

KELLY APARECIDA DIAS

EFEITO DO CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE ADICIONADO DE CURCUMINA NO BALANÇO OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E HISTOPATOLOGIA DO MÚSCULO DE RATOS *Wistar* SUBMETIDOS A EXERCÍCIO EXAUSTIVO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Ceres Mattos Della Lucia

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Seção de Catalogação e Classificação da
Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa – Campus Viçosa**

T

D541e
2021

Dias, Kelly Aparecida, 1995-

Efeito do concentrado proteico de soro de leite adicionado de cúrcuma no balanço oxidativo, inflamação e histopatologia do músculo de ratos Wistar submetidos a exercício exaustivo / Kelly Aparecida Dias. - Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (116 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Inclui anexos.

Orientador: Ceres Mattos Della Lucia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.050>

Modo de acesso: World Wide Web.

I. Exercícios físicos. 2. Exercícios aeróbicos. 3. Natação. 4. Cúrcuma. 5. Antioxidantes. 6. Citocinas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição II. Título.

CDD 22. ed. 613.282

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB6 2523

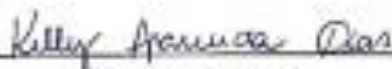
KELLY APARECIDA DIAS

EFEITO DO CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE ADICIONADO DE CURCUMINA NO BALANÇO OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E HISTOPATOLOGIA DO MÚSCULO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A EXERCÍCIO EXAUSTIVO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiarum*.

APROVADA: 09 de agosto de 2021

Assentimento:



Kelly Aparecida Dias
Autora



Ceres Mattos Della Lucia
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças, coragem e serenidade para seguir. Aos meus pais, irmão e namorado pelo apoio incondicional de sempre. Agradeço imensamente à minha orientadora Ceres, pela confiança e apoio. Minha gratidão e admiração por todos vocês é enorme! Aos queridos colegas do nosso laboratório de Análises de Vitaminas, aos meus coorientadores e aos integrantes dos laboratórios de Patologia, Biologia, Imunovirologia e BioEx, obrigada pela disponibilidade, pela ajuda com as análises, pelas leituras cuidadosas e parceria! Compartilhei esse mestrado com pessoas que tenho grande admiração e carinho. Obrigada por compartilharem comigo suas experiências e conhecimentos, este trabalho é resultado da soma dessas forças. Agradeço também aos meus amigos de toda a vida de Teixeira e Viçosa pelo apoio, torcida e por fazerem essa caminhada mais leve e feliz.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento. À FAPEMIG pela concessão da bolsa, ao CNPq e CAPES pelo financiamento. O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) (código de financiamento 428701/2018-3).

Muito obrigada a todos!

RESUMO

DIAS, Kelly Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2021. **Efeito do concentrado proteico de soro de leite adicionado de curcumina no balanço oxidativo, inflamação e histopatologia do músculo de ratos *Wistar* submetidos a exercício exaustivo.** Orientadora: Ceres Mattos Della Lucia.

Exercícios físicos extenuantes podem levar ao desequilíbrio fisiológico, causando alterações musculares como danos oxidativos e inflamação. Nesse sentido, compostos bioativos têm sido estudados, devido aos seus efeitos antioxidante e anti-inflamatório, importantes para o controle metabólico. Assim, destaca-se a curcumina (CCM), adicionada a uma proteína de alto valor biológico, como o concentrado proteico de soro de leite (*whey protein* - WP), que pode promover benefícios adicionais à saúde. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de CCM ao concentrado proteico de soro de leite (WPC) no balanço oxidativo, inflamação e na histopatologia muscular de ratos *Wistar* submetidos a um protocolo agudo de exercício físico exaustivo. Os animais foram alocados em 6 grupos experimentais (n=8): G1: dieta padrão (AIN-93M); G2: AIN-93M submetido a teste de exaustão (AIN-93M TE); G3: *whey protein* concentrado adicionado de curcumina (WPC+CCM); G4: WPC + CCM submetido a teste de exaustão (WPC+CCM TE); G5: curcumina (CCM); e G6: CCM submetido a teste de exaustão (CCM TE). O teste de exaustão (TE) em natação foi realizado após 4 semanas de experimento e, 24 horas após, os animais foram eutanasiados. O tecido muscular foi coletado para avaliação do estresse oxidativo, inflamação e histopatologia. Além disso, foram analisados as concentrações de lactato sanguíneo. O consumo do WPC+CCM, nos animais submetidos ao TE, aumentou as concentrações da enzima catalase (CAT) em comparação ao mesmo grupo não submetido ao TE (WPC+CCM). O mesmo foi observado no grupo CCM TE vs. CCM. As concentrações da enzima glutatona (GST) também foram maiores no grupo CCM TE vs. CCM. Além disso, o consumo de WPC+CCM foi capaz de reduzir os níveis de peroxidação lipídica em período de exaustão (WPC+CCM TE vs. WPC+CCM). As concentrações de proteína carbonilada foram menores no grupo CCM TE quando comparadas às concentrações apresentadas pelo grupo AIN-93M TE e WPC+CCM TE. O consumo de WPC+CCM e CCM aumentaram a concentração de óxido nítrico nos animais. A expressão gênica de interleucina – 6 (IL-6) foi menor e a expressão de interleucina -10 (IL-10) foi maior nos grupos WPC+CCM e CCM, bem como nos grupos WPC+CCM TE e CCM TE. A ingestão do WPC+CCM e/ou da CCM mostrou, ainda, redução na inflamação, aumento da área de fibra muscular e do diâmetro das fibras musculares e menores áreas de tecido conjuntivo. As

concentrações de lactato após o teste exaustivo em natação foram menores no grupo WPC+CCM. Assim, pode-se concluir que a associação do WPC+CCM age de forma positiva reduzindo a inflamação, melhorando o balanço oxidativo e as variáveis histopatológicas, além de diminuir a fadiga decorrente do exercício exaustivo em natação.

Palavras-chave: Exercício físico. Exercício aeróbico. Natação. Cúrcuma. Antioxidantes. Citocinas inflamatórias.

ABSTRACT

DIAS, Kelly Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2021. **Effect of *whey protein concentrate admixture of curcumin on oxidative balance, inflammation and muscle histopathology in Wistar rats submitted to exhaustive exercise.*** Adviser: Ceres Mattos Della Lucia.

Strenuous physical exercise can lead to physiological imbalance, causing muscle changes such as oxidative damage and inflammation. In this sense, bioactive compounds have been studied due to their antioxidant and anti-inflammatory effects, which are important for metabolic control. Thus, curcumin (CCM) stands out, added to a protein of high biological value, such as whey protein concentrate (whey protein - WP), which can promote additional health benefits. The present study aimed to evaluate the effect of adding CCM to whey protein concentrate (WPC) on the oxidative balance, inflammation and muscle histopathology of Wistar rats submitted to an acute exhaustive physical exercise protocol. The animals were divided into 6 experimental groups (n=8): G1: standard diet (AIN-93M); G2: AIN-93M subjected to exhaustion test (AIN-93M TE); G3: whey protein concentrate added with curcumin (WPC+CCM); G4: WPC + CCM subjected to exhaustion test (WPC+CCM TE); G5: curcumin (CCM); and G6: CCM subjected to exhaustion test (CCM TE). The exhaustion test (ET) in swimming was performed after 4 weeks of the experiment and, 24 hours later, the animals were euthanized. Muscle tissue was collected for assessment of oxidative stress, inflammation and histopathology. In addition, blood lactate concentrations were analyzed. The consumption of WPC+CCM, in animals submitted to TE, increased the concentrations of the enzyme catalase (CAT) compared to the same group not submitted to TE (WPC+CCM). The same was observed in the CCM TE vs. CCM. Glutathione enzyme (GST) concentrations were also higher in CCM TE vs. CCM. Furthermore, the consumption of WPC+CCM was able to reduce the levels of lipid peroxidation in the exhaustion period (WPC+CCM TE vs. WPC+CCM). The carbonyl protein concentrations were lower in the CCM TE group when compared to the concentrations presented by the AIN-93M TE and WPC+CCM TE group. The consumption of WPC+CCM and CCM increased the nitric oxide concentration in the animals. The gene expression of interleukin – 6 (IL-6) was lower and the expression of interleukin -10 (IL-10) was higher in the WPC+CCM and CCM groups, as well as in the WPC+CCM TE and CCM TE groups. Intake of WPC+CCM and/or CCM also showed a reduction in inflammation, increased muscle fiber area and muscle fiber diameter, and smaller areas of connective tissue. Lactate concentrations after the exhaustive swimming test were lower in the WPC+CCM group. Thus, it can be

concluded that the association of WPC+CCM acts positively by reducing inflammation, improving oxidative balance and histopathological variables, in addition to reducing fatigue resulting from exhaustive exercise in swimming.

Keywords: Physical exercise. Aerobic exercise. Swimming. Turmeric. Antioxidants. Inflammatory cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenho Experimental.....28

Artigo 1:

Figure 2. PRISMA diagram. Different phases of the selection of studies for conducting qualitative and quantitative analyses.....54

Figure 2. Risk of bias summary: review authors' judgments about the risk of bias item for each included study.....66

Figure 3. Potential positive effects of curcumin supplementation during acute physical exercises in sedentary individuals.....68

Artigo 2:

Figura 1: Análises de estresse oxidativo no músculo.....92

Figura 2: Níveis de expressão gênica de TNF- α , IL-6 e IL-10 no músculo.....95

Figura 3: Seção transversal do músculo de ratos sedentários que foram ou não submetidos ao teste exaustivo.....96

Figura 4: Análise histomorfométrica do tecido muscular.....99

Figura 5: Níveis de lactato sanguíneo coletado em repouso e 2 minutos após a realização do teste exaustivo em natação.....100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais27

Tabela 2. Sequências de primers para análise de qPCR.....33

Artigo 1:

Table 1. PICOS criteria for studies inclusion51

Table 2. Effects of different concentrations and exposure time of curcumin before and/or after intense physical exercise on different markers.....57

Table 3. Main characteristics of the studies included in the systematic review61

Table S1. Full search strategy in PubMed, Scopus, Web of Science and Embase including search terms and filters.....75

Artigo 2:

Tabela 1. Composição das dietas experimentais88

Tabela 2. Sequências de primers para análise de qPCR.....91

Tabela 3. Histomorfometria do músculo de ratos sedentários que foram ou não submetidos a teste exaustivo em natação.....96

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

°C: grau Celsius

µL: microlitro

µm: micrômetro

µmol: micromol

AIN-93M: dieta padrão para roedores em fase de manutenção

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

CAT: catalase

CDNB: 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno

CK: creatina quinase

DCNT: doenças crônicas não transmissíveis

DII: doença inflamatória intestinal

DMIT: dor muscular de início tardio

DNA: ácido desoxirribonucleico

DP: desvio padrão

EROs: espécies reativas de oxigênio

ERNs: espécies reativas de nitrogênio

G: grupo

GPx: glutathiona peroxidase

GSH: glutathiona

GST: glutathiona-S-transferase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IECs: células epiteliais intestinais

IL-10: interleucina-10

IL-1β: interleucina-1β

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

IP-10: interferon gama-10

L: litro

LDH: lactato desidrogenase

LPS: lipopolissacarídeo circulante

Mb: mioglobina

MCP-1: proteína quimioatrativa de monócitos

MDA: malondialdeído

mg: miligrama

n: número

NF- κ B: fator nuclear kappa B

nm: nanômetros

nmol: nanomol

OMS: organização mundial da saúde

PCR: proteína C reativa

pH: potencial hidrogeniônico

PPAR- γ : receptor-gama ativado por proliferador de peroxissomo

qPCR: PCR quantitativo em tempo real

RDA: quota dietética recomendada

RT: transcriptase reversa

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TE: teste de exaustão

TGF-B: fator de transformação do crescimento beta

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

U: unidade

V_{máx}: velocidade máxima

vs: versus

WP: *whey protein*

WPC: *whey protein* concentrado

WPH: *whey protein* hidrolisado

WPI: *whey protein* isolado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. HIPÓTESE.....	15
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
4.1 Exercício físico exaustivo.....	16
4.2 Cúrcuma	18
4.2.1 Curcumina	19
4.2.2 Biodisponibilidade da curcumina	21
4.3 Concentrado proteico de soro de leite (<i>Whey protein</i>).....	22
5. METODOLOGIA	24
5.1 Produto teste.....	25
5.1.1 Curcumina	25
5.1.2 Desenvolvimento de um concentrado proteico de soro de leite (WPC) por <i>spray drying</i>	25
5.1.3 Concentrado proteico de soro de leite (WPC) adicionado de curcumina	25
5.2 Delineamento experimental.....	26
5.2.1 Modelo animal.....	26
5.2.2 Cálculo amostral.....	26
5.2.3 Desenho experimental	27
5.2.4 Protocolo de exercício exaustivo	29
5.2.5 Eutanásia e dissecação dos órgãos.....	29
5.3 Estresse oxidativo – Avaliação do perfil antioxidante	30
5.3.1 Preparação do homogeneizado	30
5.3.2 Quantificação de proteínas totais	30
5.3.3 Malondialdeído (MDA).....	30
5.3.4 Óxido nítrico (ON)	31
5.3.5 Atividade da enzima catalase (CAT)	31
5.3.6 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	31
5.3.7 Atividade da glutatona (GST).....	31
5.3.8 Proteína carbonilada (PCN).....	32
5.4 Expressão gênica.....	32
5.4.1 Extração do RNA	32

5.4.2 PCR quantitativo (qPCR)	32
5.5 Análises histológicas	33
5.6 Análise de lactato sanguíneo durante o teste de exaustão	34
5.7 Aspectos éticos.....	34
5.8 Análises estatísticas	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
6. RESULTADOS.....	47
6.1 ARTIGO 1: Effects of curcumin supplementation on inflammatory markers, muscle damage and sports performance during acute physical exercise in sedentary individuals: a systematic review of clinical trials.....	47
6.2 ARTIGO 2: Efeitos protetores do concentrado proteico de soro de leite adicionado de curcumina no balanço oxidativo, inflamação e na histopatologia do músculo de ratos <i>Wistar</i> submetidos a exercício exaustivo.....	83
7. CONCLUSÃO GERAL	114
ANEXOS	115

1. INTRODUÇÃO

O exercício físico praticado com intensidade, duração e volume adequados, associado a um tempo apropriado de recuperação, pode melhorar o estado de saúde geral, promovendo adaptações positivas nos sistemas fisiológicos (GARBER et al., 2011; STEELE et al., 2017). Por outro lado, exercícios extenuantes de alta intensidade e longa duração podem levar ao desequilíbrio fisiológico, causando prejuízos na reparação muscular, danos musculares e oxidativos, inflamação, catabolismo proteico, além de depressão imunológica (BENETTI et al., 2009; SILVA; MACEDO, 2011; LIRA et al., 2012). Dessa forma, o aumento no estresse oxidativo e na inflamação podem diminuir a função muscular (FUSTER-MUNOZ et al., 2016). Nesse sentido, prevenir ou minimizar o dano ao músculo, bem como reduzir as respostas inflamatórias acentuadas, pode maximizar o treinamento e o desempenho, além de prevenir lesões (TANABE et al., 2015; TANABE et al., 2019).

Antioxidantes endógenos protegem o organismo contra danos oxidativos, principalmente pela ativação da resposta antioxidante. No entanto, em exercícios extenuantes pode haver redução da sua atividade (GOMEZ-CABRERA et al., 2015; RADAK e TAYLOR, 2019). Assim, a oferta de antioxidantes exógenos pode representar uma alternativa para minimizar estes danos. Nesse sentido, a curcumina (CCM), principal composto extraído da cúrcuma (*Cúrcuma longa* L.) tem recebido considerável atenção devido aos seus benefícios, com efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, imunológico reguladores, cardioprotetores, antineoplásicos, hepatoprotetores, entre outros. Assim, a CCM é considerada um composto nutracêutico, uma vez que, além de nutrir, exerce efeitos benéficos no organismo (SHEHZAD et al., 2013; SAMARGHANDIAN et al., 2017; ZHENG et al., 2017; CAO et al., 2018; DAI et al., 2018; DALIU; SANTINI; NOVELLINO, 2018; LIU et al., 2018).

Ainda, o uso de proteínas do soro do leite (*whey protein* - WP) como suplemento alimentar tornou-se comum entre atletas e praticantes de atividade física. Além da sua eficácia e segurança, essas proteínas apresentam alto valor biológico, rápida digestibilidade, absorção e eficiência metabólica, otimizando a recuperação em exercícios extenuantes, o desempenho esportivo e a hipertrofia muscular (BORGES et al., 2001; ATHERTON E SMITH, 2012). Estudos sugerem que a utilização do WP pode atenuar o estresse oxidativo e a inflamação induzidos pelo exercício (XU et al., 2011; KERASIOTI et al., 2012; ATHIRA et al., 2013; KERASIOTI et al., 2013).

Neste estudo investigamos se a associação entre a CCM e o WP, como forma de substituição parcial à oferta de proteína diária, pode prevenir a inflamação acentuada, controlar variáveis antioxidantes e histopatológicas dos animais experimentais, uma vez que essa associação confere ao produto características nutricionais elevadas e potencial antioxidante. A inovação do estudo deve-se ao fato de não ter sido relatado anteriormente os efeitos da associação de curcumina com alta biodisponibilidade à uma proteína de alto valor biológico em relação ao balanço oxidativo, inflamação e integridade do tecido muscular de ratos *Wistar* submetidos a um protocolo de exercício exaustivo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do concentrado proteico de soro de leite (*whey protein* concentrado - WPC) adicionado de curcumina (CCM) no balanço oxidativo, inflamação e histopatologia do músculo de ratos *Wistar* submetidos a um protocolo agudo de exercício físico exaustivo.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar os marcadores oxidativos no músculo dos animais;
- Determinar a expressão gênica de TNF- α , IL-6 e IL-10 no músculo dos animais;
- Avaliar histopatologicamente o tecido muscular dos animais;
- Analisar os níveis de lactato sanguíneo dos animais submetidos ao teste agudo em natação;
- Revisar sistematicamente os efeitos da curcumina em humanos por meio de ensaios clínicos.

3. HIPÓTESE

Espera-se que o WP adicionado de CCM tenha efeito benéfico em relação aos marcadores do estresse oxidativo e que seja capaz de reduzir ou reverter os efeitos inflamatórios induzidos pelo exercício físico extenuante, além de preservar as funções teciduais musculares, proporcionando ação antioxidante e anti-inflamatória, uma vez que esse composto apresenta considerável quantidade de peptídeos bioativos e polifenóis.

Além disso, espera-se que a revisão sistemática auxilie na elucidação dos efeitos benéficos do consumo de curcumina por indivíduos sedentários submetidos à realização de exercício físico exaustivo.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Exercício físico exaustivo

O exercício físico regular praticado de forma adequada pode melhorar o estado de saúde geral e promover adaptações positivas nos sistemas fisiológicos (GARBER et al., 2011; STEELE et al., 2017). Por outro lado, o exercício intenso, exaustivo, de longa duração e período insuficiente de recuperação, pode levar ao desequilíbrio fisiológico, uma vez que o organismo pode não conseguir reparar todo o dano muscular causado, resultando em excessiva produção de radicais livres, fadiga e prejuízos na recuperação muscular (BENETTI et al., 2009; LIRA et al., 2012; He F et al., 2016).

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a defesa antioxidante endógena e a quantidade excessiva de radicais livres gerados nas células. O músculo esquelético é um local de geração de EROs durante a contração provavelmente porque as miofibrilas são naturalmente uma região pró-oxidante. Nesse sentido, a redução da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GSH) aumentam subsequentemente o dano oxidativo às proteínas, lipídios e ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (GOMEZ-CABRERA et al., 2015; RADAK e TAYLOR, 2019).

Além do aumento da produção de EROs, exercícios físicos de alta intensidade podem levar também ao aumento de mediadores inflamatórios devido a um comprometimento no sistema de defesa por antioxidantes (JI LL, 2015; SALLAM & LAHER, 2016). Nesse sentido, estudos mostraram que o exercício agudo aumentou os níveis de malondialdeído no plasma, soro, fígado e em tecidos musculares de ratos *Wistar* (DEMINICE & JORDAO, 2012; PALA, 2018). Ainda, Nogueira et al. (2018) verificaram que ratos não treinados submetidos a exercício intenso de corrida a 80% da sua velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) por 30 min, aumentaram o estresse oxidativo e inflamação.

Exercícios físicos exaustivos e/ou de alta intensidade afetam a homeostase do corpo, como o *status* redox e alteram as funções fisiológicas. A multiplicação dos radicais livres leva ao rompimento da integridade da membrana celular devido à peroxidação lipídica e consequentemente promove a liberação de mediadores inflamatórios pelos macrófagos residentes do tecido estimulando a migração de mais células inflamatórias e consequentemente aumentando o número de macrófagos e outras células inflamatórias no tecido muscular (DEMOPOULOS et al., 1986; WARREN et al., 2001). Assim, o aumento no estresse oxidativo e na inflamação podem diminuir a função muscular (FUSTER-MUNOZ et al., 2016). O

extravasamento das células libera enzimas ou proteínas específicas do citosol no sangue, como creatina quinase (CK), mioglobina (Mb), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), as quais sinalizam dano muscular. Outros biomarcadores como lactato, amônia e ureia são comumente utilizados para avaliar a fadiga (HUANG et al., 2015).

