. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 4, p. 1144-1155, 2009.

BARTHOLOMEW, B.; HILL, M. The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 22, n. 10, p. 789-795, 1984.

BEAVER, W. L.; WASSERMAN, K.; WHIPP, B. J. A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange. **Journal of applied physiology**, v. 60, n. 6, p. 2020-2027, 1986.

BENFORD, D. et al. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. **EFSA Journal**, n. 653, p. 1-131, 2008.

BENJAMIN, N. et al. Stomach NO synthesis. 1994.

BESCÓS, R. et al. Acute administration of inorganic nitrate reduces VO₂peak in endurance athletes. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 10, p. 1979-86, 2011.

BOND JR, V. et al. Cardiorespiratory function associated with dietary nitrate supplementation. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 39, n. 2, p. 168-172, 2013.

BOORSMA, R. K.; WHITFIELD, J.; SPRIET, L. L. Beetroot juice supplementation does not improve performance of elite 1500-m runners. **Med Sci Sports Exerc**, v. 46, p. 2326-2334, 2014.

BORG, G. **Escalas de Borg para a dor eo esforço: percebido**. Manole, 2000. ISBN 8520409326.

BREESE, B. C. et al. Beetroot juice supplementation speeds O₂ uptake kinetics and improves exercise tolerance during severe-intensity exercise initiated from an elevated metabolic rate. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 12, p. R1441-R1450, 2013.

BRODAL, P.; INGJER, F.; HERMANSEN, L. Capillary supply of skeletal muscle fibers in untrained and endurance-trained men. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 232, n. 6, p. H705-H712, 1977.

BRYAN, N. S.; IVY, J. L. Inorganic nitrite and nitrate: evidence to support consideration as dietary nutrients. **Nutrition Research**, v. 35, n. 8, p. 643-654, 2015.

BURNS, R. D. et al. Intercollegiate student athlete use of nutritional supplements and the role of athletic trainers and dietitians in nutrition counseling. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 2, p. 246-249, 2004.

CERMAK, N. M.; GIBALA, M. J.; VAN LOON, L. J. Nitrate supplementation's improvement of 10-km time-trial performance in trained cyclists. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 64, 2012.

CERMAK, N. M. et al. No improvement in endurance performance after a single dose of beetroot juice. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 22, n. 6, p. 470, 2012.

CIESLIK, E.; SIKORA, E. Correlation between the levels of nitrates and nitrites and the contents of potassium, calcium and magnesium in potato tubers. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 525-528, 1998.

CLEMENTS, W. T.; LEE, S.-R.; BLOOMER, R. J. Nitrate ingestion: a review of the health and physical performance effects. **Nutrients**, v. 6, n. 11, p. 5224-5264, 2014.

CUNHA, F. et al. Influence of cardiopulmonary exercise testing protocol and resting VO₂ assessment on % HR_{max}, % HRR, % VO_{2max} and % VO_{2R} relationships. **International journal of sports medicine**, v. 31, n. 5, p. 319-326, 2010.

CURTIS, E. et al. Oxygen regulates tissue nitrite metabolism. **Antioxidants & redox signaling**, v. 17, n. 7, p. 951-961, 2012.

DECOMBAZ, J. et al. Biochemical changes in a 100 km run: free amino acids, urea, and creatinine. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 41, n. 1, p. 61-72, 1979.

DUNCAN, C. et al. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. **Nature medicine**, v. 1, n. 6, p. 546-551, 1995.

GAGO, B. et al. Red wine-dependent reduction of nitrite to nitric oxide in the stomach. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 9, p. 1233-1242, 2007.

GAWEL, M. et al. Exercise and hormonal secretion. **Postgraduate medical journal**, v. 55, n. 644, p. 373-376, 1979.

GILCHRIST, M.; WINYARD, P. G.; BENJAMIN, N. Dietary nitrate—good or bad? **Nitric Oxide**, v. 22, n. 2, p. 104-109, 2010.

GOVONI, M. et al. The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 4, p. 333-337, 2008.

GREEN, L. C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 12, p. 7764-7768, 1981.

HERNÁNDEZ, A. et al. Dietary nitrate increases tetanic $[Ca^{2+}]_i$ and contractile force in mouse fast-twitch muscle. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 15, p. 3575-3583, 2012.

HERNANDEZ, J. L. et al. High-Performace Liquid Chromatographic Determination of Mono-and Oligosaccharides in Vegetables with Evaporative Light-Scattering Detection and Refractive Index Detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 36, n. 6, p. 293-298, 1998.