Em estudo com ratos *Wistar* (PALA et al., 2018) foi observado que o exercício agudo aumenta o estresse oxidativo. Por outro lado, o exercício crônico, além de reduzir os danos oxidativos, também reduziu a peroxidação lipídica. Os danos no músculo esquelético causados pelo exercício extenuante podem variar de uma lesão estrutural das fibras musculares até a ruptura do músculo (PALACIOS et al., 2015). Essas lesões musculares podem ser caracterizadas por dores musculares de início tardio (DMIT), redução na força muscular, inflamação transitória, rompimento de fibras musculares e diminuição do desempenho físico (SILVA; MACEDO, 2011; HUANG et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2016).

Kawanishi et al. (2016) mostraram, em um modelo experimental utilizando camundongos, que a inflamação causada por exercício exaustivo é influenciada por mediadores liberados por macrófagos ativados, incluindo citocinas pró-inflamatórias. A infiltração de macrófagos induzida pelo exercício é um fator importante no desenvolvimento de lesão muscular, uma vez que a resposta inflamatória excessiva pode causar danos às miofibrilas (KAWANISHI et al., 2016). As citocinas, por sua vez, controlam a resposta inflamatória, sendo responsáveis pela duração, coordenação e magnitude do processo inflamatório (SILVA; MACEDO, 2011).

Estudos em ratos mostraram que o exercício exaustivo aumentou o nível de ácido ribonucleico responsável pela transferência de informações do DNA (mRNA) e a concentração proteica do fator de necrose tumoral (TNF- α) no músculo esquelético (ROSA NETO et al., 2009; HUANG et al., 2013). Da mesma forma, estudos com humanos mostraram que citocinas pró-inflamatórias, como interleucina IL-1 β , IL-6 e proteína quimioatrativa de monócitos (MCP)-1, eram secretadas após exercícios prolongados (KAWANISHI et al., 2002; KAWANISHI et al., 2003). A IL-6, produzida via sinalização das citocinas pró inflamatórias e das EROs, pode ser considerada o principal agente regulador da fase aguda no exercício físico e sua secreção está relacionada a regulação do metabolismo durante o exercício (CAREY et al., 2006; SILVA; MACEDO, 2011).

Além disso, estudos com humanos mostraram que o exercício físico prolongado causa lesão muscular esquelética, evidenciado pelo aumento nos níveis séricos de enzimas citosólicas,

como creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) (KIM et al., 2007; KIM et al., 2009; HARTY et al., 2019). Em estudos experimentais com ratos, foi demonstrado que o exercício exaustivo, além de aumentar os níveis de CK e LDH, também induziu lesões na estrutura das miofibrilas (MALAGUTI et al., 2009).

O processo inflamatório no pós-exercício, quando este é praticado em intensidade, duração e volume adequados, é benéfico e indispensável para a regeneração e reparo da musculatura danificada. No entanto, exercícios extenuantes de alta intensidade e longa duração podem prejudicar a reparação da musculatura, levar a danos oxidativos, catabolismo proteico, além de causar depressão imunológica (SILVA; MACEDO, 2011; CAMPBELL, CARLINI, FLEENOR 2021).

Dessa forma, prevenir ou minimizar o dano muscular, bem como reduzir as respostas inflamatórias acentuadas, pode maximizar o treinamento e o desempenho, além de prevenir lesões (TANABE et al., 2015). Assim sendo, compostos bioativos com propriedades antioxidante e anti-inflamatória, bem como proteínas do soro de leite e seus hidrolisados, têm sido cada vez mais estudados no campo esportivo, na tentativa de prevenir lesões musculares e melhorar o rendimento de praticantes de atividade física (FUSTER-MUNOZ et al., 2016; CRUM et al., 2017).

4.2 Cúrcuma

A *Cúrcuma longa* L., popularmente conhecida como açafrão-da-terra, é uma planta perene da família Zingiberaceae, cultivada na Índia e em regiões tropicais da Ásia. Análises de composição química mostraram que a cúrcuma contém carboidratos (69,4%), proteínas (6,3%), gorduras (5,1%), minerais (3,5%), e umidade (13,1%) (BAGCHI, 2012). Além disso, os curcuminoides, como curcumina (60-70%), desmetoxicurcumina (20-27%) e bisdesmetoxicurcumina (10–15%) são os principais polifenóis encontrados no rizoma da *Curcuma longa* L. (NELSON et al., 2007; GOEL et al., 2008).

Os polifenóis são metabólitos secundários encontrados em diversos alimentos como frutas, vegetais, sementes e grãos (VINSON et al., 2001; HEWLINGS e KALMAN, 2017). Podem ser classificados como flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e lignanas (SHEN et al., 2012). Investigações sobre o uso de polifenóis intensificaram-se nas últimas décadas devido aos seus potenciais benefícios para a saúde (LIU et al., 2004; JEONG et al., 2011; BEARA et al., 2012; ZIMMER et al., 2012).

O pó do açafrão é considerado um tempero indiano derivado dos rizomas da planta, também muito utilizado para fins terapêuticos (AMMON & WAHL, 1991; SALEHI et al. 2019). A curcuma longa é uma planta herbácea rizomatosa da família do gengibre e tem sido usada em países asiáticos como uma erva medicinal graças às suas propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, antimutagênicas, antimicrobianas e anticâncer (HEWLINGS e KALMAN, 2017). Seus principais benefícios estão associados aos seus curcuminoides. Os curcuminoides foram reconhecidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) como substâncias seguras e toleráveis (HEWLINGS e KALMAN, 2017).

4.2.1 Curcumina

A curcumina (CCM) (1E,6E) - 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona), um componente amarelo-alaranjado, foi isolada pela primeira vez por Vogel em 1815 e estruturalmente caracterizada por Lampe e Milobedeska em 1910 (HATCHER et al., 2008). Também chamada de difoilmetil, é um polifenol natural de baixo peso molecular e o principal curcuminóide do açafrão (*Cúrcuma longa L.*) (AGGARWAL et al., 2003; CHIBA et al. 2011; ZHU et al., 2017). A molécula consiste em dois 4-hidroxi-3-metoxifenil ligados a uma ponte de carbono insaturada a α , β -dicetona, possui a fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$, e peso molecular de 368,385 g / mol. A curcumina exibe um tautomerismo de ceto-enol com as formas de ceto e enol existentes em determinadas proporções, quando dissolvida, a forma enol predomina (ZHU et al., 2017).

Inúmeros estudos apontam os benefícios da curcumina devido aos seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, imunológicos reguladores, antineoplásicos, antimutagênicos, antiangiogênicos, hepatoprotetores, trombossuppressores e cardioprotetores (SHEHZAD et al., 2013; SAMARGHANDIAN et al., 2017; ZHENG et al., 2017; CAO et al., 2018; DAI et al., 2018; LIU et al., 2018).

O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a sua remoção por mecanismos antioxidantes leva a uma sobrecarga tecidual conhecida como estresse oxidativo. Este processo de oxidação de biomoléculas manifesta-se por meio do dano oxidativo contra células e conseqüentemente nos tecidos, desencadeando eventos patológicos e alterando funções celulares (ALMONDES et al., 2010; BARBOSA et al., 2010; CAMPBELL, CARLINI, FLEENOR 2021). Antioxidantes endógenos e exógenos podem proteger o organismo dos efeitos deletérios dos radicais livres, atenuando o progresso de muitas doenças crônicas (DEROCHETTE et al., 2013). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a ação antioxidante da

curcumina contribui para seus efeitos terapêuticos, uma vez que ela diminui os marcadores sistêmicos do estresse oxidativo. Sua estrutura química mostra que os grupos de doação de elétrons, especialmente o grupo hidroxila fenólico, são os principais contribuintes para sua atividade antioxidante (EL-BAHR, 2015; SAHEBKAR et al., 2015).

Dessa forma, a curcumina pode reduzir o estresse oxidativo celular, por meio da remoção de diferentes formas de radicais livres, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (MENON e SUDHEER, 2007; TAPIA et al., 2014; ZHENG et al., 2017). A curcumina também pode aumentar a atividade das enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona-S-transferase (GST) (EL-BAHR, 2015; SAHEBKAR et al., 2015). Além disso, por ser um composto lipofílico, a curcumina é eficiente como eliminadora de radicais peroxil, considerada um antioxidante de quebra de cadeia (PRIYADARSINI et al., 2003). A curcumina pode também inibir enzimas geradoras de EROs, como lipoxigenase/ ciclooxygenase e xantina hidrogenase/ oxidase (LIN et al., 2007).

Além de exercer influência em inúmeras doenças crônicas, os processos patológicos do estresse oxidativo relacionam-se aos da inflamação. Possivelmente coexiste um processo de estímulo oxidativo e inflamatório nas células musculares após a prática de exercícios físico exaustivos. As células inflamatórias liberam radicais livres e EROs, em um processo conhecido como explosão respiratória, no qual estas espécies radicalares extravasam da células promovendo lesão tecidual. Conseqüentemente, durante este extravasamento, células inflamatórias presentes normalmente no tecido produzem mediadores inflamatórios que atraem mais células de defesa, em especial fagócitos, que instalam um processo inflamatório tecidual, levando ao estresse oxidativo. Do mesmo modo, espécies reativas de oxigênio/nitrogênio podem iniciar uma cascata de sinalização intracelular que melhora a expressão gênica pró-inflamatória, demonstrando a relação entre estresse oxidativo e inflamação (JURENKA, 2009; BISWAS, 2016).

A inflamação é um mediador para diversas doenças e pode ser causada por fatores externos ou intrínsecos. Além da redução do estresse oxidativo, a curcumina também pode proteger contra a inflamação por meio da modulação de citocinas pró- inflamatórias e vias de sinalização, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), receptor-gama ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR- γ) e proteína de diferenciação mieloide (WANG et al., 2015; ANTOINE e GIRARD, 2015; LI et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

O fator de necrose tumoral α (TNF- α) é um mediador da inflamação em muitas doenças. Seu efeito é regulado pela ativação de um fator de transcrição, o NF- κ B. Além do TNF- α , o NF- κ B também é ativado pela maioria das citocinas inflamatórias e por bactérias gram-negativas, vírus, estresse químico, físico e outros fatores causadores de doenças. Portanto, agentes que regulam negativamente o NF- κ B e os produtos gênicos regulados por NF- κ B têm eficácia potencial contra inúmeras doenças. A curcumina mostrou efetividade ao regular a ativação de NF- κ B (PANAHI et al., 2016; SAHIN et al., 2016).

Além disso, a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias pode reduzir a incidência de inflamação, uma vez que a resposta inflamatória é caracterizada por produção excessiva destas citocinas, como IL-6, IL-1 β e TNF- α (WU e WANG, 2014). O pré-tratamento com curcumina em células epiteliais genitais humanas anulou a regulação positiva das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e das quimiocinas IL-8 e proteínas induzidas por interferon gama 10 (IP-10) (FERREIRA et al., 2015).

Por outro lado, a regulação positiva de citocinas anti-inflamatórias é fundamental para diminuir a resposta inflamatória. Os resultados de um estudo experimental (SONG et al., 2018) mostraram que a curcumina pode inibir a inflamação e aumentar os macrófagos do tipo M2 em detrimento aos macrófagos M1 em tecidos adiposos brancos, promovendo a produção de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, também foi observada a capacidade da curcumina em reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Outro estudo demonstrou em macrófagos cultivados que transportadores nanoestruturados carregados com curcumina são absorvidos por estes macrófagos, que aumentam a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β . Ainda, ocorre redução da produção de fatores pró-inflamatórios (WANG et al., 2016). Portanto, a curcumina exibe atividade anti-inflamatória por meio da regulação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e IL-1 β , e também através da regulação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β .

4.2.2 Biodisponibilidade da curcumina

Apesar de os benefícios relatados por seus mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes, os resultados terapêuticos e uso clínico da curcumina são limitados devido a sua baixa biodisponibilidade, absorção intestinal e propriedades hidrofóbicas, levando à baixa solubilidade (ANAND et al., 2007; SHAO et al., 2012; IMAIZUMI, 2015). Pesquisas

relacionadas à farmacocinética da curcumina revelaram que sua baixa absorção no plasma e tecidos, rápido metabolismo e excreção reduzem consideravelmente sua biodisponibilidade (ZHANG et al., 2012; AROZAL et al., 2019; SALEHI et al., 2019).

Além disso, a curcumina é pouco solúvel em água e suscetível à degradação, principalmente em condições alcalinas. Em condição de pH > 7, a curcumina é degradada para Trans-6- (40-hidroxi-30-metoxifenil) -2, 4- dioxo-5-hexanal, ácido ferúlico, ferroilmetano e vanilina em 30 minutos. Sob condições ácidas, sua degradação é menor, com menos de 20% da curcumina decomposta em 1 hora (LIU et al., 2016). Quando ingerida por via oral, a maior parte da curcumina é excretada pelas fezes e apenas uma pequena porção é absorvida no intestino (HOEHLE et al., 2006).

Inúmeros estudos foram realizados a fim de melhorar a biodisponibilidade oral da curcumina, os quais investigaram sistemas de administração, incluindo suspensões submicrônicas, complexos de fosfatidilcolina e nanopartículas lipídicas sólidas (GOTA et al., 2010; SASAKI et al., 2011). Nesse sentido, a Theracurmin[®], uma curcumina altamente biodisponível desenvolvida por tecnologia micronizada, foi capaz de aumentar significativamente a biodisponibilidade e a solubilidade em água, quando comparada à curcumina convencional. Em estudos pré-clínicos e clínicos, a absorção de Theracurmin[®] foi superior em 30 vezes a de curcumina. Além disso, a sua concentração plasmática máxima aumentou mais de 50 vezes quando a Theracurmin foi usada (SASAKI et al., 2011).

4.3 Concentrado proteico de soro de leite (*Whey protein*)

A massa muscular esquelética é mantida pelo equilíbrio nas taxas de síntese e degradação de proteínas musculares e influencia a força, o desempenho físico, além de promover regulação metabólica. Baixos níveis ou perda de massa muscular estão relacionados ao aumento do risco de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), além de limitações funcionais e fragilidade. Dessa forma, a manutenção e o aumento da massa muscular durante a vida é fundamental para otimizar o desempenho e melhorar a saúde (DEVRIES & PHILLIPS, 2015).

As proteínas são consideradas o mais abundante componente estrutural e funcional das células do corpo (COSTA & PELUZIO, 2008) e diferem em qualidade de acordo com seu perfil de aminoácidos, digestibilidade e biodisponibilidade (FAO/WHO Expert Consultation, 1991). A caseína e as proteínas do soro de leite (do inglês *whey protein* – WP) correspondem a 80% e

20% do total de proteínas do leite, respectivamente. As proteínas do soro do leite têm sido altamente empregadas como suplemento alimentar devido à sua eficácia e segurança. O uso do WP tornou-se comum entre atletas e praticantes de atividade física, devido ao seu alto valor biológico, rápida digestibilidade, absorção e eficiência metabólica, otimizando a recuperação em exercícios extenuantes, o desempenho esportivo e a hipertrofia muscular (BORGES et al., 2001; ATHERTON e SMITH, 2012).

As proteínas do leite são fonte de aminoácidos e possuem alta concentração de aminoácidos essenciais (45-55 g/100 g) (BUCCI, 2000; PENNINGGS et al., 2011). Além disso, o WP apresenta aminoácidos de cadeia ramificada (26%) e glutamato (6%), que pode ser utilizado para síntese de glutamina nos músculos (SOUZA et al., 2009). Nesse sentido, essas proteínas podem ser utilizadas para preservar a glutamina muscular, a qual é bastante utilizada no exercício físico e por células imunes (NEWSHOLME, CALDER, 1997; NEWSHOLME, 2001; WEITZEL et al., 2010). Dessa forma, as proteínas do soro do leite podem proteger o organismo durante a prática de exercícios físicos, além de fortalecer o sistema imunológico (CASTELL, NEWSHOLME, 1997; SOUZA et al., 2009).

Adicionalmente, o WP apresenta maior resposta na síntese proteica do que a caseína, devido a sua rápida digestibilidade e absorção, resultando em um aumento imediato de aminoácidos na corrente sanguínea (DANGIN et al., 2003; BURD et al., 2009; TANG et al., 2009; WEST et al., 2010; PENNINGGS et al., 2011). Além disso, o alto conteúdo do aminoácido leucina, encontrado no WP, também influencia a síntese proteica, aumentando os seus marcadores (ATHERTON et al., 2010).

Como visto, o exercício agudo tem sido associado ao aumento do estresse oxidativo e à inflamação. Recentemente, a capacidade antioxidante e anti-inflamatória das proteínas lácteas, principalmente do soro de leite, tem recebido considerável atenção. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a proteína de soro de leite apresenta propriedades antioxidantes, devido a sua capacidade de aumentar a disponibilidade de glutatona e a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx. Além disso, desempenha papel na regulação de vias intracelulares relacionadas à produção de EROs (DIMITRIOS et al., 2016).

Ao investigar o efeito antioxidante da proteína do soro de leite contra a toxicidade do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) usando mioblastos, um estudo *in vitro* mostrou que a proteína do soro de leite foi capaz de prevenir a toxicidade induzida por peróxido de hidrogênio. Ainda,

foi eficaz em reduzir a peroxidação lipídica e modular a defesa antioxidante endógena, por meio do aumento da atividade da glutatona, catalase e superóxido dismutase (XU et al., 2011).

Outro estudo avaliou a ingestão oral ou intraperitoneal de *whey protein* hidrolisado em camundongos albinos com hepatonefrotoxicidade. Os autores observaram atividades aumentadas de enzimas antioxidantes, como CAT, SOD e GPx, além de uma redução nas substâncias reativas ao TBARS, sugerindo que as proteínas do soro do leite tem a capacidade de aprimorar o sistema antioxidante endógeno *in vivo* sob condições patológicas (ATHIRA et al., 2013). Além disso, propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes agudas foram atribuídas à proteína do soro de leite após ciclismo exaustivo em estudos realizados com humanos. Os autores observaram redução significativa nos níveis de IL-6, proteína C reativa (PCR) e redução do TBARS frente ao consumo de proteína oriunda do soro de leite (KERASIOTI et al., 2012; KERASIOTI et al., 2013).

Esses achados sugerem que a utilização das proteínas do soro de leite pode atenuar o estresse oxidativo e a inflamação induzidos pelo exercício. A bioatividade das proteínas do soro de leite é observada em diferentes produtos comerciais (*whey protein* isolado –WPI; *whey protein* concentrado – WPC; *whey protein* hidrolisado WPH), além de ser aumentada por hidrólise enzimática e resistente a diferentes métodos de processamento. Aponta-se que aminoácidos livres liberados durante a hidrólise também contribuam para essa bioatividade (CORROCHANO et al., 2018).

5. METODOLOGIA

O presente estudo é uma continuidade das investigações dos resultados existentes de um estudo inicial. Em estudo anterior foi desenvolvido um concentrado proteico de soro de leite (*whey protein*) adicionado de curcumina e, então, foram avaliados os efeitos do *whey protein* adicionado de curcumina no estresse oxidativo e inflamação no fígado de ratos *Wistar* submetidos a exercício físico agudo e exaustivo. O *whey protein* adicionado de curcumina foi capaz de reduzir citocinas inflamatórias, bem como a concentração de produtos da oxidação, além de aumentar as concentrações da enzima antioxidante SOD. Além disso, análises de medidas biométricas e de consumo alimentar comprovaram a segurança e viabilidade do *whey protein* adicionado de curcumina (DA CONCEIÇÃO et al., 2021). Assim, o presente estudo objetivou dar continuidade a essas investigações. Foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no Laboratório de Biologia do Exercício, no Departamento de Educação Física (UFV), no

Laboratório de Patologia Experimental, no Departamento de Biologia Animal (UFV) e no Laboratório de Imunovirologia, no Departamento de Biologia (UFV).

5.1 Produto teste

5.1.1 Curcumina

Foi utilizada a CCM (Theracurmin[®]) altamente absorvível e dispersa com nanopartículas coloidais. A Theracurmin[®] consiste em 30 w/w% de CCM e apresenta 27 vezes mais biodisponibilidade do que a CCM convencional (Theracurmin[®]; Theravalues, Tóquio, Japão) (Anexo I).

5.1.2 Desenvolvimento de um concentrado proteico de soro de leite (WPC) por *spray drying*

O leite utilizado para a fabricação do concentrado proteico de soro foi obtido do estábulo da Universidade Federal de Viçosa-MG, sendo submetido à microfiltração para obtenção do soro. Foram coletadas amostras resultantes de quatro dias de produção de queijo. O soro foi armazenado em embalagens plásticas com tampa, identificadas e armazenadas em *ultrafreezer* (-80 °C) até o momento de sua utilização.