HOBBS, D. A. et al. Blood pressure-lowering effects of beetroot juice and novel beetroot-enriched bread products in normotensive male subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 11, p. 2066-2074, 2012.

HOON, M. W. et al. The effect of nitrate supplementation on exercise performance in healthy individuals: a systematic review and meta-analysis. **Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab**, v. 23, n. 5, p. 522-532, 2013.

HORD, N. G. Dietary nitrates, nitrites, and cardiovascular disease. **Current atherosclerosis reports**, v. 13, n. 6, p. 484-492, 2011.

HORD, N. G.; TANG, Y.; BRYAN, N. S. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. **The American journal of clinical nutrition**, v. 90, n. 1, p. 1-10, 2009.

JAMES, P. E. et al. Nitrate pharmacokinetics: Taking note of the difference. **Nitric Oxide**, 2015.

JEUKENDRUP, A. E.; KILLER, S. C. The myths surrounding pre-exercise carbohydrate feeding. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 57, n. Suppl. 2, p. 18-25, 2010.

KAPIL, V. et al. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. **Hypertension**, v. 65, n. 2, p. 320-327, 2015.

KAPIL, V.; WEBB, A.; AHLUWALIA, A. Inorganic nitrate and the cardiovascular system. **Heart**, v. 96, n. 21, p. 1703-1709, 2010.

KATAN, M. B. Nitrate in foods: harmful or healthy? **The American journal of clinical nutrition**, v. 90, n. 1, p. 11-12, 2009.

KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. **American journal of clinical pathology**, v. 100, n. 5, p. 567-575, 1993.

KREUTZ, D. H. et al. Avaliação das Concentrações de Nitrato e Nitrito em Hortaliças Produzidas em Cultivos Convencional e Orgânico na Região do Vale do Taquari-RS. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 2, 2014.

KUJALA, T. S. et al. Phenolics and Betacyanins in Red Beetroot (*Beta vulgaris*) Root: Distribution and Effect of Cold Storage on the Content of Total Phenolics and Three Individual Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5338-5342, 2000.

LANGE, W.; BRANDENBURG, W. A.; BOCK, T. S. D. Taxonomy and cultonomy of beet (*Beta vulgaris* L.). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 130, n. 1, p. 81-96, 1999.

LANSLEY, K. E. et al. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of walking and running: a placebo-controlled study. **Journal of Applied Physiology**, v. 110, n. 3, p. 591-600, 2011.

LARSEN, F. et al. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. **Acta physiologica**, v. 191, n. 1, p. 59-66, 2007.

LARSEN, F. J. et al. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. **Cell metabolism**, v. 13, n. 2, p. 149-159, 2011.

LARSEN, F. J. et al. Dietary nitrate reduces maximal oxygen consumption while maintaining work performance in maximal exercise. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 2, p. 342-347, 2010.

LIDDER, S.; WEBB, A. J. Vascular effects of dietary nitrate (as found in green leafy vegetables and beetroot) via the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. **British journal of clinical pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 677-696, 2013.

LIU, R. H. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 4, n. 3, p. 384S-392S, 2013.

LUNDBERG, J. O. et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. **Nature chemical biology**, v. 5, n. 12, p. 865-869, 2009.

LUNDBERG, J. O.; GOVONI, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 395-400, 2004.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 156-167, 2008.

MALINAUSKAS, B. et al. Supplements of interest for sport-related injury and sources of supplement information among college athletes. **Adv Med Sci**, v. 52, p. 50-54, 2007.

MCCONELL, G. K.; KINGWELL, B. A. Does nitric oxide regulate skeletal muscle glucose uptake during exercise? **Exercise and sport sciences reviews**, v. 34, n. 1, p. 36-41, 2006.

MCCONELL, G. K. et al. Skeletal muscle nitric oxide signaling and exercise: a focus on glucose metabolism. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 303, n. 3, p. E301-E307, 2012.

MCKNIGHT, G. et al. Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. **Gut**, v. 40, n. 2, p. 211-214, 1997.

MERRY, T. L. et al. Skeletal muscle glucose uptake during contraction is regulated by nitric oxide and ROS independently of AMPK. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 3, p. E577-E585, 2010.

MILKOWSKI, A. et al. Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk–benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. **Nitric Oxide**, v. 22, n. 2, p. 110-119, 2010.