O procedimento de secagem do soro de leite foi conduzido em um secador de pulverização de nível único, modelo único (modelo MSD 1.0), equipado com um bico de pulverização de 1 mm de diâmetro (Labmaq, Brasil). As taxas de ar e de fluxo de produto, bem como a temperatura do ar foram definidas mediante testes iniciais, seguindo a metodologia proposta por Perrone e colaboradores (2013), em que o ar de entrada e o fluxo de saída do produto é de 170 ± 2 °C e 1 L h^{-1} .

5.1.3 Concentrado proteico de soro de leite (WPC) adicionado de curcumina (CCM)

A CCM foi adicionada ao WPC para obtenção de um produto com a concentração de 0,8 g de curcumina em cada 100 g de WPC. Para este cálculo, considerou-se uma ingestão de 3,0 mg/kg/dia de curcumina (valor máximo da IDA para humanos) (FAO, 2004) para um indivíduo de 70 kg e que consome uma suplementação de proteína por meio do WPC de 0,3 g/kg/dia (SCHOENFELD e ARAGON, 2018). Assim, a oferta de proteína nos animais, por meio do WPC, correspondeu a 30% das necessidades estipuladas para ratos em fase de

manutenção (REEVES et al., 1993), sendo essa substituição definida de acordo com a que é utilizada em humanos.

5.2 Delineamento experimental

5.2.1 Modelo animal

Foram utilizados 48 ratos machos (adultos jovens) da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, Rodentia), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa.

Os animais foram mantidos em gaiolas de aço inoxidável individuais, no Laboratório de Nutrição Experimental, em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C), fotoperíodo de 12 horas (claro/ escuro) e receberam água *ad libitum* durante todo o período experimental.

5.2.2 Cálculo amostral

O cálculo amostral foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Conagin (1959), sendo cada animal considerado uma repetição, de modo que a diferença da média dos pesos entre os grupos não excedeu seis gramas (Quadro 1).

Para o cálculo amostral utilizou-se a seguinte equação (CONAGIN, 1959):

$$r = 2 \times s^2 \times (t\alpha + t\beta) * (t\alpha + t\beta) / d^2, \text{ em que:}$$

r = número de repetições calculado

s^2 = variância dos dados de referência

$t\alpha$ = probabilidade do erro tipo 1 em função do grau de liberdade do resíduo

$t\beta$ = probabilidade do erro tipo 2 em função do grau de liberdade do resíduo

d = distância mínima entre médias.

Quadro 1. Variáveis a serem utilizadas para o cálculo:

	Média+DP Grupo 1	Média+DP Grupo 2	Média+DP Para fórmula
Peso (g)	306,9 + 7,4	280,9 + 2,6	293,9 + 5
N	10	10	10

Fonte: Maithilikarpagaselvi et al. (2016).

Assim:

$$s^2 = 25$$

$$t\alpha = 2,262, \text{ considerando } \alpha \text{ de } 0,05$$

$$t\beta = 1,833, \text{ considerando } \beta \text{ de } 0,1$$

$$d = 10 \text{ g}$$

$$2 \times 25 \times (2,262 + 1,833) \times (2,262 + 1,833) / (10^2) \rightarrow 8 \text{ animais}$$

O número de repetições calculado foi 8. Portanto, foram utilizados 48 animais, valor correspondente a 8 repetições por tratamento. Foi considerado um estudo prévio com modelo animal e desfecho similar ao da presente pesquisa (MAITHILIKARPAGASELVI et al., 2016).

5.2.3 Desenho experimental

Os animais foram divididos randomicamente em seis grupos experimentais (n=8): grupo controle, que recebeu dieta padrão (AIN-93M); grupo controle submetido ao teste exaustivo, que também recebeu dieta padrão (AIN-93M TE); grupo *whey protein* adicionado de curcumina (WPC + CCM), no qual 30% (36 g) da necessidade de proteína foram advindos do WPC; grupo *whey protein* adicionado de curcumina submetido ao teste exaustivo (WPC+CCM TE); grupo curcumina (CCM) e grupo curcumina submetido ao teste exaustivo (CCM TE). As dietas experimentais foram formuladas de acordo com as recomendações AIN-93M, propostas pelo *American Institute of Nutrition* (1993) para manutenção de animais adultos (Tabela 1).

Todos os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica (Gehaka[®], modelo BG2000), misturados manualmente e peneirados em peneiras de plástico. Os ingredientes foram homogeneizados em batedeira industrial (Leme[®]) por 15 minutos. As dietas foram produzidas e oferecidas na forma de pó e armazenadas protegidas da luz, em temperaturas de 0 a 4 °C, até o momento da sua utilização. Os animais receberam água destilada e dieta *ad libitum*.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais

Ingredientes	g/kg de dieta		
	AIN-93M	WPC+CCM	CCM
Amido de Milho	455,7	455,7	455,7
Albumina*	150,0	105,0	150,0
Maltodextrina	155,0	155,0	155,0
Sacarose	100,0	99,0	99,0
Óleo de Soja	40,0	40,0	40,0
Celulose	50,0	50,0	50,0
Mistura de Minerais	35,0	35,0	35,0
Mistura de Vitaminas	10,0	10,0	10,0
L-cistina	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
WPC	-	44,0	-
Theracurmin®	-	1,2	1,2

Fonte: Reeves et al., 1993; AIN-93M: dieta padrão para roedores em fase de manutenção; WPC: *wey protein* concentrado; CCM: curcumina. *Considerou-se a albumina com um teor de 80% de proteína.

Os animais receberam dieta comercial até completarem doze semanas de idade; a partir de então, as dietas experimentais específicas de cada grupo foram introduzidas e mantidas pelo período de 4 semanas (Figura 1).

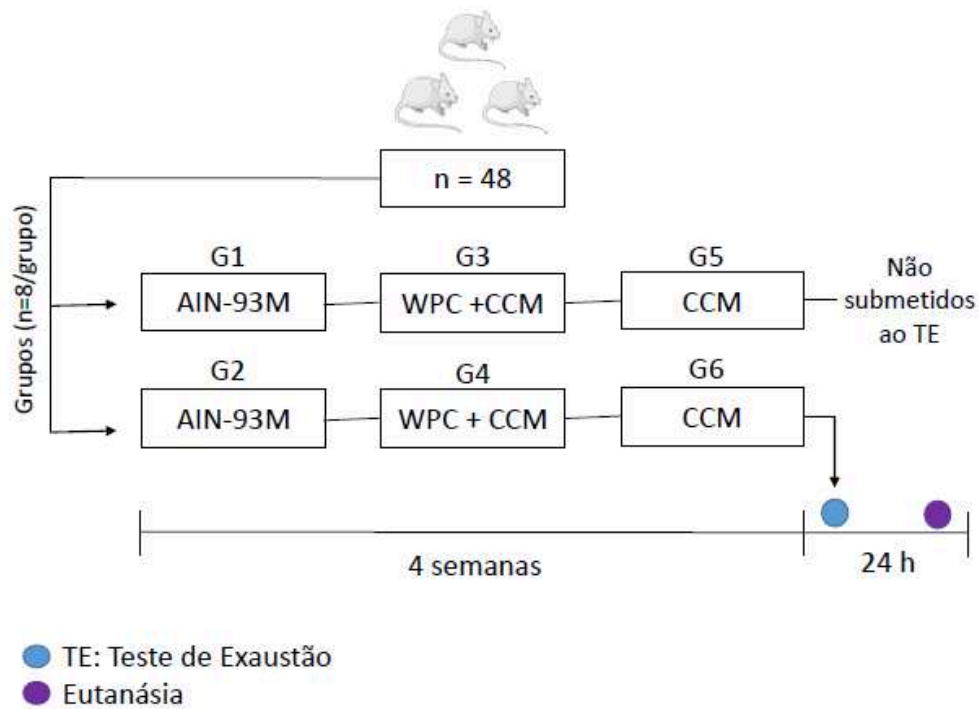


Figura 1. Desenho Experimental. AIN – 93M: dieta padrão para animais em fase de manutenção; WPC + CCM: *whey protein* adicionado de curcumina; CCM: curcumina.

5.2.4 Protocolo de exercício exaustivo

Os animais dos grupos G2, G4 e G6 foram submetidos ao teste exaustivo em natação após 4 semanas de consumo das dietas experimentais. Os animais nadaram até a exaustão, suportando um peso de 4% do peso corporal fixo à cauda (VENDETTI e DI MEO, 1996). A exaustão foi definida quando o animal permaneceu por 10 segundos sob a superfície da água (DAWSON e HORVATH, 1970). O treinamento foi realizado em um tanque de alvenaria azulejado (largura: 65 cm, comprimento: 75 cm, altura: 85 cm), com altura da água de 45 cm mantida em torno de 28 ± 1 °C, no Laboratório de Biologia do Exercício (BioEx) (DEF/UFV).

5.2.5 Eutanásia e dissecação dos órgãos

Os animais foram eutanasiados 24 horas após a realização do teste de exercício exaustivo no Laboratório de Nutrição Experimental em ambiente tranquilo e adequado, em local distante da sala de experimentação. O procedimento foi realizado por uma equipe devidamente treinada.

Foi utilizado anestésico inalatório como agente de eutanásia para minimizar os efeitos do estresse decorrente da manipulação dos animais. Após serem submetidos a um jejum de 12

horas, os animais foram anestesiados de 3 a 5 minutos com isoflurano a 3 % (Isoforine, Cristália[®] Brasil), utilizando circuito simples com fluxômetro, acoplado a um cilindro de oxigênio.

Os animais foram acondicionados individualmente em caixas transparentes e vedadas para saturação do anestésico, ampliando, assim, os efeitos aguardados da sedação e anestesia profunda. Foram avaliados parâmetros fisiológicos e reflexos para averiguação do grau de sensibilidade da anestesia para que os animais pudessem ser submetidos à exsanguinação total por punção cardíaca.

O tecido muscular esquelético (bíceps e gastrocnêmio) foi coletado e armazenado a -80 °C para análises posteriores. Uma porção do tecido muscular foi separada e fixada em formaldeído 10% para as análises histológicas.

5.3 Estresse oxidativo – Avaliação do perfil antioxidante

5.3.1 Preparação do homogeneizado

Para se obter um homogeneizado do músculo, 300 mg de tecido muscular (gastrocnêmio) foram macerados e acrescidos de 1500 µL de tampão de fosfato (50 mM). As amostras foram centrifugadas a 12000g e 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -80°C para as análises de malondialdeído (MDA), óxido nítrico (ON), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) e proteínas totais. O pellet formado foi utilizado para quantificação da proteína carbonilada (PCN). Os dados foram normalizados de acordo com os níveis de proteína total no sobrenadante.

5.3.2 Quantificação de proteínas totais

A quantidade de proteínas presentes no tecido muscular utilizados nas análises de TBARS, CAT, SOD e GST foi mensurada segundo metodologia de Lowry et al. (1951). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (ThermoScientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia) a 700 nm.

5.3.3 Malondialdeído (MDA)

A mensuração dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) baseia-se na capacidade do malondialdeído (MDA), quando aquecido juntamente com o ácido tiobarbitúrico, em condições ácidas, de formar um produto de coloração rosa que pode ser mensurado por espectrofotometria. Dessa forma, após centrifugação do homogenato, foi acrescentada a solução que contém ácido tricloroacético (Sigma Aldrich[®], Brasil) e

tiobarbitúrico (Merck[®], Alemanha) (solução de TBARS) ao sobrenadante resultante. A reação foi mantida em banho-maria. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia) a 540 nm. A concentração de MDA foi determinada utilizando a curva padrão de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMPO) (BUEGE; AUST, 1978).

5.3.4 Óxido nítrico (ON)

A produção de ON foi estimada pela produção de NO₂/NO₃ pela reação padrão de Griess (TSIKAS, 2007). Foram incubados 50 µL homogeneizado do músculo e 100 µL de solução AB (1% sulfanilamida, 0,1% N-(1-Naftil) etilenodiamina e 2,5% H₃PO₄) à temperatura ambiente, por 10 minutos. A conversão da absorbância em concentrações micromolares de NO foi obtida a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (0–125 µM) e expressa em concentrações de NO (µM/L). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Cientific) a 570 nm.

5.3.5 Atividade da enzima catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) é baseada na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e o oxigênio molecular, conforme descrito por AEBI (1984). Para determinar a atividade da catalase (CAT), foram adicionados o sobrenadante do homogeneizado (diluído na proporção 1:10, em água), tampão fosfato (pH 7,0) + H₂O₂ (cada 25 mL de tampão 40 µL de H₂O₂ 30%). As absorbâncias foram determinadas nos tempos 0, 30 e 60 segundos a 240 nm em espectrofotômetro (ThermoScientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia) (AEBI, 1984). A concentração da enzima foi expressa em U de catalase/mg de proteína da amostra.

5.3.6 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada a partir de sua habilidade de eliminar o radical livre superóxido e, conseqüentemente, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (Sigma Aldrich[®], Japão) (DIETERICH et al., 2000). As amostras, padrão e branco foram incubados a 37°C durante 5 minutos e a leitura executada em espectrofotômetro (ThermoScientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia) a 570 nm.

5.3.7 Atividade da glutathione (GST)

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada segundo Habig et al. (2002). Este método baseia-se na habilidade da GST de metabolizar o 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB), conjugado com a glutathione reduzida (GSH). Assim, após

centrifugação do homogeneizado, foi acrescentado o CDNB (Sigma Aldrich[®], EUA) e a glutationa reduzida (GSH) (Sigma Aldrich[®], EUA). As absorbâncias foram determinadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 segundos a 340 nm em espectrofotômetro (ThermoScientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia) (HABIG e JAKOBY, 1981).

5.3.8 Proteína carbonilada (PCN)

A concentração de proteína carbonilada foi medida utilizando o procedimento 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com base nos grupos carbonil que reagem com DNPH (LEVINE et al., 1990). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (ThermoScientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia) a 370 nm

5.4 Expressão gênica

5.4.1 Extração do RNA

O RNA total das amostras de músculo gastrocnêmio foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA). Em microtubos de 2 mL, foi adicionado 1 mL de Trizol para cada 50-100 mg de amostra. Em seguida, a mesma foi macerada com homogeneizador de tecidos e foram adicionados 200 µL de clorofórmio. O conteúdo foi agitado manualmente por 3 minutos. Após centrifugação (15.000 x g/10 minutos), a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 2 mL, no qual foi adicionado 1 mL de isopropanol, e incubada a -80°C por 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 500 µL de etanol 75% no precipitado. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, as amostras foram ressuspendidas em 30 µL de água ultrapura.

Após essa etapa, as amostras foram tratadas com RQ1 DNase (Promega, Madison, EUA) utilizando 1,5 U de enzima por reação. As reações foram incubadas a 37 °C por 30 minutos, e após o período de incubação a enzima foi inativada pela incubação a 70 °C por 10 minutos.

5.4.2 PCR quantitativo (qPCR)

O qPCR foi realizado utilizando o kit GoTaq[®] 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, EUA). Para cada reação, foram utilizados 10 µL de Master Mix (2X), 0,4 µL de enzima GoScript[™] RT Mix (50X) e 0,4 µL de cada primer (*forward* e *reverse*). Foi padronizada

a concentração de 600 ng/mL de RNA e a água foi adicionada para completar o volume final de 20 μ L. As seqüências dos *primers* que foram utilizados estão descritas na Tabela 2.

A amplificação e detecção foram realizadas com o sistema Eco™ Real-Time PCR (Illumina, CA, EUA), com as seguintes condições de reação qPCR: transcrição reversa a 48 °C por 15 minutos, desnaturação a 95 °C por 10 segundos, anelamento e extensão a 60 °C por 30 segundos.

Para cálculo do aumento da expressão do gene foi utilizado o método $2^{-\Delta C_t}$.

As análises foram realizadas no Laboratório de Imunovirologia (DBG) da UFV.

Tabela 2. Sequências de primers para análise de qPCR

Genes	Oligonucleotídeos (5' – 3')	
	Forward	Reverse
GAPDH	CCCCCAATGTATCCGTTGTG	TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT
IL-6	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC
IL-10	TTGAACCACCCGGCATCTAC	CCAAGGAGTTGTTCCCGTTA
TNF-α	TGGGCTACGGGCTTGTCCTC	GGGGGCCACCACGCTCTT

5.5 Análises histológicas

Fragmentos do músculo (bíceps) de todos os animais foram removidos e fixados em formaldeído em temperatura ambiente. Após fixação, os tecidos foram desidratados em gradiente crescente de etanol (70 % até absoluto), e incluídos em resina contendo endurecedor (Leica, Historesin®). Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com 3 μ m de espessura em micrótomo automático Leica® utilizando navalha de vidro. Em seguida foram submetidos à coloração pela técnica com hematoxilina e eosina (H&E), montadas com Entellan (Merck®) e analisadas em microscópio de luz (LEICA DM750).

As imagens das secções histológicas foram capturadas com a objetiva de 20X por meio da câmera digital LEICA MC170 HD. A partir de 10 fotos por animal, foram quantificadas as áreas contendo fibra muscular, tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório no músculo utilizando o aplicativo ImagePro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics) por meio da contagem manual de pontos sobre o tecido (SABARENSE et al., 2012). As análises foram realizadas nos laboratórios de Patologia Experimental (DBA/UFV) e Biologia Estrutural (DBG/UFV).

5.6 Análise de lactato sanguíneo durante o teste de exaustão

Amostras de sangue nos animais submetidos ao exercício foram coletadas em dois momentos: antes (repouso) e ao final do teste de exaustão (momento final) (adaptado de GOBATTO et al., 2001). Amostras sanguíneas (uma gota) foram coletadas da extremidade da cauda do animal. Para evitar diluição com a água, os animais foram rapidamente secos com uma toalha antes da coleta sanguínea. A concentração de lactato foi determinada utilizando o analisador automático de lactato sanguíneo Accutrend Check (Accusport - Roche).

5.7 Aspectos éticos

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), sob o número de protocolo 72/2018 (Anexo II). Todo o procedimento foi realizado em consonância com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com objetivo de favorecer uma morte humanitária dos animais.

5.8 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média \pm DP). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças entre os grupos com e sem teste exaustivo foram testadas pelo teste T. Médias entre os grupos AIN-93M, WPC + CCM e CCM foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de médias de Newman-Keuls a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas e construção dos gráficos foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 8 para *Windows* (GraphPad Prism Inc, EUA).

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vivo. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-26, 1984.
- AGGARWAL, B.B.; KUMAR, A.; BHARTI, A.C. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. **Anticancer Res.** v. 23, p. 363–398, 2003.
- ALMONDES, K.G.S; LEAL, G. V. S; COZZOLINO, S. M. F; PHILIPPI, S. T.; RONDÓ, P. H. C. O papel das seleno proteínas no câncer. **Rev Assoc Med Bras.** v. 56 (4), p. 484-488, 2010.
- AMMON HP, WAHL MA. Pharmacology of Curcuma longa. **Planta Med.** v.57, p.1-1, 1991.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A.B.; NEWMAN, R.A.; AGGARWAL, B.B. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. **Mol. Pharm.** v.4, p. 807-818, 2007.
- ANTOINE, F.; GIRARD, D. Curcumin increases gelatinase activity in human neutrophils by a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)- independent mechanism. **Journal Immunotoxicol.** v.12, p. 188-193, 2015.
- ARozAL, WAWAIMULI; RAMADANTY, WT; LOUISA, M.; SATYANA, RPU; HARTONO, G.; FATRIN, S; PURBADI, S; ESTUNINGTYAS, A; INSTIATY, I. Perfil farmacocinético da curcumina e nanocurcumina no plasma, ovário e outros tecidos. **Drug research**, v. 69, n. 10, p. 559-564, 2019.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). (2012) **Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (19th ed.). Gaithersburg:AOAC.
- ATHERTON, P. J.; SMITH, K. Muscle protein synthesis in response to nutrition and exercise. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 5, p. 1049-1057, 2012.
- ATHERTON, Philip J. et al. Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells. **Amino acids**, v. 38, n. 5, p. 1533-1539, 2010.
- ATHIRA S, MANN B, SHARMA R, KUMAR R Ameliorative potential of *whey protein* hydrolysate against paracetamol-induced oxidative stress. **Journal of Dairy Science.** V.96, p.1431–1437, 2013.
- BAGCHI, ANAMIKA. Extraction of Curcumin. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology.** V. 1, Issue 3, 2012.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V.P.R. & BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARCELOS RÔMULO PILLON, ROYES LUIZ FERNANDO FREIRE, GALLEGO JAVIER GONZALEZ- & BRESCIANI GUILHERME. Oxidative stress and inflammation: liver

responses and adaptations to acute and regular exercise, **Free Radical Research**, v.51:2, p.222-236, 2017.

BEARA, I.N.; LESJAK, M.M.; ORCIC, D.Z.; SIMIN, N.D.; CETOYEVIC-SIMIN, D.D.; BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.M. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. **LWT Food Sci. Technol.** v. 47, p. 64-70, 2012.

BENETTI, M.; GHISI, M.L.G; ARAUJO, C.M.; PINHO, A.R. Doença Arterial Coronariana, Exercício Físico e Estresse Oxidativo. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 94, n.4, p.549-555, 2010.

BIDINOTTO, P.M.; SOUZA, R.H.S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: Procedure for field determinations of microsamples. **Boletim Técnico do CEPTA-Pirassununga**, v.10, p.53-60, 1997.