MUGGERIDGE, D. J. et al. Acute whole body UVA irradiation combined with nitrate ingestion enhances time trial performance in trained cyclists. **Nitric Oxide**, 2014.

MURPHY, M. et al. Whole beetroot consumption acutely improves running performance. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 4, p. 548-552, 2012.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB Journal**, v. 6, n. 12, p. 3051-3064, 1992.

NEWBERNE, P. M. Nitrite promotes lymphoma incidence in rats. **Science**, v. 204, n. 4397, p. 1079-1081, 1979.

NINFALI, P.; ANGELINO, D. Nutritional and functional potential of Beta vulgaris cicla and rubra. **Fitoterapia**, v. 89, p. 188-199, 2013.

OMAR, S. A.; ARTIME, E.; WEBB, A. J. A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 4, p. 229-240, 2012.

PANNALA, A. S. et al. The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 5, p. 576-584, 2003.

PEELING, P. et al. Beetroot Juice Improves on-Water 500 m Time-Trial Performance, and Laboratory-Based Paddling Economy in National and International-Level Kayak Athletes. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, 2014.

PEREIRA, R. F.; LAJOLO, F. M.; HIRSCHBRUCH, M. D. Consumo de suplementos por alunos de academias de ginástica em São Paulo. **Rev. nutr**, v. 16, n. 3, p. 265-272, 2003.

PUYPE, J. et al. No effect of dietary nitrate supplementation on endurance training in hypoxia. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 25, n. 2, p. 234-241, 2015.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of food engineering**, v. 49, n. 4, p. 311-319, 2001.

RAVICHANDRAN, K. et al. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 670-675, 2013.

RODRÍGUEZ-SEVILLA, M. D.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M. J.; REDONDO-CUENCA, A. Effects of processing conditions on soluble sugars content of carrot, beetroot and turnip. **Food Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 81-85, 1999.

RODRIGUEZ, N. R.; DIMARCO, N. M.; LANGLEY, S. Position of the American dietetic association, dietitians of Canada, and the American college of sports medicine: nutrition and athletic performance. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 3, p. 509-527, 2009.

SANTOS, P.; SILVA, M. Retention of vitamin C in drying processes of fruits and vegetables—A review. **Drying Technology**, v. 26, n. 12, p. 1421-1437, 2008.

SHAHIDI, F.; PEGG, R. B. Nitrite-free meat curing systems: update and review. **Food Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 185-191, 1992.

SPIEGELHALDER, B.; EISENBRAND, G.; PREUSSMANN, R. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. **Food and cosmetics toxicology**, v. 14, n. 6, p. 545-548, 1976.

STAMLER, J. S.; MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiological reviews**, v. 81, n. 1, p. 209-237, 2001.

STEINGROVER, E.; STEENHUIZEN, J.; VAN DER BOON, J. Effects of low light intensities at night on nitrate accumulation in lettuce grown on a recirculating nutrient solution. **NJAS wageningen journal of life sciences**, v. 41, n. 1, p. 13-21, 1993.

STOKES, K. Y. et al. Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, n. 5, p. H1281-H1288, 2009.

THOMPSON, C. et al. Dietary nitrate improves sprint performance and cognitive function during prolonged intermittent exercise. **European journal of applied physiology**, p. 1-10, 2015.

THOMPSON, K. G. et al. Influence of dietary nitrate supplementation on physiological and cognitive responses to incremental cycle exercise. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 193, p. 11-20, 2014.

USDA. **National Nutrient Database for Standard Reference**, Disponível em: < <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/list> >. Acesso em: 11/12.

VANHATALO, A. et al. Acute and chronic effects of dietary nitrate supplementation on blood pressure and the physiological responses to moderate-intensity and incremental exercise. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 299, n. 4, p. R1121-R1131, 2010.

VANHATALO, A. et al. Dietary nitrate reduces muscle metabolic perturbation and improves exercise tolerance in hypoxia. **The Journal of physiology**, v. 589, n. 22, p. 5517-5528, 2011.

VITTI, M. C. D. et al. Comportamento da beterraba minimamente processada em diferentes espessuras de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 623-626, 2003.

WAGNER, D. A. et al. Metabolic fate of an oral dose of 15N-labeled nitrate in humans: effect of diet supplementation with ascorbic acid. **Cancer Research**, v. 43, n. 4, p. 1921-1925, 1983.

WEBB, A. J. et al. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. **Hypertension**, v. 51, n. 3, p. 784-790, 2008.

WHITE, J. W. Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 886-891, 1975.

WILKERSON, D. P. et al. Influence of acute dietary nitrate supplementation on 50 mile time trial performance in well-trained cyclists. **European journal of applied physiology**, v. 112, n. 12, p. 4127-4134, 2012.

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants. **Journal of functional foods**, v. 3, n. 4, p. 329-334, 2011.

WYLIE, L. J. et al. Beetroot juice and exercise: pharmacodynamic and dose-response relationships. **Journal of applied Physiology**, v. 115, n. 3, p. 325-336, 2013.

WYLIE, L. J. et al. Dietary nitrate supplementation improves team sport-specific intense intermittent exercise performance. **European journal of applied physiology**, v. 113, n. 7, p. 1673-1684, 2013.

ANEXO I

DETALHES DO PROJETO PARA COMITÊ DE ÉTICA

ANÁLISE CRÍTICA DOS RISCOS

No presente estudo serão utilizados instrumentos de coletas de dados baseados em procedimentos rotineiros de treinamento aeróbio de corrida dos voluntários recrutados e de biossegurança adquiridas no Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti - HEMORIO.

A beterraba é um alimento de consumo usual na dieta brasileira e mediterrânea. Baseado em evidências científicas publicadas até presente, o consumo de suco de beterraba proposto neste estudo é totalmente seguro e não promoverá aos voluntários efeitos adversos à saúde (Ninfali & Angelino, 2013; Kapil et al., 2010; Vanhatalo et al., 2010). Todos os procedimentos terão a supervisão de uma equipe de profissionais capacitada.

A coleta de sangue venoso aos voluntários será realizada através de cateter estéril e executada por um profissional de enfermagem registrado no Conselho Regional de Enfermagem, em um ambiente limpo e reservado. Dessa forma, apesar de invasivo, o procedimento experimental de coleta de sangue apresenta baixo risco para os voluntários. Entretanto, complicações no momento da coleta de sangue são raras e geralmente de pequeno porte. A coleta de urina será realizada pelo próprio voluntário por meio de recipiente descartável e estéril.

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR E INSTITUIÇÃO ENVOLVIDA

O pesquisador principal e os co-pesquisadores se comprometem a respeitar todas as normas da Resolução n.º 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

CRITÉRIOS DE SUSPENSÃO OU ENCERRAMENTO DA PESQUISA

Testes individuais poderão ser suspensos por solicitação do voluntário e de qualquer motivo que o impeça de realizar os testes.

LOCAL DA PESQUISA E RECURSOS DISPONÍVEIS

A ingestão de suco de beterraba liofilizado (fonte de NO_3^-) ou de placebo (bebida com maltodextrina e corante natural vermelho), os testes de corrida em esteira ergométrica assim como a coleta de sangue e urina serão realizados no Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos - Departamento de Bioquímica - Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LBNA/DBq/IQ/UFRJ). Toda a parte analítica do estudo será realizada no mesmo laboratório. Após a análise, os materiais biológicos (amostras de sangue e urina) serão apropriadamente descartados, não sendo armazenados para investigações futuras.

Todo o material utilizado será adequadamente descartado em coletores específico para material perfurocortantes (Descarpac[®]) e armazenados em coletores brancos identificados com “Material Biológico” para serem coletados pela RODOCON (Empresa terceirizada especializada em retirada de resíduos de serviços de saúde) contratada pela Prefeitura universitária.

Todos os equipamentos e acessórios necessários para a coleta de dados do projeto já estão disponíveis, não onerando a realização do estudo.

SUPORTE A INTERCORRÊNCIAS

Durante o estudo a equipe de pesquisadores terá apoio de um enfermeiro permanente, material de primeiros socorros para casos de intercorrências e cadeira reclinável.

Testes individuais poderão ser suspensos por solicitação do voluntário e de qualquer motivo que o impeça de realizar os testes. Baseado em evidências científicas, o suco de beterraba não têm demonstrado qualquer efeito colateral adverso (Ninfali & Angelino, 2013; Kapil et al., 2010; Vanhatalo et al., 2010). A dose da suplementação de

NO₃⁻ proposta neste estudo é totalmente segura e não promoverá, portanto, qualquer efeito adverso à saúde dos voluntários. Em caso de alguma intercorrência, o estudo será interrompido imediatamente.