BISWAS, S.K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxid. Med. Cell. Longev**, 2016.

BORGES, P. F. Z.; SGARBIERI, V. C.; DIAS, N.; JACOBUCCI, H. B. Produção de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal Food Technology**. v.4, n.1, p.1-8, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL (2017). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília.

BUCCI L, UNLU L. Proteins and amino acid supplements in exercise and sport. Energy-yielding macronutrients and energy metabolism in sports nutrition. Driskell J, Wolinsky I, editors, p.191-212, 2000.

BUEGE, JA.; AUST, SD. In *Methods of Enzymology*. **New York: Academic Press**, 1978.

BURD, Nicholas A. et al. Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 5, p. 1692-1701, 2009.

CAO, J.; WANG, T.; WANG, M. Investigation of the anti-cataractogenic mechanisms of curcumin through *in vivo* and *in vitro* studies. **BMC Ophthalmol.** v. 18, 2018.

Cap. Microsomal lipid peroxidation. p. 302-310.

CAREY AL, STEINBERG GR, MACAULAY SL, THOMAS WG, HOLMES AG, RAMM G, et al. Interleukin-6 Increases Insulin-Stimulated Glucose Disposal in Humans and Glucose Uptake and Fatty Acid Oxidation In Vitro via AMP-Activated Protein Kinase. **Diabetes**. V. 55, n.10, p.2688-97, 2006.

CARSON, F. L. et al. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 59, p. 365-373, 1973.

CHIBA, T.; ISHIGURO, H.; MATSUMOTO, S.; TSUJIKO, K.; TSUJIKO, K.; HASHIGUCHI, M.; SASAKI, H.; OTSUKA, Y.; IMAIZUMI, A.; KANAI, M. Escalating dose and pharmacokinetic study of nanoparticles curcumin, a potential anticancer agent with improved bioavailability, in healthy human volunteers. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.69, p. 65-70, 2012.

CONAGIN, A. Determinação do número de repetições no planejamento de experimentos. **BRAGANTIA - Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo**, v. 18, n. 2, 1959.

CORROCHANO, A. R. et al. Invited review: *Whey proteins* as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 6, p. 4747-4761, 2018.

COSTA, N.M.B.; PELUZIO, M.C.G. Nutrição básica e metabolismo. Editora Viçosa: UFV, 400p, 2008.

CRUM, E. M. et al. The effect of acute pomegranate extract supplementation on oxygen uptake in highly-trained cyclists during high-intensity exercise in a high altitude environment. **J IntSoc Sports Nutr**, v. 14, p. 14, 2017.

DAI, C.S.; CICCOTOSTO, G.D.; CAPPAL, R.; TANG, S.S.; LI, D.W.; XIE, S.L.; XIAO, X.L.; VELKOV, T. Curcumin attenuates colistin-induced neurotoxicity in N2a cells via anti-inflammatory activity, suppression of oxidative stress, and apoptosis. **Mol. Neurobiol.** v.55, p.421-434, 2018.

DANGIN, MARTIAL et al. The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans. **The Journal of physiology**, v. 549, n. 2, p. 635-644, 2003.

DAWSON, C.A., HORVARTH, S.M. Swimming in small laboratory animals. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 2, p. 51-78, 1970.

DEMINICE, R., JORDAO, A.A. Creatine supplementation reduces oxidative stress biomarkers after acute exercise in rats. **Amino Acids** v. 43, p. 709–715, 2012.

DEMOPOULOS HB, SANTOMIER JP, SELIGMAN ML, PIETRONIGRO DD. Free radical pathology; rationale and toxicology of antioxidants and other supplements in sports medicine and exercise science; In **Sport health and nutrition**; the 1984 Olympic scientific congress proceedings Champaign; 1986. pp. 139–90.

DEROCHETTE, S.; FRANCK, T.; MOUITHYS-MICKALAD, A.; CEUSTERS, J.; DEBY-DUPONT, G.; LEJEUNE, J.P.; NEVEN, P.; SERTEYN, D. Curcumin and resveratrol act by different ways on NADPH oxidase activity and reactive oxygen species produced by equine neutrophils. **Chem. Biol. Interact.** v.206, p.186–193, 2013.

DEVRIES, M. C., & PHILLIPS, S. M. Supplemental Protein in Support of Muscle Mass and Health: Advantage Whey. **Journal of Food Science**. v. 80, p.A8–A15, 2015.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K. et al. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Circulation**, v. 101, p. 33-39, 2000.

DIMITRIOS, D, LEONIDAS G K, IOANNIS A, ATHANASIOS C, ATHANASIOS Z J, IOANNIS G F. Inflammaging and Skeletal Muscle: Can Protein Intake Make a Difference? **The Journal of Nutrition**. V. 146, p.1940–1952, 2016.

El-Bahr, S.M. Effect of curcumin on hepatic antioxidant enzymes activities and gene expressions in rats intoxicated with aflatoxin b1. **Phytother. Res.** v.29, p. 134–140, 2015.

F. HE, J. LI, Z. LIU, C.C. CHUANG, W. YANG, L. ZUO, Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise, **Frontiers in physiology**, v. 7, p. 486. 2016.

FAO/WHO Expert Consultation. 1991. Protein quality evaluation report of the joint FAO/WHO Expert Consultation held in Bethesda, Md, USA, in 1989. **FAO Food and Nutrition Paper** 51, Rome.

FENG HE, LI JUAN, LIU ZEWEN, CHUANG CHIA-CHEN, YANG WENGE ; ZUO LI. Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise, **Frontiers in physiology** v.7, p.486, 2016.

FERREIRA, V.H.; NAZLI, A.; DIZZELL, S.E.; MUELLER, K.; KAUSHIC, C. The anti-inflammatory activity of curcumin protects the genital mucosal epithelial barrier from disruption and blocks replication of HIV-1 and HSV-2. **PLoS ONE**. v.10, 2015.

FUSTER-MUNOZ, E. et al. Effects of pomegranate juice in circulating parameters, cytokines, and oxidative stress markers in endurance-based athletes: A randomized controlled trial. **Nutrition**, v. 32, n. 5, p. 539-45, 2016.

GARBER, C.E; BLISSMER, B.; DESCHENES, M.R.; FRANKLIN, B.A; LAMONTE, M.J; LEE, I.M; NIEMAN D.C.; Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. American College of Sports Medicine. **Medicine Science in Sports and Exercise**. v. 43 p. 1334-1359, 2011.

GLEESON, N.; ESTON, R.; MARQINSON, V.; McHUGH, M. Effects of prior concentric training on eccentric exercise induced muscle damage. **British Journal of Sports Medicine**, Loughborough, v. 37, n. 2, p. 119-125, 2003.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.130(A), p. 21-27, 2001.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 787-809, 2008.

GOLDFARB AH. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. **Med Sci Sports Exerc.** v.25, p. 323-6, 1993.

GOTA VS, MARU GB, SONI TG, GANDHI TR, KOCHAR N, AGARWAL MG. Safety and pharmacokinetics of a solid lipid curcumin particle formulation in osteosarcoma patients and healthy volunteers. **J Agric Food Chem.** v.58, p.2095–2099, 2010.

H.J. KIM, Y.H. LEE, C.K. KIM. Biomarkers of muscle and cartilage damage and inflammation during a 200 km run. **Eur. J. Appl. Physiol.** v. 99, p. 443-447, 2007.

H.J. KIM, Y.H. LEE, C.K. KIM. Changes in serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP), plasma CPK and plasma hs-CRP in relation to running distance in a marathon (42.195 km) and an ultra-marathon (200 km) race. **Eur. J. Appl. Physiol.**v. 105, p. 765-770, 2009.

HABIG, WH.; JAKOBY, WB. Glutathione S-Transferase (ratandhuman). **Methods in Enzymology**, 77(27), 218-239, 1981.

HARTY, P. S., COTTET, M. L., MALLOY, J. K., & KERKSICK, C. M. Nutritional and supplementation strategies to prevent and attenuate exercise-induced muscle damage: a brief review. **Sports medicine-open**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2019.

HATCHER, H.; PLANALP, R.; CHOB, J.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 65, n. 11, p. 1631-1652, 2008.

HOEHLE, S. I., PFEIFFER, E., SÓLYOM, A. M., & METZLER, M. Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 3, p. 756-764, 2006.

HUANG, K. C. et al. Effects of freshwater clam extract supplementation on time to exhaustion, muscle damage, pro/anti-inflammatory cytokines, and liver injury in rats after exhaustive exercise. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 3825-3838, 2013.

HUANG, W. C. et al. Effect of curcumin supplementation on physiological fatigue and physical performance in mice. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 905-921, 2015.

IMAIZUMI A. Highly bioavailable curcumin (Theracurmin): its development and clinical application. **Pharma-Nutrition**. V.3, p. 123 – 130, 2015.

J. STEELE, J. FISHER, M. SKIVINGTON et al., “A higher effort-based paradigm in physical activity and exercise for public health: making the case for a greater emphasis on resistance training,” **BMC Public Health**, vol. 17, no. 1, p. 300, 2017.

J. ZHU, K.Z. SANIDAD, E. SUKAMTOH, G. ZHANG. Potential roles of chemical degradation in the biological activities of curcumin. **Food Funct**, v. 8 p. 907-914, 2017.

J.C. ROSA NETO, F.S. LIRA, L.M. OYAMA, N.E. ZANCHI, A.S. YAMASHITA, M.L. BATISTA JR, C.M. OLLER DO NASCIMENTO, M. SEELAENDER. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v.106, p. 697-704, 2009.

JEONG, W.Y.; JIN, J.S.; CHO, Y.A.; LEE, J.H.; PARK, S.; JEONG, S.W.; KIM, Y.-H.; LIM, C.-S.; EL-ATY, A.M.; KIM, G.-S. et al. Determination of polyphenols in three *Capsicum annuum* L. (bell pepper) varieties using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Their contribution to overall antioxidant and anticancer activity. **J. Sep. Sci.** v.34, p. 2967–2974, 2011.

JILL. Redox signaling in skeletal muscle: role of aging and exercise. **Adv Physiol Educ**, 2015.

JURENKA, J.S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of preclinical and clinical research. **Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.** v.14, p.141–153, 2009.

KAWANISHI, N. et al. Macrophage depletion by clodronate liposome attenuates muscle injury and inflammation following exhaustive exercise. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 5, p. 146-151, 2016.

KAWANISHI, Suzuki, S. Nakaji, M. Yamada, M. Totsuka, K. Sato, K. Sugawara. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. **Exerc. Immunol. Rev.**, v.8, p.6- 48, 2002.

KAWANISHI,SUZUKI, S. NAKAJI, M. YAMADA, Q. LIU, S. KURAKAKE, N. OKAMURA, T. KUMAE, T. UMEDA, K. SUGAWARA. Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. **Med. Sci. Sport. Exerc.**, v. 35, p. 348-355, 2003.

KERASIOTI E, KISKINI A, VESKOUKIS A, JAMURTAS A, TSITSIMPIKOU C, TSATSAKIS AM, KOUTEDAKIS Y, STAGOS D, KOURETAS D, KARATHANOS V. Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. **Food and Chemical Toxicology**. v. 50, p. 2805-2810, 2012.

KERASIOTI E, STAGOS D, JAMURTAS A, KISKINI A, KOUTEDAKIS Y, GOUTZOULAS N, POURNARAS S, TSATSAKIS AM, KOURETAS D. Anti-inflammatory effects of a special carbohydrate-*whey protein* cake after exhaustive cycling in humans. **Food and Chemical Toxicology**. V. 61, p. 42- 46, 2013.

LARMONIER, C. B., MIDURA-KIELA, M. T., RAMALINGAM, R., LAUBITZ, D., JANIKASHVILI, N., LARMONIER, N., KIELA, P. R. et al. Modulation of neutrophil motility by curcumin: implications for inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 17, n. 2, p. 503-515, 2011.

LEVINE, R. L. et al. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. C, p. 464–478, 1 jan. 1990

LI, H.Y.; YANG, M.; LI, Z.; MENG, Z. Curcumin inhibits angiotensin II-induced inflammation and proliferation of rat vascular smooth muscle cells by elevating PPAR-gamma activity and reducing oxidative stress. **Int. J. Mol. Med.** v. 39, p. 1307–1316, 2017.

LIN, Y.G.; KUNNUMAKKARA, A.B.; NAIR, A.; MERRITT, W.M.; HAN, L.Y.; ARMAIZ-PENA, G.N.; KAMAT, A.A.; SPANNUTH, W.A.; GERSHENSON, D.M.; LUTGENDORF,

S.K.; ET AL. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor- κ B pathway. **Clin. Cancer Res.** v.13. p.3423–3430, 2007.

LIRA, F.S; NETO, J.R.; PIMENTEL, G.D.; CAPERUTO, E. C.; MELLO, M.T.; RODRIGUES, B. MARQUES, S.O; SOUZA, T.C.; SANTOS, R. V.T. Importância dos efeitos fisiológicos do exercício na promoção da saúde. **Revista Inova Saúde**, Criciúma, vol. 1, 2012.

LIU, F.R.; GAO, S.; YANG, Y.X.; ZHAO, X.D.; FAN, Y.M.; MA, W.X.; YANG, D.R.; YANG, A.M.; YU, Y. Antitumor activity of curcumin by modulation of apoptosis and autophagy in human lung cancer A549 cells through inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway. **Oncol. Rep.** v.39, p.1523–1531, 2018.

LIU, L.; ZUBIK, L.; COLLINS, F.W.; MARKO, M.; MEYDANI, M. The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds. **Atherosclerosis.** V.175, p. 39-49, 2004.

LIU, W., ZHAI, Y., HENG, X., CHE, F. Y., CHEN, W., SUN, D., & ZHAI, G. Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. **Journal of drug targeting**, v. 24, n. 8, p. 694-702, 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOWRY, O.H.; ROSE BROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

M. C. GOMEZ-CABRERA, A. SALVADOR-PASCUAL, H. CABO, B. FERRANDO, AND J. VIÑA. Redox modulation of mitochondriogenesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training?. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 86, p. 37–46, 2015.

M. MALAGUTI, C. ANGELONI, N. GARATACHEA, M. BALDINI, E. LEONCINI, P.S. C OLLADO, G. TETI, M. FALCONI, J. GONZALEZ-GALLEGO, S. HRELIA. Sulforaphane treatment protects skeletal muscle against damage induced by exhaustive exercise in rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 107, p. 1028-1036, 2009.

MAITHILIKARPAGASELVI, N. et al. Preventive effect of curcumin on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in high-fat fed obese rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 13, n. 2, p. 137-143, 2016.

MARSHALL, N. D. Therapeutic applications of *whey protein*. **Alternative Medicine Review**, v. 9, n. 2, p. 136-156, 2004.

MENON, V.P.; SUDHEER, A.R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 595, p. 105–125, 2007.

MERRILL, A. L., & WATT, B. K. Energy value of foods-basis and derivation. (74th ed.) Washinston: U.S. Department of Agriculture, 1995.

MORATO, P. N. et al. A dipeptide and an amino acid present in *whey protein* hydrolysate increase translocation of GLUT-4 to the plasma membrane in *Wistar* rats. **Food chemistry**, v. 139, n. 1, p. 853-859, 2013.

MOUZAOU, SOUAD; RAHIM, IBTISSEM; DJERDJOURI, BAHIA. Aminoguanidina e curcumina atenuaram o estresse oxidativo induzido pelo fator de necrose tumoral (TNF) - α , colite e hepatotoxicidade em camundongos. **International immunopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 302-311, 2012.

NELSON, K.M.; DAHLIN, J.L.; BISSON, J.; GRAHAM, J.; PAULI, G.F.; WALTERS, M.A. The essential medicinal chemistry of curcumin. **J. Med. Chem.** V.60, p. 1620–1637, 2017.

NEWSHOLME, E. A., CALDER, P. C. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. **Nutrition**. v.13, n.7-8, p.728-730, 1997.

NEWSHOLME, P. Why is l-glutamine metabolism important to cells of the immune system IN health postinjury, surgery or infection? **Journal of Nutrition**. v.15, p.2515-2522, 2001.

NOGUEIRA, J. E., PASSAGLIA, P., MOTA, C. M. D., SANTOS, B. M., BATALHÃO, M. E., CARNIO, E. C., & BRANCO, L. G. S. Molecular Hydrogen Reduces Acute Exercise-Induced Inflammatory And Oxidative Stress Status. **Free Radical Biology and Medicine**, 2018.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory animals**, v. 41, n. 1, p. 111-119, 2007.

OGATA T, OISHI Y, HIGASHIDA K, HIGUCHI M, MURAOKA I. Prolonged exercise training induces long-term enhancement of HSP70 expression in rat plantaris muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. V. 296, p.1557–63, 2009.

PALA R; BEYAZ F.; TUZCU M; ER B; SAHIN N.; CINAR V.; SAHIN K. The effects of coenzyme Q10 on oxidative stress and heat shock proteins in rats subjected to acute and chronic exercise. **J Exerc Nutrition Biochem**. v. 22, n.3, p.14-20 ,2018.

PALACIOS, G.; CHAMIZO, P.R.; PALACIOS, N.; SANCHEZ, N.B.; AZNAR, S.; CROSS, G.M. Biomarkes of phisical activity and exercise. **Nutricion Hospitalaria, Madrid**, v.31, sup.3, p. 237-241, 2015.

PANAHI, Y.; HOSSEINI, M.S.; KHALILI, N.; NAIMI, E.; SIMENTAL-MENDIA, L.E.; MAJEED, M.; SAHEBKAR, A. Effects of curcumin on serum cytokine concentrations in subjects with metabolic syndrome: A post-hoc analysis of a randomized controlled trial. **Biomed. Pharmacother**. v.82, p. 578–582, 2016.

PENNINGS, BART et al. *Whey protein* stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. **The American journal of clinical nutrition**, v. 93, n. 5, p. 997-1005, 2011.

PETERSEN AMW, PEDERSEN BK. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol.** v. 98, p.1154-1162, 2005.

PRIYADARSINI, K.I.; MAITY, D.K.; NAIK, G.H.; KUMAR, M.S.; UNNIKRISHNAN, M.K.; SATAV, J.G.; MOHAN, H. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. **Free Radic. Biol. Med.** v.35, p.475–484, 2003.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **American Institute of Nutrition.** v.123, p.1939-51, 1993.

REYNÉS, B. et al. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. **Food Research International**, v. 64, p. 839–848, 2014.

ROHDE, T.; MACLEAN, D.A.; PEDERSEN, B.K. Effect of glutamine supplementation on changes in the immune system induced by repeated exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise.** v.30, n.6, p.856-862, 1998.

S.J. HEWLINGS, D.S. KALMAN. Curcumin: a review of its' effects on human health. **Foods**, v. 6 (10), 2017.

SABARENSE, C. M. et al. A new computational method for hepatic fat microvesicles counting in histological study in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 418, n. 2, p. 284–289, 10 fev. 2012.

SAHEBKAR, A.; SERBANC, M.C.; URSONIUC, S.; BANACH, M. Effect of curcuminoids on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **J. Funct. Foods.** v.18, p. 898–909, 2015.

SALEHI, B., STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z., MATEJIĆ, J., SHARIFI-RAD, M., ANIL KUMAR, N. V., MARTINS, N., & SHARIFI-RAD, J. The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v.163, p.527-545, 2019.

SALEHI, B., STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z., MATEJIĆ, J., SHARIFI-RAD, M., KUMAR, N. V. A., MARTINS, N., & SHARIFI-RAD, J. The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. **European journal of medicinal chemistry**, v. 163, p. 527-545, 2019.

SALLAM N, LAHER I. Exercise modulates oxidative stress and inflammation in aging and cardiovascular diseases. **Oxid Med Cell Longev**, 2016.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 223-229, 2017.

SASAKI H, SUNAGAWA Y, TAKAHASHI K, IMAIZUMI A, FUKUDA H, HASHIMOTO T, WADA H, KATANASAKA Y, KAKEYA H, FUJITA M, HASEGAWA K, MORIMOTO T. Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. **Biol Pharm Bull.** v. 34, p. 660–665, 2011.

SCHOENFELD, B. J.; ARAGON, A. A. How much protein can the body use in a single meal for muscle-building? Implications for daily protein distribution. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 10, 2018.

SHAO W, YU Z, CHIANG Y, YANG Y, CHAI T, FOLTZ W, LU H, FANTUS IG, JIN T. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. **Plos ONE.** 2012.

SHEHZAD, A.; REHMAN, G.; LEE, Y. S. Curcumin in inflammatory diseases. **Biofactors**, v. 39, n. 1, p. 69-77, 2013.

SMIRICK-KTJARDES M R, GRIEDSHOP CM, FLICKINGER EA. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentive characteristics of growing pigs. **American Society of Animal Science.** v.81, p. 2535-45, 2003.

SONG, Z.L.; REVELO, X.; SHAO, W.J.; TIAN, L.L.; ZENG, K.J.; LEI, H.; SUN, H.S.; WOO, M.; WINER, D.; JIN, T. Dietary curcumin intervention targets mouse white adipose tissue inflammation and brown adipose tissue ucp1 expression. **Obesity.** v.26, p. 547–558, 2018.