BENEFÍCIOS AOS VOLUNTÁRIOS

Cada voluntário receberá um relatório com avaliação de massa corporal e percentual de gordura por bioimpedância assim como o perfil bioquímico: glicemia de jejum, perfil lipídico (LDL-c, HDL-c, colesterol total e triacilgliceróis); Função renal (ureia, creatinina e ácido úrico); Função hepática (TGO e TGP), avaliados no início do estudo por aparelho Reflotron. Os sujeitos serão orientados para um melhor estilo de vida e modificações alimentares relacionadas à atividade física.

ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO
UFRJ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Efeito agudo e crônico da ingestão do suco da beterraba sobre a produção de óxido nítrico, estresse oxidativo, recuperação muscular e desempenho físico em atletas de alto rendimento.

Versão 12/12/13

Resolução n.º 466/12 do Conselho Nacional de Saúde

Você está convidado a participar do estudo intitulado **“Efeito imediato e em longo prazo da ingestão do suco da beterraba sobre a produção de substância que atua na dilatação de vasos sanguíneos, combate de radicais livres, recuperação dos músculos e desempenho no exercício físico em atletas de alto rendimento”**. Essas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo investigar o efeito agudo e crônico da ingestão do suco da beterraba sobre a produção do óxido nítrico, estresse oxidativo, recuperação muscular e desempenho físico em atletas de alto rendimento. Você será submetido a um tratamento com duração de 3 meses e deverá comparecer 6 vezes em dias alternados ao Laboratório de Análises Avançadas em Biologia Molecular – Departamento de Bioquímica – Instituto de química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LAABBM/DBq/IQ/UFRJ), sala 545, localizado na Cidade Universitária/Ilha do Fundão/Rio de Janeiro/RJ, no período das 07:00 às 10:00. Durante os 3 meses, cada uma das seis visitas ocorrerá da seguinte forma:

1ª Visita: familiarização com o teste de corrida em esteira rolante; realização das seguintes medidas para avaliação da composição corporal: estatura, peso e percentual de gordura corporal.

2ª e 3ª Visitas: jejum de 11 horas (sendo 8 horas até a chegada ao laboratório + 3 horas de permanência no laboratório); coleta de 10 mL de urina e 60 gotas (3 mL) de sangue para medidas de base. Ingestão de 150 mL do suco de beterraba ou 150 mL de uma bebida contendo maltodextrina e corante natural vermelho; teste de corrida em esteira rolante 90 minutos após a ingestão de uma das bebidas; coletas de 10 mL de urina a cada 30 minutos ao longo do teste.

4ª visita (30 dias após a 3ª visita): jejum de 8 horas; coleta de 10 mL de urina e 60 gotas (3 mL) de sangue para medidas de base; teste de corrida em esteira rolante 90 minutos após a ingestão de uma das bebidas; coletas de 10 mL de urina a cada 30 minutos ao longo do teste; recebimento de 30 envelopes de papel laminado contendo beterraba em pó ou placebo de maltodextrina com corante natural vermelho para consumo diário durante os próximos 30 dias.

5ª visita (30 dias após a 4ª visita): jejum de 11 horas (sendo 8 horas até a chegada ao laboratório + 3 horas de permanência no laboratório); coleta de 10 mL de urina e 60 gotas (3 mL) de sangue; teste de corrida em esteira rolante 90 minutos após a ingestão de uma das bebidas; recebimento de 30 envelopes de papel laminado contendo beterraba em pó ou placebo de maltodextrina com corante natural vermelho para consumo durante os próximos 30 dias.

6ª visita (30 dias após a 5ª visita): jejum de 11 horas (sendo 8 horas até a chegada ao laboratório + 3 horas de permanência no laboratório); coleta de 10 mL de amostra de urina e 60 gotas (3 mL) sangue. Teste de corrida em esteira rolante 90 minutos após a ingestão de uma das bebidas.

Em qualquer etapa do estudo ou em caso de dúvidas você poderá contatar o Pesquisador Responsável: Dr. Vânia Margaret Flosi Paschoalin - Professora Adjunta de Pós-graduação do Instituto de Química (PPGCAL/UFRJ)/ Tel: (21) 2562 7266 – paschv@iq.ufrj.br ou o Pesquisador Colaborador: Dr. Thiago da Silveira Álvares - Pesquisador bolsista FAPERJ/ Tel: (21) 99989 6554 – alvares@iq.ufrj.br.

E se você tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ, no seguinte endereço: R. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, n. 255 – Cidade Universitária/Ilha do Fundão/ Rio de Janeiro/RJ – Sala 01 D-46/1º andar - CEP: 21941-913; Tel.: 2562-2480 / Fax: 2562-2481 – Atendimento: Seg - Sex 08h às 15h ou através do e-mail: cep@hucff.ufrj.br; CNPJ: 33.663.683/0053-47.

Para maiores informações procure e leia a Resolução 466, 12 de dezembro de 2012 – Capítulo IV – Consentimento Livre e Esclarecido e o Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa, através do link http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep

Além disso:

1- Você receberá uma lista de alimentos e deverá seguir as recomendações alimentares ali presentes, além de registrar todos os alimentos consumidos em três dias da semana sendo um dos dias um final de semana (Exemplo: alimentos ingeridos segunda, quarta e domingo). Além destes três dias semanais, você deverá registrar os alimentos que consumiu na véspera de cada teste.

2- A aferição da estatura, peso e percentual de gordura corporal, serão realizadas em ambiente limpo e reservado.

3- Você deverá seguir as orientações para o preparo da refeição padronizada na véspera de cada teste.

4- Para o teste de desempenho físico você não deverá realizar qualquer atividade física 24h antes da coleta de dados.

5- A coleta de urina será realizada em ambiente limpo e reservado através de material descartável. As coletas de urina realizadas serão guardadas e utilizadas somente para esta pesquisa, não sendo estocadas para análises futuras.

6- O material biológico (sangue) doado por você será coletado através de agulha estéril (isenta de bactérias, para retirada de sangue) por um enfermeiro registrado no Conselho Regional de Enfermagem, em um ambiente limpo e reservado, analisado e, em seguida, descartado. As coletas de sangue realizadas serão guardadas e utilizadas somente para esta pesquisa, não sendo estocadas para análises futuras.

7- Você poderá sentir um pequeno incômodo, como por exemplo: dor por causa da utilização da agulha para as coletas de sangue, pequena perda de sangue da veia no local da coleta e formação de hematoma (pequeno acúmulo de sangue no local da coleta).

8- Você poderá sentir algum enjoo, apresentar fezes e urinas avermelhadas ao longo do período de ingestão suco de beterraba.

9- Devido ao jejum de 11 horas você poderá sentir uma pequena fraqueza, entretanto você irá receber uma bebida que contém carboidratos (suco de beterraba ou placebo)

antes do exercício. Durante o exercício em esteira rolante você poderá sentir um pequeno desconforto momentâneo no rosto, devido à presença de uma máscara, contudo, após a sua retirada, não haverá mais desconforto e nenhum dano de outra natureza.

10- O estudo irá testar o efeito do consumo do suco da beterraba sobre a produção de substâncias que podem causar danos às células do organismo, substâncias que favorecem a recuperação dos músculos e sobre o desempenho no exercício físico. Somente no final do estudo poderemos apresentar a presença ou não de algum benefício relacionado ao mesmo.

11- Todas as etapas do estudo são inteiramente gratuitas e não há uma relação obrigatória da sua participação até o término do estudo.

12- Você não receberá qualquer tipo de remuneração (ex: pagamento em dinheiro) pela participação no estudo.

13- As informações coletadas de sua participação na pesquisa serão guardadas com segurança, onde serão somente de conhecimento dos pesquisadores envolvidos no projeto e dos profissionais que possam vir a participar da pesquisa, garantindo uma proteção contra qualquer tipo de preconceito ou condenação. Porém, os seus resultados serão utilizados somente para esta pesquisa e/ou para fins educacionais (apresentação em aulas, palestras, publicações, congressos e etc.), sem que seu nome seja identificado.

14- Você terá direito de não participar do projeto de pesquisa ou de retirar a sua autorização a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer perda ou dano, mas deverá notificar aos pesquisadores envolvidos, seja pessoalmente, por e-mail ou telefone.

15- Em caso de interrupções ou problemas durante as etapas neste estudo (motivo comprovado), todos os custos serão de responsabilidade da Instituição envolvida (tratamento médico e indenizações legalmente estabelecidas).