SOUZA, D.O.; PEREIRA, M.S.L.; MUSSULINI, B.H.M et al. Título: Perfil da captação de glutamato em fatias de glioblastoma humano. In: **Salão de Iniciação Científica**, v. 21 Porto Alegre. Livro de resumos. UFRGS, 2009.

SREEDHAR, R., ARUMUGAM, S., THANDAVARAYAN, R. A., KARUPPAGOUNDER, V., & WATANABE, K. Curcumin as a therapeutic agent in the chemoprevention of inflammatory bowel disease. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 5, p. 843-849, 2016.

TANABE, Y. et al. Attenuation of indirect markers of eccentric exercise-induced muscle damage by curcumin. **European journal of applied physiology**, v. 115, n. 9, p. 1949-1957, 2015.

TANG, JASON E. et al. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. **Journal of applied physiology**, v. 107, n. 3, p. 987-992, 2009.

TAPIA, E.; SANCHEZ-LOZADA, L.G.; GARCIA-NINO, W.R.; GARCIA, E.; CERECEDO, A.; GARCIA-ARROYO, F.E.; OSORIO, H.; ARELLANO, A.; CRISTOBAL-GARCIA, M.; LOREDO, M.L.; et al. Curcumin prevents maleate-induced nephrotoxicity: Relation to hemodynamic alterations, oxidative stress, mitochondrial oxygen consumption and activity of respiratory complex I. **Free Radic. Res.** v. 48, p. 1342–1354, 2014.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, v. 851, n. 1-2, p. 51-70, 2007.

UKIL, A., MAITY, S., KARMAKAR, S., DATTA, N., VEDASIROMONI, J. R., & DAS, P. K. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. **British journal of pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 209-218, 2003.

VENDETTI, P., Di MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 331, p. 63-68, 1996.

VINSON, J.A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. **J. Agric. Food Chem.** v.49, p. 5315–5321, 2001.

WALLIN, B. et al. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 208, n. 1, p. 10-15, 1993.

WANG, J.; KANG, Y.X.; PAN, W.; LEI, W.; FENG, B.; WANG, X.J. Enhancement of anti-inflammatory activity of curcumin using phosphatidylserine-containing nanoparticles in cultured macrophages. **Int. J. Mol. Sci.** v. 17, p. 969, 2016.

WANG, J.; WANG, H.Y.; ZHU, R.R.; LIU, Q.; FEI, J.; WANG, S.L. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 beta transgenic mice subjected to the, lipopolysaccharide-induced sepsis. **Biomaterials.** v.53, p. 475–483, 2015.

WANG, JING; GHOSH, S. SIDDHARTHA.; & GHOSH, SHOBHA. Curcumin improves intestinal barrier function: modulation of intracellular signaling, and organization of tight junctions. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 312 (4), p.438–445, 2017.

WARREN, G.L.; INGALLS, C.P.; LOWE, D.A.; ARMSTRONG, R.B. Excitation-contraction uncoupling: Major role in contraction-induced muscle injury. **Exerc. Sport Sci. Rev.** v. 29, p. 82–87, 2001.

WEITZEL, L. R. B.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine in critical illness: the time has come, the time is now. **Critical care clinics**, v. 26, n. 3, p. 515-525, 2010.

WEST, DANIEL WD et al. Elevations in ostensibly anabolic hormones with resistance exercise enhance neither training-induced muscle hypertrophy nor strength of the elbow flexors. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 1, p. 60-67, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, United Nations Univ. Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. **WHO Technical Report Series** 935. Geneva, Switzerland, 2011.

WU, N.C.; WANG, J.J. Curcumin attenuates liver warm ischemia and reperfusion-induced combined restrictive and obstructive lung disease by reducing matrix metalloprotease 9 activity. **Transplant. Proc.** v. 46, p, 1135–1138, 2014.

XU R, LIU N, XU X, KONG B. Antioxidant effects of *whey protein* on peroxide-induced cytotoxicity. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 3739–3746, 2011.

Z. RADAK AND A. W. TAYLOR, “Exercise and hormesis,” in **The Science of Hormesis in Health and Longevity**, Elsevier, p. 75–86, 2019.

ZHANG L, ZHU W, YANG C. A novel folate-modified self-microemulsifying drug delivery system of curcumin for colon targeting. **Int J Nanomed**, v. 7, p. 151, 2012.

ZHANG, Y.L.; LIU, Z.G.; WU, J.Z.; BAI, B.; CHEN, H.J.; XIAO, Z.X.; CHEN, L.F.; ZHAO, Y.J.; LUM, H.; WANG, Y.; et al. New MD2 inhibitors derived from curcumin with improved anti-inflammatory activity. **Eur. J. Med. Chem**. v. 148, p. 291–305, 2018.

ZHENG, Q.T.; YANG, Z.H.; YU, L.Y.; REN, Y.Y.; HUANG, Q.X.; LIU, Q.; MA, X.Y.; CHEN, Z.K.; WANG, Z.B.; ZHENG, X. Synthesis and antioxidant activity of curcumin analogs. **J. Asian Nat. Prod. Res**. v.19, p. 489–503, 2017.

ZIMMER, A.R.; LEONARDI, B.; MIRON, D.; SCHAPOVAL, E.; OLIVEIRA, J.R.; GOSMANN, G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. **J. Ethnopharmacol**. v. 139, p. 228–233, 2012.

6. RESULTADOS

6.1 ARTIGO 1: Effects of curcumin supplementation on inflammatory markers, muscle damage and sports performance during acute physical exercise in sedentary individuals: a systematic review of clinical trials

Submitted to Oxidative Medicine and Cellular Longevity (Impact Factor: 6.543)

The screenshot shows the article details page on the Hindawi website. The browser address bar displays the URL: review.hindawi.com/details/ded226df-1025-4673-8a11-8130dd271597/0318ecd1-8843-4440-a1b4-6dd78fac7cd3. The Hindawi logo is visible in the top left. A notification banner states: "All our journals remain open as normal during the COVID-19 crisis. However, if you are unable to carry on with your activities as normal, please contact help@hindawi.com and we will work with you to find a solution." The article title is "Effects of Curcumin Supplementation on Inflammatory Markers, Muscle Damage and Sports Performance During Acute Physical Exercise in Sedentary Individuals: A Systematic Review of Clinical Trials", with a "SUBMITTED" status badge and ID 9264639. The authors listed are Kelly Aparecida Dias¹, Aline Rosignoli da Conceição¹, Lívyia Alves Oliveira¹, Stephanie Michelin Santana Pereira¹, Stefany da Silva Paes¹, Larissa Farias Monte¹, Mariáurea Matias Sarandy², Reggiani Vilela Gonçalves², and Ceres Mattos Della Lucia². The article type is "Review Article". The journal is "Oxidative Medicine and Cellular Longevity", which is part of a "Special Issue" titled "Mechanisms, Biomarkers, and Therapeutics involved in Inflammatory Disorders an..." with a closing date of 2021-07-09. The lead guest editor is Mithun Sinha, and the guest editor is Unassigned. The article was submitted on 2021-07-08 (4 days ago).

Abstract

Exhaustive and acute unusual physical exercise leads to muscle damage. Curcumin has been widely studied due to the variety of its biological activities, attributed to its antioxidant and anti-inflammatory properties. Furthermore, it has shown positive effects on physical exercises practitioners. However, there is no literature consensus on the beneficial effects of curcumin in acute physical activities performed by sedentary individuals. Therefore, we systematically reviewed evidence from clinical trials on the main effects of curcumin supplementation on inflammatory markers, sports performance, and muscle damage during acute physical exercises in these individuals. We searched PubMed/ Medline, Scopus, Web of Science, and Embase databases, and only original studies were analyzed according to the PRISMA guidelines. The included studies were limited to supplementation of curcumin during acute exercise. A total of 5 studies were selected. Methodological quality assessments were examined using the

SYRCLE's risk of bias tool. Most studies have shown positive effects of curcumin supplementation in sedentary individuals undergoing acute physical exercise. Overall, participants supplemented with curcumin showed less muscle damage, reduced inflammation, and better muscle performance. The studies showed heterogeneous data and exhibited methodological limitations; therefore, further researches are necessary to ensure the benefits of curcumin supplementation during acute and high-intensity physical exercises. Additionally, mechanistic and highly controlled studies are required to improve the quality of the evidence and to elucidate other possible mechanisms. Prospero number (CRD42021262718).

Key Words: Turmeric, antioxidant, anti-inflammatory, sports, fatigue.

1. Introduction

Exhaustive physical exercise, especially acute or high intensity and with many eccentric contractions, leads to muscle damage and delayed onset muscle soreness (DOMS)^[1-3]. Muscle damage can be characterized by the disruption of the sarcolemma, in addition to cytoskeletal damage, distortion of contractile components, and extracellular abnormalities of the myofibril matrix^[4]. Furthermore, exercise-induced muscle damage (EIMD) induces an inflammatory response associated with decreased muscle strength, decreased ROM, localized swelling, and an increase of muscle proteins in the blood, such as creatine kinase (CK)^[5]. It also raises markers such as C-reactive protein (CRP) and inflammatory interleukins and contributes to the production of reactive oxygen species (ROS) by promoting the activation of transcription factors, such as the nuclear factor nuclear- κ B (NF- κ B)^[6-8].

Impaired muscle function caused by EIMD and DOMS and subsequent inflammatory responses can affect sports performance. In this sense, strategies capable of controlling or minimizing muscle damage, as well as exacerbated inflammatory responses, have been increasingly studied. In this sense, nutritional supplements with antioxidant and anti-

inflammatory properties have represented an alternative for such purposes^[9,10]. Among the alternatives, curcumin (1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) 1,6-heptadiene-3,5-dione) stands out, being the main polyphenol of *Curcuma longa* L.^[11,12]. The Food and Drug Administration (FDA) of the United States has listed curcumin as “Generally Recognized as Safe” (GRAS), and supplements containing curcumin have been approved for human consumption^[13].

A recent review has shown that curcumin has various biological activities, thanks to its antioxidant and anti-inflammatory properties, which could be cardioprotective, immune-regulating, antineoplastic, and hepatoprotective effects, in addition to positive effects on diabetes and the nervous system^[14]. Moreover, it has shown positive effects on exercise practitioners and athletes. A clinical trial carried out with individuals of both sexes has shown that, after eccentric exercise, supplementation with curcumin (500 mg) significantly reduced EIMD and CK concentrations, leading to better recovery after exercise^[15]. Another study has also shown that curcumin significantly decreased CK levels and muscle pain in men undergoing muscle damage protocol^[16]. The study by Sahin et al.^[17] showed that curcumin prevented muscle damage and improved performance in animals by regulating the pathways of NF- κ B and nuclear factor derived from erythroid 2-like 2 (Nrf2).

From what is known, although curcumin has been extensively studied due to its beneficial potential in physical exercise and sports performance, there is no literature consensus on its effects on acute and/or high-intensity physical exercises. Therefore, we have summarized, from clinical trials, the available evidence of the effects of curcumin supplementation on inflammatory markers, sports performance, and muscle damage during acute physical exercises in sedentary individuals.

2. Methods

2.1 Protocol and Registration

This systematic review was guided by the following research question: “What is the impact of curcumin supplementation on sports performance in sedentary individuals? Second, what are the main inflammatory mechanisms involved in this process? Third, what are the main methodological parameters used to assess the effect of curcumin supplementation on sports performance? ”This systematic review was developed according to the *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews, and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines* ^[18].

2.2 Eligibility Criteria

This study included randomized- controlled clinical trials with sedentary individuals older than 18 years submitted to acute physical exercise, while studies carried out with children, teenagers, seniors, and physically active individuals were excluded. Concerning the intervention type, we have included studies with any dosage and form of curcumin supplementation. Studies in which curcumin supplementation has occurred in combination with other foods or medication were excluded.

2.3 Search

This systematic review was developed according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) guidelines ^[18], which were used as a guide for the selection, screening, and eligibility of studies. The participants, intervention comparators, outcomes, and study design (PICOS) criteria adopted in this study are shown in Table 1.

Six authors (ARC, KAD, LFM, LAO, SMSP, SSP) independently searched for original articles using the following electronic databases: PubMed/ Medline (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Scopus (<https://www.scopus.com/home.uri>), Web of Science (<https://www.webofknowledge.com>) and Embase (<https://www.embase.com>). The descriptors were structured based on search filters built for three domains: (i) curcumin, (ii) exercise, and (iii) human. The filters on the PubMed/Medline platform were constructed using a hierarchical distribution of the MeSH Terms (Medical Subject Headings) and by the algorithm

TIAB (Title and Abstract). These filters were adapted for research in the Scopus platform, Web of Science, and Embase, however, the filter for the original article was provided by the Scopus platform (Table S1). The search strategies were not limited by date and language. The bibliographic search was performed on June 28, 2021.

TABLE 1: PICOS criteria for studies inclusion

Parameter	Inclusion criteria
Participants	Physically inactive adults
Intervention or exposure	Consumption of curcumin Acute physical exercise
Comparison	Placebo (no curcumin supplementation)
Outcome	Inflammation markers, muscle pain, and damage, sports performance and fatigue, biochemical and oxidative markers
Study design	Randomized clinical trials

2.4 Study Selection

The authors (ARC, KAD, LFM, LAO, SMSP, SSP) selected eligible studies following the analysis of their titles and abstracts. The level of agreement among these reviewers was assessed using Kappa (Kappa = 0.909). The information was extracted independently and analyzed separately. After reading titles, abstracts, and full-text analysis, we have included all randomized controlled trials that assessed the effects of curcumin consumption in sedentary adults submitted to acute physical exercise. Letters, reviews, observational studies, book chapters, abstracts, unpublished articles, *in vitro* studies, animal experiments, studies with physically active individuals, and studies that associated curcumin supplementation with another food or medicine were excluded. In addition, two reviewers (KAD and LAO) manually searched the reference lists of the studies selected in the previous step independently evaluated to find additional relevant articles. Selections were then compared, and differences were resolved in consultation with another three reviewers (MMS, RVG, and CMDL).

2.5 Data Extraction Process

After selecting the clinical trials, the data of the publications were extracted using standardized information such as author's name, year of publication, the country where the study was held, sample characteristics (sample size, average age, and anthropometric data), study design, follow-up, intervention characteristics (dose and form of consumption) and primary and secondary outcomes. After the data extraction step, the researchers compared the data to ensure integrity and reliability.

2.6 Risk of Bias

The quality and risk of bias in the studies' methodology were assessed by the criteria described on the SYRCLE's Risk of Bias (RoB) tool (Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation)^[19]. The following methodological domains based on RoB were evaluated according to five domains of bias: (1) selection bias (random sequence generation, baseline characteristics, allocation concealment), (2) performance bias (random housing and blinding of caregivers and/or investigators), (3) detection bias (random outcome assessment, blinding of outcome assessment), (4) attrition bias (incomplete outcome data), (5) reporting bias (selective outcome reporting), and other bias (the ethics committee and statistics).

The studies were categorized independently by the authors in three levels of bias according to the items in the RoB tool and were scored as 'low risk of bias; 'high risk of bias'; or 'unclear' (when the experimental information was not sufficient for categorization). We constructed a figure in Review Manager® 5.4 program, from Cochrane Collaboration (RoB 2.0), to demonstrate the risk of bias across all included studies (Copenhagen: The Nordic Cochrane Center 2020).

2.7 Data Analysis

All the clinical trials reviewed in this article were summarized in a standard data extraction model, according to the main characteristics and results of sports performance, muscle damage, and inflammation markers (Table 3). The studies were chronologically ordered by year of publication. Inflammatory and muscle performance markers were considered the primary outcomes. In addition, we analyzed the effect of the tested dose concerning the duration of clinical trials.

3 Results

3.1 Study Selection

The flowchart with the number of selected and excluded articles in each stage was built according to the PRISMA guidelines (Figure 1). After searching PubMed, Scopus, Web of Science, and Embase, we have identified 5331 articles. Posteriorly, 1960 duplicates were removed, resulting in 3371 articles, of which 3356 were excluded after a reading of the titles. After reading the abstracts and full text, we have excluded 10 articles, of which 9 evaluated the effect of curcumin consumption on physically active or moderately individuals and one did not evaluate parameters of interest, such as inflammatory markers or pain and damage muscle. We have performed the citation search to identify other relevant studies; however, none met the eligibility criteria. Finally, five articles were included in this study.

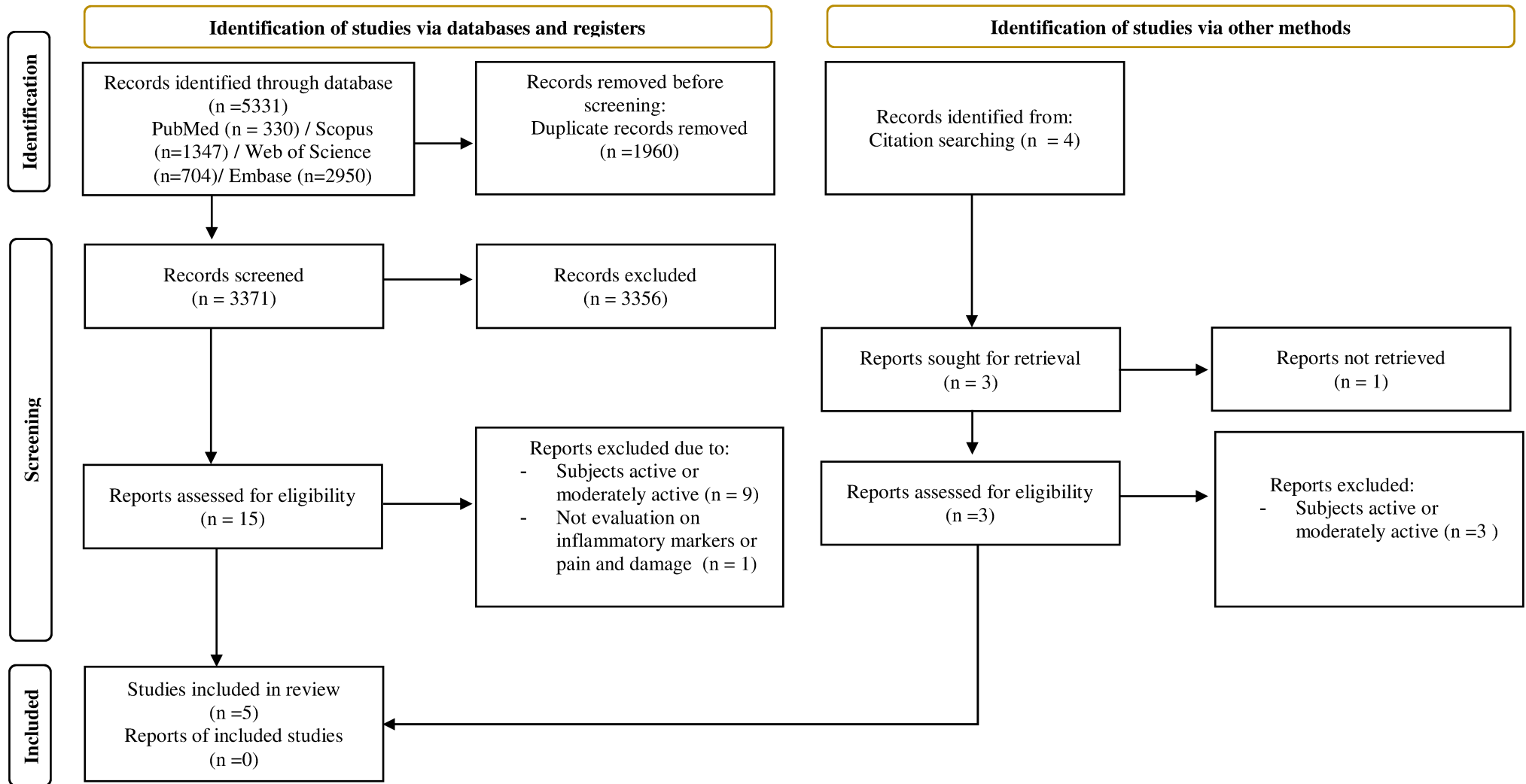


FIGURE 1: PRISMA diagram. Different phases of the selection of studies for conducting qualitative and quantitative analyses. Flow diagram of the systematic review literature search results. Based on “The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews”. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.n7>. From: PAGE, M. J. et al.; The BMJ (2021).

3.2 Description of Included Studies

In the 5 studies included in this review, 98 young adult individuals of both sexes, sedentary and with no comorbidities, were studied. The sample size ranged from 12 to 28 individuals. As for the study sites, three of them were conducted in Japan ^[2,3,20], one in China^[21], and one in the United States ^[22]. All studies were randomized and controlled. The intervention time ranged from 2 days to 4 weeks.

The type of acute exercise performed varied. Regarding the type of acute exercise performed, it was observed that the majority (n=3; 60%) performed eccentric contractions of the elbow flexors; one study (20%) performed a test of six sets of ten leg press repetitions; and one study (20%) performed a 3 rep set of drop jump high (DJH) 70%, DJH 100% (defined as the highest jump height) and DJH 130%, and an acute bike challenge. In most studies, (n=4; 80%), the curcumin was offered as capsules and in one (n=20%) of them, in the form of nanobubbles water extract. In all studies (100%), curcumin was ingested alone, and the control group was curcumin-free.