Eu, abaixo identificado, acredito ter recebido informações claras sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o Dr. Thiago da Silveira Alvares, sobre a minha vontade de participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, as etapas a serem realizadas, seus incômodos e riscos, as garantias de segurança e de explicação. Ficou claro também que minha participação gratuita e que tenho garantia ao tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda do atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, tenho conhecimento de que eu e o pesquisador responsável deveremos rubricar (assinatura abreviada) todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Data: ____/____/____

Nome do Sujeito da Pesquisa

Assinatura do Sujeito da
Pesquisa

Assinatura do Pesquisador
Responsável

Data: __/__/__

Nome do Pesquisador
Responsável

ANEXO III

Lista de alimentos restritos 24h antes dos dias da intervenção

Os alimentos abaixo devem ser evitados durante o período de 24h antes das 2^a, 3^a e 4^a visitas.

Grupo das carnes:

- carne bovina, suína, cordeiro, carneiro e fígado
- embutidos (presunto, peito de peru, salsicha, linguiça, mortadela)
- peixe

Grupo dos laticínios:

- queijos em geral

Vegetais:

- beterraba
- alface
- aipo
- espinafre
- abóbora
- legumes enlatados
- brócolis
- rúcula
- couve chinesa
- escarola
- erva-doce
- alho-poró
- salsinha

Grãos

- Feijão

Bebidas:

- água mineral gasosa

- bebidas maltadas como cerveja, whisky
- vinho
- chás (principalmente de ervas e preto)

- ORIENTAÇÕES:

- Você deve levar roupa de corrida, toalha e água. Levarei biscoitos, mas caso queira levar algo para comer, fique à vontade.
- Estas visitas terão duração aproximada de 3-4 horas, então leve algo para se entreter. O laboratório tem wi fi e levarei um tablete para os voluntários utilizarem.
- Antes e após o teste de corrida serão coletadas e aferidas as seguintes variáveis: urina (5 vezes), sangue (3 vezes), pressão arterial (5 vezes), peso, percentual de gordura e água corporal total (bioimpedância, 2 vezes).

RECOMENDAÇÕES PRÉVIAS:

- 2 semanas antes do teste: não consumir suplementos alimentares;
- 48h antes do teste: evitar exercícios como corrida, *spinning* ou bicicleta e musculação membros inferiores;
- 24h antes do teste: não consumir cafeína (mate, café, chocolate, chá verde, branco e preto), cápsulas de cafeína e bebidas alcoólicas;
- São necessárias 8 horas de jejum para o teste. Caso jante cedo, faça um lanche antes de dormir.
- Importante: não escovar os dentes no dia do teste. Suspenda o uso de antisséptico bucal (“bochechos”) por **1 semana antes do teste**.
- Registro alimentar de 24h: na véspera do teste você deverá anotar tudo o que comeu até o jantar, anexo exemplo de formulário.

ANEXO IV
FORMULÁRIO DE REGISTRO ALIMENTAR

Durante 3 dias anotar data, hora, descrever detalhadamente o alimento e também a quantidade consumida deste alimento (conforme exemplo abaixo).

A cada semana do estudo você deverá anotar o que comeu em 3 dias no total, sendo 2 dias de semana e um sábado ou domingo. Você também deverá anotar o que comeu nas 24h que antecedem os testes do estudo.

Data: 13/10/13

Horário	Café da Manhã	Quantidade
8:00	Leite integral Café Açúcar Pão francês Margarina Queijo ou presunto ou peito de peru	1 copo ou 1 xícara 1 copo ou 1 xícara 3 colheres de chá 1 unidade 4 pontas de faca 2 fatias
Horário	Colação	Quantidade
Horário	Almoço	Quantidade
Horário	Lanche da tarde	Quantidade
Horário	Jantar	Quantidade
Horário	Ceia	Quantidade

ANEXO V
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
LABORATÓRIO DE ANÁLISES AVANÇADAS EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

QUESTIONÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

1.

Nome: _____

2. Data de nascimento: ____/____/____

3.

Idade: _____

4. Sexo () M () F

5. O (A) Sr.(a) apresenta alguma alteração abaixo?

() Hipertensão

() Triglicerídeo elevado

() Diabetes

() Ácido úrico elevado

() Colesterol elevado

() Câncer

() Doenças pulmonares

() Doenças renais (pedra nos rins)

() Asma

() Alergia ao corante natural vermelho

() Outras doenças _____.

() Doenças cardiovasculares (do

coração)

() Alergia alimentar _____.