One study (20%) evaluated the effect of consumption of curcumin, divided into two doses, one before exercise and the other 12 hours after exercise, and one study (20%) used curcumin for six days, starting two days before performing acute physical exercise and continuing 3 days after. Other two studies (40%) also offered curcumin before and after eccentric exercise; this way: one study evaluated the supplementation of curcumin for seven days before the performance of eccentric exercise of the elbow flexors (PRE group) and for four days after the exercise (POST group); other study evaluated this supplementation in two experimental groups, one group received curcumin for seven days before acute exercise and the other for seven days after exercise. Lastly, one study (20%) evaluated the use of curcumin on

performance in acute exercise at two-time points, pre-supplementation and after 4 weeks (post-supplementation).

The amount of curcumin varied from 180 to 400 mg per day. Two studies (40%) evaluated the effect of 180 mg/day of curcumin supplementation for up to 7 days. One study (20%) offered 230.9 mg/day of curcumin for 4 weeks. Another study (20%) evaluated the single-use of 300 mg/day of curcumin divided into two doses of 150 mg. In addition, one study (20%) evaluated the use 400 mg/day of curcumin for up to 6 days (Table 2).

TABLE 2: Effects of different concentrations and exposure time of curcumin before and/or after intense physical exercise on different markers

Evaluated markers	>200mg of curcumin/ day		200– 300mg of curcumin/ day		≥300mg of curcumin/ day
	≤ 7 days		≤ 7 days	>7 days to 28 days	≤ 7 days
	BE	AE	BE+AE	AE	BE+AE
Pro-inflammatory cytokines	n=1	n=1	n=1	-	n=1
Anti-inflammatory cytokines	-	-	-	-	n=1
CK	n=2	n=2	n=1	n=1	n=1
Muscle pain	n=2	n=2	n=1	-	n=1
Muscle performance	n=2	n=2	n=1	n=1	-
Lactate, NH ₃	-	-	-	n=1	-
Biochemical (ALT, ALP, TG, HDL, glucose)	-	-	-	n=1	-
Oxidative Stress	n=1	n=1	-	-	-

BE: before exercise; AE: after exercise; BE+AE: before and after exercise; n: number of studies.

3.3 Studies' Main Results

3.3.1 Inflammation

Most studies included in this review (n=3; 60%) evaluated inflammatory markers. Of these, three studies (60%) evaluated the pro-inflammatory cytokine as tumor necrosis factor- α (TNF- α), which regulates multiple biological processes and it is a mediator of inflammation and one study showed reduction of TNF- α . Two studies (n=40%) also evaluated the pro-inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8). Decreased expression of these cytokines was observed only for IL-6 and IL-8 in 1 and 2 days after curcumin exposure. These interleukins are related to the acute inflammatory response, stimulating the release of acute-phase proteins, as well as neutrophil chemotaxis, respectively^[23]. This acute phase, mediated by pro-inflammatory cytokines, is generally followed by the expression of anti-inflammatory cytokines (Wang et al., 2016). Only one study (n=20%) evaluated the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10), however, there was no difference in these cytokines between treated and receiving placebo in 6 days of treatment.

McFarlin et al. found in a study with 28 individuals, that supplementation of 400 mg/day of curcumin significantly reduced the levels of IL-8 (- 21%; p=0.030) at 1 day (- 21%) and 2 days (- 18%) and TNF- α (- 25%; p=0.028) at 1 day (- 25%), 2 days (- 23%), and 4 days (- 23%) after muscle damage induced by acute leg press exercise. Despite the lack of significance, IL-6 demonstrated a similar response to of IL-8 and TNF- α for the curcumin condition^[22].

In another study with 20 healthy men, Tanabe et al. found that IL-8 serum concentration 12h after the resistance exercise was lower (p=0.033) for the supplementation of 180 mg/day of curcumin (experiment 1). However, TNF- α concentration remained similar between groups^[3]. Thus, the curcumin supplementation significantly reduced inflammation resulting from acute physical exercise (Table 3).

3.3.2 Muscle Pain and Damage

All studies evaluated creatine kinase (CK) (n=5; 100%) as an important clinical biomarker for muscle damage. Thus, most studies (n=3; 60%) observed that treatment with curcumin was able to reduce CK activity, showing benefits of curcumin supplementation in reducing pain and muscle damage by decreasing CK. Serum CK is an important clinical biomarker for muscle damage, such as muscular dystrophy, severe muscle destruction, as well as a marker of peripheral fatigue during physical exercises^[22,21]. In addition, most studies (n=4; 80%) evaluated muscle pain, two of these (50%) reported a reduction in muscle pain. Only one study (20%) evaluated skeletal muscle injury and observed a decrease in the index of a knee injury.

Although inconclusive, studies have shown that curcumin was effective for some aspects of muscle damage and pain after the performance of acute physical exercises. Tanabe et al. found in a crossover study with 14 healthy young men that the consumption of a single dose of 150 mg of curcumin 1 hour before, and another dose of 150 mg 12 hours after 50 maximum eccentric contractions of the elbow flexors, reduced the peak of CK activity, compared to the placebo condition (peak: 7684 ± 8959 IU/L vs. 3398 ± 3562 IU/L; $p < 0,05$).

Similar findings were reported by McFarlin et al. when they found curcumin resulted in a blunted CK response ($p=0,035$) at 1 day (- 44%), 2 days (- 49%), 3 days (- 57%), and 4 days (- 69%) following performing the acute exercise.

In addition, Tanabe et al.^[3] also found a reduction in CK concentrations ($p=0.020$) 5-7 days after exercise and a reduction in the score for muscle pain for the group supplemented with curcumin (experiment 2) 3–6 days after the exercise when compared to the placebo group. Tanabe et al.^[20], in turn, observed that the group supplemented with 180 mg/day of curcumin

for 4 days, presented reduced muscle pain by palpation on the 3rd-day post resistance exercise, and reduce muscle pain by the extension of the elbow joint when compared the placebo group.

Finally, Wang et al. found in a study that the supplementation of 230.9 mg/day of nanobubble water curcumin extract (NCE) before performing a series of drop jumps significantly reduced the knee injury index (15.38%; $p=0.0467$) (peak vertical ground reaction force, PVGRF), these results showing that NCE improved skeletal muscle injury^[21].

TABLE 3: Main characteristics of the studies included in the systematic review

Author, year, country	Sample characteristics	Study design	Intervention characteristics	Follow-up	Exercise test	Main results (Curcumin vs. Control groups)	
						Primary outcome	Secondary outcome
Tanabe et al. (2015) Japan	n: 14 young individuals Gender: M: 14 Age: 23.5 ± 2.3 years old Weight: 65.2 ± 11.3 kg	Single-blind crossover randomized controlled trial	G1: 300 mg/day of curcumin (Theracurcumin Theravalues®) G2: 300 mg/day of placebo (starch)	1 day Capsules administered 1h before (150 mg) and 12h after exercise (150 mg)	50 maximal eccentric contractions of the elbow flexors separated by 4 weeks	↔ IL-6, TNF-α ↓ CK ↔ muscle pain ↔ ROM ↑ MVC Torque	↔ Total work, mean peak torque, upper-arm circumference
McFarlin et al. (2016) USA	n: 28 young individuals Gender: M: 10 W: 18 Age: G1: 20 ± 1 years old G2: 19 ± years old Weight: G1: 62.4 ± 11.4 G2: 65.0 ± 10.3	Double-blind randomized controlled trial	G1: 400 mg/day of curcumin (Long-life) G2: 400 mg/day of placebo (rice flour)	6 days 48h before exercise and for 72h after	6 series of 10 repetitions of eccentric exercise (leg press) with initial load set at 110% of the estimated 1RM	↓ IL-8 e TNF-α ↔ IL-6 e IL-10 ↓ CK ↔ muscle pain	↔ ADL
Tanabe et al. (2019a) Japan	n: 24 healthy adults Gender: M:24 Age: PRE: 28.8 ± 3.6 years old POST: 29.8 ± 3.4 years old CON: 28 ± 3.2 years old Weight:	Single-Blind Parallel Randomized Trial	PRE: 180 mg/day of curcumin capsules (Theracurcumin Theravalues®) POST: 180 mg/day of curcumin (Theracurcumin Theravalues®)	PRE: 7 days before exercise POST: 4 days after exercise CON: 4 days after exercise	30 eccentric contractions of the elbow flexors	↔ CK (PRE and POST) ↓ muscle pain on POST ↑ ROM on POST ↔ MVC Torque, ROM initially	↔ Total work during exercise

	PRE: 65.2 ± 11 kg POST: 71.2 ± 5.6 kg CON: 65.7 ± 5.9 kg		CON: 180 mg/day of placebo				
Tanabe et al. (2019b) Japan	n: 20 healthy adults Gender: M:20 Age: Exp 1: 28.5 ± 3.4 years old Exp 2: 29 ± 3.9 years old Weight: Exp 1: 64.9 ± 10.1 kg Exp 2: 70.7 ± 5.8 kg	Double-blind crossover, randomized controlled trial	Exp 1: G1: 180 mg/day of curcumin capsules (Theracurcumin Theravalues®) G2: placebo (starch) Exp 2: G1: 180 mg/day of curcumin capsules (Theracurcumin Theravalues®) G2: placebo (starch)	Exp 1: 7 days before exercise Exp 2: 7 days after exercise	30 eccentric contractions of the elbow flexors	Exp 1: ↓ IL-8 ↔ TNF-α ↔ CK, muscle pain ↔ MVC, ROM Exp 2: ↔ IL-8, TNF-α ↓ CK, muscle pain ↑ MVC Torque, ROM	Exp 1: ↔ Total work during exercise, d-ROMs, T ₂ , BAP Exp 2: ↔ Total work during exercise, d-ROMs, T ₂ , BAP
Wang et al. (2019) China	n: 12 healthy young individuals Gender: W: 12 Age: 21.2 ± 1.1 years old Weight: G1: 57.1 ± 5.1 kg G2: 56.5 ± 7.6 kg	Double-blind, parallel, randomized, controlled trial	G1: 230.9 mg/day of NCE G2: 15 g/day placebo (maltodextrin)	4 weeks	Single test of 3 repetitions of drop jumps high (DJH) 70%, 100% (defined as the highest jump height) and 130%. Acute bicycle challenge for 15 minutes	↔ CK ↓ Lactate, NH ₃ , knee injury index ↑ Contact time drop jumps (muscle strength);	↓ ALT, ALP, TG ↑ HDL-c ↔ AST, LDH, albumin, glucose

↑: Statistically significant increase; ↔: change without statistical significance; ↓: Statistically significant decrease; M: men; W: women; CK: creatine kinase; IL-6: interleukin 6; IL-8: interleukin 8; IL-10: interleukin 10; TNF-α: tumor necrosis factor-alpha; MVC Torque: Maximum voluntary contraction torque; ROM: range of motion; ALT: alanine aminotransferase; alkaline phosphatase (ALP); aspartate aminotransferase (AST); TG: triglycerides; HDL-c: high-density lipoprotein; LDH: lactate dehydrogenase; ADL: Activities of daily living; T₂: Transverse relaxation time; d-ROMs: Derivatives of reactive oxygen metabolites; BAP: Biological antioxidant potential; Exp: experiment; PRE: PRE group; POST: POST group; CON: Control group; NCE (nanobubble water Curcuma extract); RM: repetition maximum.

3.3.3. Muscle Performance and Fatigue

Supplementation with curcumin has shown improvement in some markers of muscle performance during acute eccentric exercise. Most studies (n = 3; 60%) evaluated a range of motion (ROM) and maximal voluntary contraction (MVC) torque as markers of muscle performance and recovery. Two studies (40%) reported improvement in a range of motion (ROM), also curcumin supplementation improved MVC torque in two studies (40%), which suggests that supplementation contributed to muscle recovery and performance. To reflect better performance during exercise, fatigue needs to be reduced. Lactate is an oxidizable substrate in skeletal muscle and a precursor to gluconeogenesis in muscles after exercise^[24]. In addition, peripheral and central fatigue levels are related to increased ammonia levels during exercise^[21]. Only one study (20%) evaluated muscle strength and muscle fatigue markers (lactate and ammonia (NH₃)), reporting increased muscle strength through increased contact time in drop jumps and reduction of lactate and NH₃ by supplementation with curcumin.

The supplementation of 180 mg/day of curcumin, improved ROM (3–4 days following the exercise), when compared to the placebo group, indicating an improvement in sports performance^[20]. In addition, the magnitude of decrease in MVC torque for the curcumin condition was significantly smaller immediately after exercise and also at 48–96 h after exercise by 13–16 % when compared to the placebo group^[2].

In support of these findings, Tanabe et al. observed that supplementation of 180 mg/day of curcumin (for 7 days – after acute exercise) showed improvement in MVC torque and ROM when compared to the placebo group^[3]. Another study^[21] has found that the contact time in drop jumps high was significantly increased by supplementation with NCE (230.9 mg/day for 4 weeks) (p=0.0487). This increased contact time was due to the increased muscle strength due to the NCE supplementation, corroborating the statement of curcumin's to improve sports and muscle performance. They also have reported a reduction in lactate (18.67%; p=0.0057) and

NH₃ levels (9.02%; p=0.0048) for the group supplemented with curcumin compared to the placebo group, indicating a contribution to reducing fatigue and improving performance.

3.3.4 Biochemical and Oxidative Markers

Only one study (20%) evaluated the effects of curcumin supplementation regarding biochemical markers. Biochemical analyzes can provide clinical information about the subject's physiological adaptation. NCE supplementation showed functional activities related to physiological protection and promotion of recovery^[21]. Wang et al. found that curcumin consumption significantly decreased hepatic alanine aminotransferase (ALT) (35.66%) and aspartate aminotransferase (ALP) (28.65%); levels compared to the placebo condition. As for lipid-related parameters, triglycerides (TG) were significantly reduced (31.96%) in the treated group compared to the placebo group after 4 weeks of supplementation. In addition, increased high-density lipoprotein (HDL) by 1.17 times compared to the placebo group^[21].

Regarding oxidative markers, a single study (20%) assessed the levels of serum concentration of derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and the biological antioxidant potential (BAP). However, there were no significant differences between curcumin and placebo conditions^[3].

3.3.5 Risk of Bias

Regarding the selection bias of the participants, the five articles (n=5; 100%) included in this review were randomized; however, they reported insufficient data on the process of sequence generation and allocation secrecy, making evaluation difficult. As for the blinding of participants and personnel, most of the studies (n=4; 80%) were double-blind, thus displaying low risk for this bias. All studies (n=5; 100%) had a low risk of bias concerning the recording of data on incomplete outcomes since the missing data were balanced among the groups. In terms of the selected reporting of outcomes, all studies (n=5; 100%) were classified as low risk

of bias since the study protocol is not available, but the published articles include all expected results (Figure 2). All studies followed the methodology and presented the proposed results and approval on ethics committee and information regarding the statistics used.

	Random sequence generation (selection bias)	Allocation concealment (selection bias)	Blinding of participants and personnel (performance bias)	Blinding of outcome assessment (detection bias)	Incomplete outcome data (attrition bias)	Selective reporting (reporting bias)	Other bias
McFarlin et al., 2016	?	?	?	?	+	+	+
Tanabe et al., 2015	?	?	?	?	+	+	+
Tanabe et al., 2019a	?	?	+	?	+	+	+
Tanabe et al., 2019b	?	?	?	?	+	+	+
Wang et al., 2019	?	?	?	?	+	+	+

FIGURE 2: Risk of bias summary: review authors' judgments about the risk of bias item for each included study. The items in the Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE) risk of bias assessment were scored with "yes" indicating low risk of bias, "no" indicating high risk of bias, or "unclear" indicating that the item was not reported, resulting in an unknown risk of bias. Green: low risk of bias; Yellow: unclear risk of bias; and Red: high risk of bias.

4 Discussion

In our study, we performed a systematic review to investigate the available scientific evidence of the effects of curcumin supplementation on inflammatory markers, and muscle damage, and sports performance during acute physical exercise in sedentary individuals. In addition, we analyzed the methodological quality of studies that address this issue. Curcumin

supplementation reduced inflammation and muscle pain resulting from acute physical activity. In addition, its improved muscle recovery, sports performance and reduced fatigue (Figure 3).

Regular physical exercise promotes health benefits^[25]. However, long-term acute and intense physical exercise, associated with the insufficient recovery period, results in muscle damage, increased reactive oxygen species (ROS), and inflammation^[26,27]. The production of ROS can alter cellular functions and cause inflammation, leading to increased fatigue, decreased muscle function, and performance^[28-30]. When practiced with adequate intensity and volume, post-exercise inflammatory responses are physiological and indispensable for the regeneration of damaged muscles. However, when uncontrolled, they can impair muscle regeneration, leading to oxidative damage, protein catabolism, and late-onset muscle pain, resulting in decreased sports performance^[31,32]. In this sense, controlling or minimizing marked inflammatory responses as well as muscle damage can promote faster recovery; maximize training and performance, in addition to preventing injuries^[2].

Thus, supplementation with dietary compounds has been increasingly frequent for potential use in improving sports performance and accelerating post-exercise recovery. Scientific evidence has shown curcumin's potential in reducing post-exercise inflammation^[17,20,22]. The mechanisms involved are related to its ability to modulate pro-inflammatory cytokines and signaling pathways, in addition to its effectiveness in blocking the increased activation of NF- κ B, which in turn, regulates the expression of TNF- α and inflammatory proteins^[17,33-37].

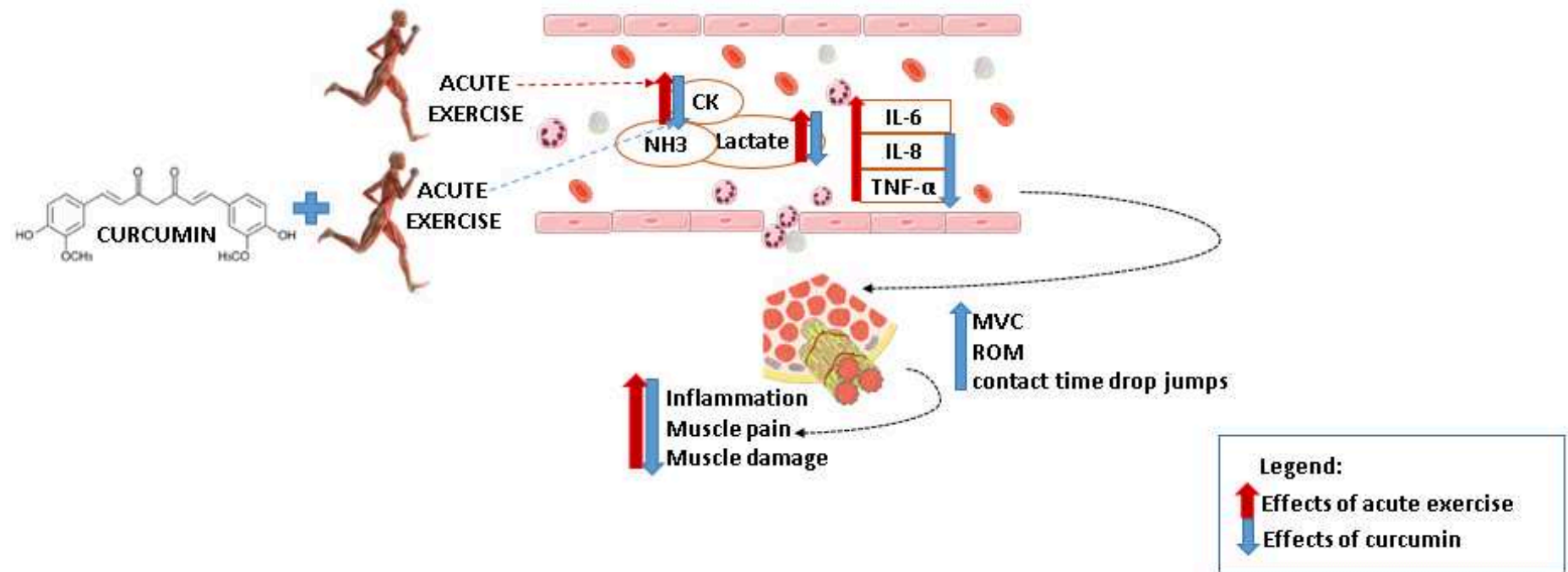


FIGURE 3: Potential positive effects of curcumin supplementation during acute physical exercises in sedentary individuals. CK: creatine kinase; NH₃: ammonia; IL-6: interleukin 6; IL-8: interleukin 8; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha; MVC Torque: Maximum voluntary contraction torque; ROM: range of motion.

The pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and IL-8, were evaluated as markers of inflammation by the studies included in this systematic review^[2,3,22]. Tanabe et al.^[2] observed no effect of curcumin supplementation for TNF- α . However, McFarlin et al.^[22] reported sustained suppression of TNF- α in the curcumin-supplemented group compared to the placebo group. Curcumin's effectiveness in reducing TNF- α may be subject to a minimum dosage of 400 mg administered before and for 72 hours after exercise, which may explain the differences observed concerning the studies by Tanabe et al.^[2].

McFarlin et al.^[22] reported that supplementation with 400 mg of curcumin effectively reduced IL-8 levels resulting from exercise practice. In the study by Tanabe et al.^[3], 7 days of 180 mg of curcumin supplementation before exercise also reduced the serum concentration of IL-8 12 hours after exercise. McFarlin et al.^[22] observed that the inhibition of the transcription factor NF- κ B could be related to the reduction of IL-8 levels and the tendency to decrease to IL-6. Studies have shown that the promoters of the cytokines IL-6 and IL-8 have binding sites for NF- κ B, C / EBP β , and c-Jun^[38,39]. Thus, curcumin's therapeutic potential in inflammation may be related to its direct action of inhibiting NF- κ B, which influences the regulation of the expression of IL-6 and IL-8^[40].

Recent studies with protocols that used curcumin supplementation ranging from 0.18 g to 0.4 g / day also have shown benefits in reducing pain and muscle damage, which reflects in the decrease in serum CK^[2,3,22]. Intense exercise leads to an increase in muscle injury markers, such as CK and lactate dehydrogenase (LDH), which are used as an indication of increased muscle damage induced by exercise (EIMD)^[41,42]. EIMD can affect muscle pain performance and enzyme activity, reducing the sports performance of athletes and physical activity practitioners^[42-44].

In this sense, all studies included in this review evaluated the ability of curcumin to mitigate muscle pain and damage, in addition to preventing injuries^[2,3,20-22]. In two studies,

Tanabe et al.^[3,20] described that the administration of 180 mg of curcumin (Theracumin-Theravalues[®]) caused a significant reduction in muscle pain, when administered four^[3] and seven^[20] days later the eccentric contraction exercise.

However, Tanabe et al.^[2] have found no significant effect on muscle pain using 150 mg of curcumin or placebo orally before and 12 hours after eccentric exercise. In addition, Mcfarlin et al.^[22] have also reported no difference in subjective quadriceps muscle pain or daily life activities when investigating the effect of supplementation with curcumin (400 mg 24 hours before and 72 hours after) compared to placebo. Thus, curcumin supplementation may have affected pain and muscle damage when administered on recovery days^[3] and for a longer period^[20]. Even so, differences in muscle pain results may be due to the subjective and individual perception of pain intensity among participants of the studies.

The effect of curcumin supplementation on serum CK activity levels after exercise was investigated by four studies included in this review^[2,3,20,22]. Three of them have shown significantly lower serum CK levels in the group supplemented with curcumin when compared to the placebo group^[2,3,22]. Although Tanabe et al.^[20] did not report significant differences, they observed that CK levels showed less tendency to increase in the group supplemented with curcumin.

Thus, it is possible that the direct action of curcumin in the inhibition of NF- κ B can inhibit enzymes that generate ROS, such as COX-2^[39]. It has also been reported that another possible mechanism for reducing CK activity through curcumin is the inhibition of the production of histamine and prostaglandin due to the suppression of the positive regulation of COX-2, showing a protective effect of the membrane, influencing vascular permeability. This inhibition reduces the permeability of the membranes, reducing the intracellular flow of CK. Thus, vascular permeability may be the key factor in reducing muscle inflammation and pain caused by EIMD^[45,46].

The EIMD triggers an inflammatory response associated with decreased muscle strength, ROM, localized swelling, DOMS, and increased CK, lactate dehydrogenase (LDH), and myoglobin (Mb)^[5]. Mechanical stress during acute exercise and subsequent inflammatory responses lead to reduced muscle performance. Thus, MVC and ROM changes reflect the EIMD dimension and therefore, these parameters can be used as performance markers^[47]. In this sense, Tanabe et al.^[2] and Tanabe et al.^[20] demonstrated curcumin's action on muscle performance. They have found that curcumin supplementation 180 mg/day for 4 and 7 days after performing eccentric exercises, respectively, improved range of motion (ROM). The improvement in MVC torque or the lesser magnitude of its decline among those who consumed curcumin after exercise has also been found by the same group of researchers^[2,3].

The MVC and ROM markers are decreased by the activation of NF- κ B under high mechanical stress caused by the excessive use of some joints in sport, which generates fragments of the extracellular matrix of bone or cartilage^[47]. Innate immunity recognizes these fragments by toll-like receptors. The cellular activation of NF- κ B mediated by this process stimulates the secretion of products responsible for the production of tissue damage, such as inflammatory cytokines (IL-1, IL-1b, IL-2, IL-15, IL-21, TNF- α), chemokines (CCL-19, CCR-7), and metalloproteases (MMP-13, ADAMSTS-4) (Wainstein GE 2014). The action of curcumin probably minimizes the disabling effects of the tissue, blocking the NF- κ B signaling pathway and thus providing less muscle damage and a consequently a smaller decrease in MVC and ROM^[48,49].

In addition, the increased serum concentrations of NH₃ and lactate during exercise are related to muscle fatigue and intensifies according to the intensity and length of the exercise. High concentrations of lactate and ammonia indicate an increased concentration of hydrogen ions and consequent muscle acidosis, which reduces the strength and working capacity of muscles^[50]. Wang et al.^[21] reported a reduction in lactate and ammonia (NH₃) levels among

participants who ingested curcumin when compared to the placebo group, consequently showing a reduction in muscle fatigue.

The results by Wang et al.^[21] also, show that consumption of 230.9 mg/day of curcumin before acute exercise decreased exercise-induced liver injury indicators (aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT)) and improved lipid metabolism through decreased triglycerides (TG) and increased levels of high-density lipoprotein (HDL) compared to the placebo group. In turn, ROS is related to the disruption of the cell membrane integrity caused by lipid peroxidation, with the consequent release of specific cytosol enzymes or proteins, such as AST and ALT in the blood^[51].

Curcumin supplementation reduces damage and improves liver inflammation^[52] by inhibiting NF- κ B activation, decreasing ICAM-1, COX-2, and MCP-1, and reducing intrahepatic gene expression of monocyte chemo-attracting protein-1, CD11b, pro-collagen type I, and tissue metalloproteinase inhibitor^[53,54]. In addition, this compound can affect adiposity and lipid metabolism through several mechanisms, including the modulation of energy metabolism and inflammation^[55]. In clinical practice, there is evidence about the effectiveness of curcumin supplementation in reducing levels of plasma triglycerides and cholesterol^[36,56,57], which suggests its hypocholesterolemic effect^[17].

Curcumin has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) as a safe compound^[13]. In addition, clinical trials have assessed its safety and concluded that dosages up to 12 g / day are safe and non-toxic for human consumption for 3 months^[13,58]. Only one^[22], out of the five studies included in this review evaluated the side effects of curcumin supplementation, and no adverse gastrointestinal effects were reported.

The low number of clinical trials found on this topic can be pointed out as a limitation of this review. In addition, the bias analysis showed that fundamental characteristics, such as random sequence generation or random outcome assessment and blinding of participants

(caregivers and outcome assessor), were not reported with sufficient information in the studies. Overall, the evidence of the individual studies showed wide heterogeneity and so it was not possible to compare the data statistically.

Therefore, further studies are necessary to ensure the benefits of curcumin supplementation during acute and high-intensity physical exercises and to elucidate other possible mechanisms. However, through its systematic approach, this review contributes new information to the literature. In addition, another strength of this study is its quality control based on the PRISMA method, peer review, and assessment of the risk of bias using the Cochrane Collaboration tool^[18].

In addition, the formulation and dosage of curcumin and the period of supplementation were different between studies, which may influence some of the results due to the differences associated with the bioavailability of curcumin. Recently, the development of curcuminoid formulations to improve its biological activity, bioavailability, and pharmacokinetics is under investigation^[59,60].

Further studies are necessary to investigate the effectiveness of these new formulations on inflammatory parameters and muscle damage induced by acute exercise.

5 Conclusion

Curcumin supplementation has shown the ability to improve sports performance, providing less EIMD and reduced fatigue by decreasing CK activity. In addition, curcumin exerts an anti-inflammatory effect by modulating pro-inflammatory cytokines. Curcumin supplementation is safe and probably resents beneficial sport potential, demonstrating effectiveness before and/or after acute physical exercise in sedentary individuals.

The Prospero platform registration number is CRD42021262718.

Data Availability

The data can be made available upon request through the email: kelly.dias@ufv.br.

Conflict of Interest

The authors declare that they have not conflicted of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to the support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil (CNPq) (Finance Code 428701/2018-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - Brazil (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES).

Supplementary Materials

Table S1: Full search strategy in PubMed, Scopus, Web of Science, and Embase including search terms and filters.

Data base	Descriptors	Items Found	Time	Date
P u b M e d	Curcumin: #1 ("curcumin"[MeSH Terms] OR curcumin [TIAB] OR "curcuma" [MeSH Terms] OR turmeric [TIAB])	19.011	07:47	28/06/21
	Exercise: #2 ("exercise" [MeSH Terms] OR exercise [TIAB] OR resistance [TIAB] OR acute exercise [TIAB] OR aerobic exercise [TIAB] OR "sports" [MeSH Terms] OR sports [TIAB])	1.257.560	07:52	28/06/21
	Human: #3 ("Human" [MeSH Terms] OR Human [TIAB])	2.628.691	07:54	28/06/21
	Total: #1 and #2 and #3	330	08:00	28/06/21
Data base	Descriptors	Items Found	Time	Date
S c o P u s	Curcumin: #1 (TITLE-ABS-KEY (curcumin) OR TITLE- ABS-KEY(curcuma) OR TITLE-ABS- KEY(turmeric))	38.817	12:55	28/06/21
	Exercise: #2 (TITLE-ABS-KEY(exercise) OR TITLE-ABS- KEY(resistance) OR TITLE-ABS-KEY("acute exercise") OR TITLE-ABS-KEY("aerobic exercise") OR TITLE-ABS-KEY(sports))	3.053.579	12:58	28/06/21
	Human: #3 (TITLE-ABS-KEY(human))	23.246.898	13:02	28/06/21
	Total: #1 and #2 and #3	1.347	13:06	28/06/21
Data base	Descriptors	Items Found	Time	Date
W e b O f S c i e	Curcumin: #1 TS=(curcumin OR curcuma OR turmeric)	30.152	11:50	28/06/21
	Exercise: #2 TS=(exercise OR resistance OR acute exercise OR aerobic exercise OR sports)	2.325.005	11:53	28/06/21
	Human: #3 TS=(Human)	4.180.318	11:56	28/06/21

n c e	Total: #1 and #2 and #3	704	12:00	28/06/21
Data base	Descriptors	Items Found	Time	Date
E M B A S E	Curcumin: #1 (curcumin OR curcuma OR 'curcuma longa' OR turmeric)	35.053	11:32	28/06/21
	Exercise: #2 (exercise OR resistance OR 'acute exercise' OR 'aerobic exercise' OR sport OR 'exercise test')	1.987.743	11:36	28/06/21
	Human: #3 (human)	24.557.631	11:40	28/06/21
	Total: #1 and #2 and #3	2.950	11:44	28/06/21

References

- (1) Huang, C. C.; Huang, W. C.; Yang, S. C.; Chan, C. C.; Lin, W. T. Ganoderma Tsugae Hepatoprotection against Exhaustive Exercise-Induced Liver Injury in Rats. *Molecules* **2013**, *18* (2), 1741–1754. <https://doi.org/10.3390/molecules18021741>.
- (2) Tanabe, Y.; Maeda, S.; Akazawa, N.; Zempo-Miyaki, A.; Choi, Y.; Ra, S. G.; Imaizumi, A.; Otsuka, Y.; Nosaka, K. Attenuation of Indirect Markers of Eccentric Exercise-Induced Muscle Damage by Curcumin. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2015**, *115* (9), 1949–1957. <https://doi.org/10.1007/s00421-015-3170-4>.
- (3) Tanabe, Y.; Chino, K.; Ohnishi, T.; Ozawa, H.; Sagayama, H.; Maeda, S.; Takahashi, H. Effects of Oral Curcumin Ingested before or after Eccentric Exercise on Markers of Muscle Damage and Inflammation. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* **2019**, *29* (4), 524–534. <https://doi.org/10.1111/sms.13373>.
- (4) Fridén, J.; Lieber, R. L. Structural and Mechanical Basis of Exercise-Induced Muscle Injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* **1992**, *24* (5), 521–529. <https://doi.org/10.1249/00005768-199205000-00005>.
- (5) Fatouros, I. G.; Jamurtas, A. Z. Insights into the Molecular Etiology of Exercise-Induced Inflammation: Opportunities for Optimizing Performance. *Journal of Inflammation Research*. Dove Medical Press Ltd October 21, 2016, pp 175–186. <https://doi.org/10.2147/JIR.S114635>.
- (6) Drobic, F.; Riera, J.; Appendino, G.; Togni, S.; Franceschi, F.; Valle, X.; Pons, A.; Tur, J. Reduction of Delayed Onset Muscle Soreness by a Novel Curcumin Delivery System (Meriva®): A Randomised, Placebo-Controlled Trial. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2014**, *11* (1). <https://doi.org/10.1186/1550-2783-11-31>.
- (7) Sciberras, J. N.; Galloway, S. D. R.; Fenech, A.; Grech, G.; Farrugia, C.; Duca, D.; Mifsud, J. The Effect of Turmeric (Curcumin) Supplementation on Cytokine and Inflammatory Marker Responses Following 2 Hours of Endurance Cycling. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2015**, *12* (1). <https://doi.org/10.1186/s12970-014-0066-3>.
- (8) González-Bartholin, R.; Mackay, K.; Valladares, D.; Zbinden-Foncea, H.; Nosaka, K.; Peñailillo, L. Changes in Oxidative Stress, Inflammation and Muscle Damage Markers Following Eccentric versus Concentric Cycling in Older Adults. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2019**, *119* (10), 2301–2312. <https://doi.org/10.1007/s00421-019-04213-7>.
- (9) Howatson, G.; McHugh, M. P.; Hill, J. A.; Brouner, J.; Jewell, A. P.; Van Someren, K. A.; Shave, R. E.; Howatson, S. A. Influence of Tart Cherry Juice on Indices of Recovery Following Marathon Running. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* **2010**, *20* (6), 843–852. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2009.01005.x>.
- (10) Trombold, J. R.; Barnes, J. N.; Critchley, L.; Coyle, E. F. Ellagitannin Consumption Improves Strength Recovery 2-3 d after Eccentric Exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2010**, *42* (3), 493–498. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181b64edd>.
- (11) Kiuchi, F.; Goto, Y.; Sugimoto, N.; Tsuda, Y.; Akao, N.; Kondo, K. Nematocidal Activity of Turmeric: Synergistic Action of Curcuminoids. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41* (9), 1640–1643. <https://doi.org/10.1248/cpb.41.1640>.
- (12) Kocaadam, B.; Şanlıer, N. Curcumin, an Active Component of Turmeric (*Curcuma Longa*), and Its Effects on Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57* (13), 2889–2895.

- <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077195>.
- (13) Gupta, S. C.; Patchva, S.; Aggarwal, B. B. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *AAPS Journal*. AAPS J January 2013, pp 195–218. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9432-8>.
 - (14) Xu, X. Y.; Meng, X.; Li, S.; Gan, R. Y.; Li, Y.; Li, H. Bin. Bioactivity, Health Benefits, and Related Molecular Mechanisms of Curcumin: Current Progress, Challenges, and Perspectives. *Nutrients* **2018**, *10* (10). <https://doi.org/10.3390/nu10101553>.
 - (15) Amalraj, A.; Divya, C.; Gopi, S. The Effects of Bioavailable Curcumin (Cureit) on Delayed Onset Muscle Soreness Induced by Eccentric Continuous Exercise: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Study. *J. Med. Food* **2020**, *23* (5), 545–553. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.4533>.
 - (16) MS, S. A. B.; Waldman, PhD, H. S.; Krings, PhD, B. M.; Lamberth, PhD, J.; Smith, PhD, J. E. W.; McAllister, PhD, M. J. Effect of Curcumin Supplementation on Exercise-Induced Oxidative Stress, Inflammation, Muscle Damage, and Muscle Soreness. *J. Diet. Suppl.* **2020**, *17* (4), 401–414. <https://doi.org/10.1080/19390211.2019.1604604>.
 - (17) Sahin, K.; Pala, R.; Tuzcu, M.; Ozdemir, O.; Orhan, C.; Sahin, N.; Juturu, V. Curcumin Prevents Muscle Damage by Regulating NF-KB and Nrf2 Pathways and Improves Performance: An in Vivo Model. *J. Inflamm. Res.* **2016**, *9*, 147–154. <https://doi.org/10.2147/JIR.S110873>.
 - (18) Page, M. J.; McKenzie, J. E.; Bossuyt, P. M.; Boutron, I.; Hoffmann, T. C.; Mulrow, C. D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J. M.; Akl, E. A.; Brennan, S. E.; Chou, R.; Glanville, J.; Grimshaw, J. M.; Hróbjartsson, A.; Lalu, M. M.; Li, T.; Loder, E. W.; Mayo-Wilson, E.; McDonald, S.; McGuinness, L. A.; Stewart, L. A.; Thomas, J.; Tricco, A. C.; Welch, V. A.; Whiting, P.; Moher, D. The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *The BMJ*. 2021. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>.
 - (19) Hooijmans, C. R.; Rovers, M. M.; De Vries, R. B. M.; Leenaars, M.; Ritskes-Hoitinga, M.; Langendam, M. W. SYRCLE’s Risk of Bias Tool for Animal Studies. *BMC Med. Res. Methodol.* **2014**, *14* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.
 - (20) Tanabe, Y.; Chino, K.; Sagayama, H.; Lee, H. J.; Ozawa, H.; Maeda, S.; Takahashi, H. Effective Timing of Curcumin Ingestion to Attenuate Eccentric Exercise-Induced Muscle Soreness in Men. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **2019**, *65* (1), 82–89. <https://doi.org/10.3177/jnsv.65.82>.
 - (21) Wang, I. L.; Hsiao, C. Y.; Li, Y. H.; Meng, F. B.; Huang, C. C.; Chen, Y. M. Nanobubbles Water Curcumin Extract Reduces Injury Risks on Drop Jumps in Women: A Pilot Study. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2019**, *2019*. <https://doi.org/10.1155/2019/8647587>.
 - (22) McFarlin, B. K.; Venable, A. S.; Henning, A. L.; Sampson, J. N. B.; Pennel, K.; Vingren, J. L.; Hill, D. W. Reduced Inflammatory and Muscle Damage Biomarkers Following Oral Supplementation with Bioavailable Curcumin. *BBA Clin.* **2016**, *5*, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.02.003>.
 - (23) Kawanishi, N.; Mizokami, T.; Niihara, H.; Yada, K.; Suzuki, K. Macrophage Depletion

- by Clodronate Liposome Attenuates Muscle Injury and Inflammation Following Exhaustive Exercise. *Biochem. Biophys. Reports* **2016**, *5*, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.11.022>.
- (24) BROOKS, G. A. Intra- and Extra-Cellular Lactate Shuttles. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **2000**, *32* (4), 790–799.
- (25) Steele, J.; Fisher, J.; Skivington, M.; Dunn, C.; Arnold, J.; Tew, G.; Batterham, A. M.; Nunan, D.; O’Driscoll, J. M.; Mann, S.; Beedie, C.; Jobson, S.; Smith, D.; Vigotsky, A.; Phillips, S.; Estabrooks, P.; Winett, R. A Higher Effort-Based Paradigm in Physical Activity and Exercise for Public Health: Making the Case for a Greater Emphasis on Resistance Training. *BMC Public Health*. BioMed Central Ltd. April 5, 2017, p 300. <https://doi.org/10.1186/s12889-017-4209-8>.
- (26) Lira, F. S.; Neto, J. R.; Pimentel, G. D.; Caperuto, E. C.; Mello, M. T. de; Rodrigues, B.; Marques, S. de O.; Souza, C. T. de; Santos, R. V. T. dos. Importância Dos Efeitos Fisiológicos Do Exercício Na Promoção Da Saúde. *Revista Inova Saúde*. 2012.
- (27) Campbell, M. S.; Carlini, N. A.; Fleenor, B. S. Influence of Curcumin on Performance and Post-Exercise Recovery. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc. 2020. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1754754>.
- (28) Finaud, J.; Lac, G.; Filaire, E. Oxidative Stress: Relationship with Exercise and Training. *Sports Medicine*. Sports Med 2006, pp 327–358. <https://doi.org/10.2165/00007256-200636040-00004>.
- (29) Sallam, N.; Laher, I. Exercise Modulates Oxidative Stress and Inflammation In Aging and Cardiovascular Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**.
- (30) Radak, Z.; Taylor, A. W. Exercise and Hormesis. In *The Science of Hormesis in Health and Longevity*; Elsevier, 2018; pp 63–73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814253-0.00005-X>.
- (31) García-López, D.; Cuevas, M. J.; Almar, M.; Lima, E.; De Paz, J. A.; González-Gallego, J. Effects of Eccentric Exercise on NF-KB Activation in Blood Mononuclear Cells. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2007**, *39* (4), 653–664. <https://doi.org/10.1249/mss.0b013e31802f04f6>.
- (32) Ferraro, E.; Giammarioli, A. M.; Chiandotto, S.; Spoletini, I.; Rosano, G. Exercise-Induced Skeletal Muscle Remodeling and Metabolic Adaptation: Redox Signaling and Role of Autophagy. *Antioxidants Redox Signal.* **2014**, *21* (1), 154–176. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5773>.
- (33) Li, H. Y.; Yang, M.; Li, Z.; Meng, Z. Curcumin Inhibits Angiotensin II-Induced Inflammation and Proliferation of Rat Vascular Smooth Muscle Cells by Elevating PPAR- γ Activity and Reducing Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *39* (5), 1307–1316. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2924>.
- (34) Wang, J.; Wang, H.; Zhu, R.; Liu, Q.; Fei, J.; Wang, S. Anti-Inflammatory Activity of Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles in IL-1 β Transgenic Mice Subjected to the Lipopolysaccharide-Induced Sepsis. *Biomaterials* **2015**, *53*, 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.116>.
- (35) Antoine, F.; Girard, D. Curcumin Increases Gelatinase Activity in Human Neutrophils by a P38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)-Independent Mechanism. *J.*