() Lesões osteomioarticulares (ossos, articulações ou músculos)

() Alergia a corante vermelho natural

() Intolerância a beterraba

6. Faz uso de alguma medicação e/ou suplementos de vitaminas ou minerais (ex: Sustagen[®], ginseng, complexo B, Centrum[®], Targifor C[®] e outros)? () não () sim

Em caso positivo quais?

_____.

7. Faz uso de algum suplemento nutricional como proteína, aminoácido, carboidrato, cafeína, chá verde? () não () sim

Em caso positivo quais?

_____.

8. Faz uso de algum medicamento anabolizante ou hormônio esteroide? () não () sim

Em caso positivo quais?

_____.

9. Ingere bebidas alcoólicas regularmente? () não () sim

Caso tenha respondido sim qual é a frequência semanal: () 1 vez () 2 vezes () 3 vezes () 4 vezes () 5 vezes () 6 a 7 vezes

10. Fuma? () não () sim

11. Já fumou? () não () sim. Quanto tempo?_____.

12. Pratica corrida há quanto tempo?

() 6 meses () 1 ano () 2 anos () 3 anos ou mais

13. Frequência semanal de prática de corrida:

() 1 vez () 2 vezes () 3 vezes () 4 vezes () 5 vezes () 6 vezes

14. Pratica alguma outra atividade física além da corrida? () não () sim

Caso tenha respondido sim qual atividade e qual frequência semanal:

15. Já participou de algum estudo envolvendo a ingestão de alimentos e/ou suplementos de vitaminas ou minerais? () não () sim



**XXIV CONGRESSO
BRASILEIRO
DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**



sbCTA
Sociedade Brasileira de
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Homenagem pelo Centenário
do Dr. André Tosello



Prof. Dr. Leopoldo Herman
Homenagem - 110 Anos



**IV CONGRESSO DO INSTITUTO NACIONAL DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE FRUTOS TROPICAIS**






CERTIFICADO

DIEGO DOS SANTOS BAIÃO

Apresentou o Resumo intitulado **Comparison of Total Antioxidant Potential and Sugar content of Beetroot Juice, Chips, Powder and Cooked beetroot** na forma de PÔSTER, de autoria de: **Julia Vasconcelos, Davi Silva, Diego dos Santos Baião, Anna Paola Pierucci, Vania Paschoalin, Thiago Silveira Alvares** no XXIV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (XXIV CBCTA) e no IV Congresso do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Frutos Tropicais, realizados no período de 25 a 29 de setembro de 2014, no Centro de Convenções de Sergipe, em Aracaju.



Prof. Dr. Narenda Narain
Presidente do XXIV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Presidente do IV Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais
Presidente da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos



ANEXO VII

Forwarded message -----

From: **Food Science and Biotechnology** <kosfost2@kosfost.or.kr>

Date: Fri, Sep 11, 2015 at 11:30 PM

Subject: Final decision for manuscript `E2015-05-060`.

To: gpcna.ufri@gmail.com

Food Science and Biotechnology

- **Manuscript ID** : E2015-05-060
- **Manuscript Title** : Comparison of Total Antioxidant Potential, Total Phenolic Content, Nitrate, Content of Sugars and Organic Acids in Beetroot Juice, Chips, Powder and Cooked Beetroot

Dear Thiago Alvares:

We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in *Food Science and Biotechnology* (FSB).

As specified in the 'Instructions to Authors', the journal requests that you upload the final version of your manuscript using the 'Upload Final Version' feature by clicking 'Completed Manuscript' under 'Completed'. You should upload your manuscript file and TIFF or EPS figure file(s) as a compressed ZIP file for publication.

Please note that all future communication regarding production of this manuscript should be directed to the FSB Managing Editor. The manuscript will go into production and you will receive a galley proof by e-mail in due course. Once you have corrected the proof, the manuscript will then be published on-line at the FSB on-line submission site ahead of its appearance in the printed journal.

Thank you for your support of FSB. I look forward to seeing more of your work in the future.

Sincerely,

Eunok Choe, Ph.D.

Editor-in-Chief

Food Science and Biotechnology

The Korea Science and Technology Center #605, 22, Teheran-ro 7-gil, Gangnam-gu, Seoul 135-703, Korea

Tel: 82-2-566-9937, 82-2-566-5412

Fax: 82-2-553-8453

E-mail: kosfost2@kosfost.or.kr

Homepage: <http://www.fsnb.or.kr>

2010 © Copyright Food Science and Biotechnology. All Rights Reserved. / Powered by INFOrang.co., Ltd