- Immunotoxicol.* **2015**, *12* (2), 188–193.
<https://doi.org/10.3109/1547691X.2014.917749>.
- (36) Panahi, Y.; Khalili, N.; Hosseini, M. S.; Abbasinazari, M.; Sahebkar, A. Lipid-Modifying Effects of Adjunctive Therapy with Curcuminoids-Piperine Combination in Patients with Metabolic Syndrome: Results of a Randomized Controlled Trial. *Complement. Ther. Med.* **2014**, *22* (5), 851–857.
<https://doi.org/10.1016/j.ctim.2014.07.006>.
- (37) Zhang, Y.; Liu, Z.; Wu, J.; Bai, B.; Chen, H.; Xiao, Z.; Chen, L.; Zhao, Y.; Lum, H.; Wang, Y.; Zhang, H.; Liang, G. New MD2 Inhibitors Derived from Curcumin with Improved Anti-Inflammatory Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *148*, 291–305.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.008>.
- (38) Georganas, C.; Liu, H.; Perlman, H.; Hoffmann, A.; Thimmapaya, B.; Pope, R. M. Regulation of IL-6 and IL-8 Expression in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts: The Dominant Role for NF- κ B But Not C/EBP β or c-Jun. *J. Immunol.* **2000**, *165* (12), 7199–7206. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.7199>.
- (39) Khalaf, H.; Jass, J.; Olsson, P. E. Differential Cytokine Regulation by NF- κ B and AP-1 in Jurkat T-Cells. *BMC Immunol.* **2010**, *11*. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-26>.
- (40) Dongari-Bagtzoglou, A. I.; Ebersole, J. L. Increased Presence of Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 Secreting Fibroblast Subpopulations in Adult Periodontitis. *J. Periodontol.* **1998**, *69* (8), 899–910. <https://doi.org/10.1902/jop.1998.69.8.899>.
- (41) Tee, J. C.; Bosch, A. N.; Lambert, M. I. Metabolic Consequences of Exercise-Induced Muscle Damage. *Sports Medicine*. Adis International Ltd October 2, 2007, pp 827–836. <https://doi.org/10.2165/00007256-200737100-00001>.
- (42) Córdova, A.; Mielgo-Ayuso, J.; Fernandez-Lazaro, C. I.; Caballero-García, A.; Roche, E.; Fernández-Lázaro, D. Effect of Iron Supplementation on the Modulation of Iron Metabolism, Muscle Damage Biomarkers and Cortisol in Professional Cyclists. *Nutrients* **2019**, *11* (3). <https://doi.org/10.3390/nu11030500>.
- (43) Proske, U.; Morgan, D. L. Muscle Damage from Eccentric Exercise: Mechanism, Mechanical Signs, Adaptation and Clinical Applications. *Journal of Physiology*. J Physiol December 1, 2001, pp 333–345. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00333.x>.
- (44) Järvinen, T. A. H.; Järvinen, M.; Kalimo, H. Regeneration of Injured Skeletal Muscle after the Injury. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*. CIC Edizioni Internazionali October 2013, pp 337–345. <https://doi.org/10.11138/mltj/2013.3.4.337>.
- (45) Moriyuki, K.; Sekiguchi, F.; Matsubara, K.; Nishikawa, H.; Kawabata, A. Curcumin Inhibits the Proteinase-Activated Receptor-2-Triggered Prostaglandin E₂ Production by Suppressing Cyclooxygenase-2 Upregulation and Akt-Dependent Activation of Nuclear Factor- κ B in Human Lung Epithelial Cells. *J. Pharmacol. Sci.* **2010**, *114* (2), 225–229. <https://doi.org/10.1254/jphs.10126SC>.
- (46) Nugroho, A. E.; Ikawati, Z.; Sardjiman; Maeyama, K. Effects of Benzylidenecyclopentanone Analogues of Curcumin on Histamine Release from Mast Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32* (5), 842–849. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.842>.
- (47) Fernández-Lázaro, D.; Mielgo-Ayuso, J.; Calvo, J. S.; Martínez, A. C.; García, A. C.;

- Fernandez-Lazaro, C. I. Modulation of Exercise-Induced Muscle Damage, Inflammation, and Oxidative Markers by Curcumin Supplementation in a Physically Active Population: A Systematic Review. *Nutrients*. MDPI AG February 1, 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12020501>.
- (48) Alamdari, N.; O'Neal, P.; Hasselgren, P.-O. Curcumin and Muscle Wasting – a New Role for an Old Drug? *Nutrition* **2009**, *25* (2), 125–129.
- (49) Daily, J. W.; Yang, M.; Park, S. Efficacy of Turmeric Extracts and Curcumin for Alleviating the Symptoms of Joint Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Journal of Medicinal Food*. Mary Ann Liebert Inc. August 1, 2016, pp 717–729. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3705>.
- (50) Bertuzzi, R. C. de M.; Silva, A. E. L.; Abad, C. C. C.; Pire, F. de O. Metabolismo Do Lactato: Uma Revisão Sobre a Bioenergética e a Fadiga Muscular. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum* **2009**, *11* (2), 226–234.
- (51) Huang, W. C.; Chiu, W. C.; Chuang, H. L.; Tang, D. W.; Lee, Z. M.; Li, W.; Chen, F. A.; Huang, C. C. Effect of Curcumin Supplementation on Physiological Fatigue and Physical Performance in Mice. *Nutrients* **2015**, *7* (2), 905–921. <https://doi.org/10.3390/nu7020905>.
- (52) Ramirez-Tortosa, M. C.; Ramirez-Tortosa, C. L.; Mesa, M. D.; Granados, S.; Gil, Á.; Quiles, J. L. Curcumin Ameliorates Rabbits's Steatohepatitis via Respiratory Chain, Oxidative Stress, and TNF- α . *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47* (7), 924–931. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.015>.
- (53) Leclercq, I. A.; Farrell, G. C.; Sempoux, C.; Peña, A. Dela; Horsmans, Y. Curcumin Inhibits NF-KB Activation and Reduces the Severity of Experimental Steatohepatitis in Mice. *J. Hepatol.* **2004**, *41* (6), 926–934. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.08.010>.
- (54) Vizzutti, F.; Provenzano, A.; Galastri, S.; Milani, S.; Delogu, W.; Novo, E.; Caligiuri, A.; Zamara, E.; Arena, U.; Laffi, G.; Parola, M.; Pinzani, M.; Marra, F. Curcumin Limits the Fibrogenic Evolution of Experimental Steatohepatitis. *Lab. Investig.* **2010**, *90* (1), 104–115. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.112>.
- (55) Panzhinskiy, E.; Hua, Y.; Lapchak, P. A.; Topchiy, E.; Lehmann, T. E.; Ren, J.; Nair, S. Novel Curcumin Derivative CNB-001 Mitigates Obesity-Associated Insulin Resistances. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2014**, *349* (2), 248–257. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208728>.
- (56) Mohammadi, A.; Sahebkar, A.; Iranshahi, M.; Amini, M.; Khojasteh, R.; Ghayour-Mobarhan, M.; Ferns, G. A. Effects of Supplementation with Curcuminoids on Dyslipidemia in Obese Patients: A Randomized Crossover Trial. *Phyther. Res.* **2013**, *27* (3), 374–379. <https://doi.org/10.1002/ptr.4715>.
- (57) Sahebkar, A.; Serban, M.; Ursoniu, S.; Banach, M. Effect of Curcuminoids on Oxidative Stress : A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 898–909. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.005>.
- (58) Epstein, J.; Sanderson, I. R.; MacDonald, T. T. Curcumin as a Therapeutic Agent: The Evidence from in Vitro, Animal and Human Studies. *British Journal of Nutrition*. Br J Nutr June 2010, pp 1545–1557. <https://doi.org/10.1017/S0007114509993667>.
- (59) Sasaki, H.; Sunagawa, Y.; Takahashi, K.; Imaizumi, A.; Fukuda, H.; Hashimoto, T.;

- Wada, H.; Katanasaka, Y.; Kakeya, H.; Fujita, M.; Hasegawa, K.; Morimoto, T. Innovative Preparation of Curcumin for Improved Oral Bioavailability. *Biol. Pharm. Bull.* **2011**, *34* (5), 660–665. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.660>.
- (60) Trivedi, M. K.; Mondal, S. C.; Gangwar, M.; Jana, S. Immunomodulatory Potential of Nanocurcumin-Based Formulation. *Inflammopharmacology* **2017**, *25* (6), 609–619. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0395-3>.

6.2 ARTIGO 2: Efeito protetor do concentrado proteico de soro de leite adicionado de curcumina no balanço oxidativo, inflamação e na histopatologia do músculo de ratos *Wistar* submetidos a exercício exaustivo

Resumo

Exercícios físicos extenuantes podem induzir alterações musculares significativas como inflamação, geração de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio (EROs). Nesse sentido, o consumo de compostos nutricionais com capacidade de influenciar positivamente no balanço oxidativo e prevenir a instalação de um processo inflamatório exacerbado têm sido estudados. A curcumina (CCM), quando adicionada a uma proteína de alto valor biológico, como o concentrado proteico de soro de leite (WPC), pode promover benefícios adicionais à saúde. Este estudo foi conduzido para avaliar o efeito do WPC adicionado de CCM no balanço oxidativo, inflamação e na histopatologia muscular de ratos *Wistar* submetidos a um teste de exaustão em natação. Quarenta e oito animais foram aleatoriamente alocados em 6 grupos experimentais (n=8/grupo): G1: dieta padrão (AIN-93M); G2: AIN-93M submetido a teste de exaustão (AIN-93M TE); G3: *whey protein* concentrado adicionado de curcumina (WPC + CCM); G4: WPC+CCM submetido a teste de exaustão; G5: (WPC+CCM TE); curcumina (CCM); e G6: CCM submetido a teste de exaustão (CCM TE). O teste de exaustão (TE) em natação foi realizado após 4 semanas de experimento e, 24 horas após, os animais foram eutanasiados e o tecido muscular coletado. Além disso, foram analisados os níveis de lactato sanguíneo. WPC+CCM e, ou CCM foram capazes de reduzir a resposta inflamatória, por meio da redução de IL-6 e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Além disso, o consumo de WPC+CCM foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica provocada pelo exercício extenuante (WPC+CCM TE vs. WPC+CCM) e o consumo da CCM reduziu as concentrações de proteína carbonilada após o TE em comparação ao grupo AIN-93M TE e WPC+CCM TE. Maiores concentrações de óxido nítrico foram observados nos animais que consumiram o WPC+CCM e CCM. Ainda, o consumo do WPC+CCM e/ou CCM isolada foi capaz de reduzir as áreas de infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo no músculo causadas pelo exercício exaustivo, além de aumentar a área e diâmetro das fibras musculares. A associação do WPC+CCM possibilitou ainda uma menor produção de lactato durante o exercício exaustivo, reduzindo a fadiga e melhorando o desempenho.

Palavras-chave: Exercício físico, natação, cúrcuma, antioxidantes, citocinas inflamatórias.

Introdução

Exercícios físicos extenuantes e de alta intensidade podem induzir danos musculares (CLARKSON; NOSAKA e BRAUN, 1992; GONZÁLEZ-BARTHOLIN et al. 2019) que, conseqüentemente, ocasionam o aparecimento de respostas inflamatórias e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A inflamação e EROs induzidas pelo exercício são indispensáveis para a recuperação tecidual, no entanto, quando exacerbadas e não controladas, podem provocar dano muscular secundário (CLARKSON; NOSAKA e BRAUN, 1992; TANABE et al., 2019).

Por conseguinte, o exercício extenuante e o dano muscular secundário podem levar à redução da força muscular, função neuromuscular prejudicada, fadiga, amplitude de movimento reduzida e dor muscular (HOWATSON e VAN SOMEREN, 2008; HUANG et al., 2015; FARIA et al., 2020). Estes danos musculares podem diminuir a função muscular, afetando o desempenho esportivo (FUSTER-MUNOZ et al., 2016; TANABE et al., 2019). Portanto, estratégias capazes de controlar ou minimizar os danos musculares e atenuar respostas inflamatórias exacerbadas são cada vez mais estudadas.

Nesse sentido, o consumo de produtos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias têm se tornado comum (HOWATSON e VAN SOMEREN 2008; HOWATSON et al. 2010). Entre os compostos nutricionais com capacidade de influenciar positivamente no estresse oxidativo e na inflamação, a curcumina (CCM), principal curcuminoide extraído do rizoma da *Cúrcuma longa L*, tem recebido considerável atenção. Inúmeros estudos têm mostrado que a CCM pode afetar positivamente diferentes condições, devido aos seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, imunológico reguladores, cardioprotetores, antineoplásicos e hepatoprotetores (HEWLINGS e KALMAN, 2017; LIU et al., 2018; LI et al., 2019). Além dos seus benefícios à saúde, o polifenol curcumina também demonstrou capacidade em melhorar o desempenho em exercícios físicos por reduzir a dor e os danos musculares (TANABE et al., 2015; TANABE et al., 2019; NICOL et al., 2015; SAHIN et al., 2016).

As proteínas do soro do leite (*Whey protein* - WP) tornaram-se amplamente consumidas como suplemento nutricional (DAVIES et al., 2018; LI e LIU, 2019). Além da sua eficácia e segurança, essas proteínas apresentam alto valor biológico e eficiência metabólica, otimizando a recuperação em exercícios extenuantes, o desempenho esportivo, a força e hipertrofia muscular (ATHERTON E SMITH, 2012; TEIXEIRA et al., 2016). Estudos sugerem que a utilização do WP pode atenuar o estresse oxidativo e a inflamação induzidos pelo exercício,

além de auxiliar a recuperação após treinamentos de resistência (ATHIRA et al., 2013; KERASIOTI et al., 2013; DAVIES et al., 2018). Os benefícios do WP estão relacionados, principalmente, à sua concentração de peptídeos bioativos (MA et al., 2016).

Estudos anteriores mostraram que a ingestão de CCM pode atenuar o dano muscular induzido pelo exercício excêntrico. Da mesma forma, já estão bem estabelecidos os efeitos benéficos do WP. No entanto, não há na literatura informações a respeito da potencialização dos efeitos benéficos do *whey protein* associado à curcumina, na manutenção da integridade do tecido muscular, melhora do balanço oxidativo e atenuação de respostas inflamatórias no músculo durante a prática de exercício extenuante. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do *whey protein* concentrado (WPC) adicionado de curcumina (CCM) no balanço oxidativo, inflamação e histopatologia do músculo de ratos *Wistar* submetidos a um protocolo agudo de exercício físico exaustivo.

Materiais e Métodos

2.1 Matéria prima

2.1.1 Curcumina

A curcumina utilizada neste estudo foi a Theracurmin[®] altamente absorvível e dispersa com nanopartículas coloidais. A Theracurmin[®] consiste em 30 w/w% de CCM e apresenta 27 vezes mais biodisponibilidade do que a CCM convencional (Theracurmin[®]; Theravalues, Tóquio, Japão).

2.1.2 Desenvolvimento de um concentrado proteico de soro de leite (WPC) por *spray drying*

O leite para a fabricação do concentrado proteico de soro foi obtido do estábulo da Universidade Federal de Viçosa-MG, sendo submetido à microfiltração para obtenção do soro, o qual foi armazenado em embalagens plásticas com tampa, identificadas e armazenadas em *ultrafreezer* (-80 °C) até o momento de sua utilização.

O procedimento de secagem do soro de leite foi conduzido em um secador de pulverização de nível único, modelo único (modelo MSD 1.0), equipado com um bico de pulverização de 1 mm de diâmetro (Labmaq, Brasil). As taxas de ar e de fluxo de produto, bem como a temperatura do ar foram definidas mediante testes iniciais, seguindo a metodologia

proposta por Perrone e colaboradores (2013), em que o ar de entrada e o fluxo de saída do produto é de, 170 ± 2 °C e 1 L h^{-1} .

2.1.3 Concentrado proteico de soro de leite (WPC) adicionado de curcumina

A CCM foi adicionada ao WPC para obtenção de um produto com a concentração de 0,8 g de curcumina em cada 100 g de WPC. Para este cálculo, considerou-se uma ingestão de 3,0 mg/kg/dia de curcumina (valor máximo da IDA para humanos (FAO, 2004)) para um indivíduo de 70 kg e que consome uma suplementação de proteína por meio do WPC de 0,3 g/kg/dia (SCHOENFELD e ARAGON, 2018). Assim, a oferta de proteína nos animais, por meio do WPC, correspondeu a 30% das necessidades estipuladas para ratos em fase de manutenção (REEVES et al., 1993), sendo essa substituição definida de acordo com a que é utilizada em humanos.

2.2 Animais e dietas experimentais

Quarenta e oito ratos machos (adultos jovens) da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, Rodentia), 12 semanas de vida, foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os animais foram randomicamente divididos em seis grupos experimentais com 8 animais cada ($n=8/\text{grupo}$), sendo: grupo controle que recebeu dieta padrão (AIN-93M); grupo controle que recebeu dieta padrão submetido ao teste exaustivo (AIN-93M TE); grupo *whey protein* adicionado de curcumina (WPC+CCM); grupo *whey protein* adicionado de curcumina submetido ao teste exaustivo (WPC+CCM TE); grupo curcumina (CCM) e grupo curcumina submetido ao teste exaustivo (CCM TE). Os animais receberam dieta comercial até completarem doze semanas de idade; a partir de então, as dietas experimentais específicas de cada grupo foram introduzidas e mantidas pelo período de 4 semanas. Os animais receberam água deionizada e suas respectivas dietas experimentais *ad libitum*. As dietas experimentais foram formuladas de acordo com as recomendações AIN-93M, propostas pelo *American Institute of Nutrition* (1993) para manutenção de animais adultos (Tabela 1). As dietas eram normocalóricas, normoproteicas e normolipídicas. Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada ($22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos claro escuro de 12 horas controlados automaticamente.

Os animais dos grupos AIN-93M TE, WPC+CCM TE e CCM TE foram submetidos ao teste exaustivo em natação após 4 semanas de consumo das dietas experimentais. Os animais nadaram até a exaustão, suportando um peso de 4% do peso corporal fixo à cauda (VENDETTI

e DI MEO, 1996). A exaustão foi definida quando o animal permaneceu por 10 segundos sob a superfície da água (DAWSON e HORVATH, 1970). O treinamento foi realizado em um tanque de alvenaria azulejado (largura: 65 cm, comprimento: 75 cm, altura: 85 cm), com altura da água de 45 cm mantida em torno de 28 ± 1 °C.

Ao final do período experimental, e 24 horas após o teste exaustivo, os animais foram anestesiados com Isoflurano (Isoforine, Cristália[®], Itapira, Brazil) e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado por punção cardíaca, os tecidos musculares esqueléticos foram removidos e pesados. Os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até o momento das análises.

Todos os procedimentos experimentais com os animais foram realizados de acordo com a Diretriz 86/609/EEC de 24 de Novembro 24 de 1986, em acordo com os princípios éticos de experimentação animal. O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), sob o número de protocolo 72/2018.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais

Ingredientes	g/kg de dieta		
	AIN-93M	WPC+CCM	CCM
Amido de Milho	455,7	455,7	455,7
Albumina*	150,0	105,0	150,0
Maltodextrina	155,0	155,0	155,0
Sacarose	100,0	99,0	99,0
Óleo de Soja	40,0	40,0	40,0
Celulose	50,0	50,0	50,0
Mistura de Minerais	35,0	35,0	35,0
Mistura de Vitaminas	10,0	10,0	10,0
L-cistina	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
WPC**	-	44,0	-
Theracurmin®	-	1,2	1,2

Fonte: Reeves et al., 1993; AIN-93M: dieta padrão para roedores em fase de manutenção; WPC: *whey protein* concentrado; CCM: curcumina. *Considerou-se a albumina com teor de 80% de proteína. ** Considerou-se o WPC com teor de 82,4% de proteína.

2.3 Estresse oxidativo – Avaliação do perfil antioxidante

2.3.1 Preparação do homogeneizado

Fragmentos do tecido muscular (gastrocnêmio) foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer a -80 ° C. As amostras foram homogeneizadas com tampão fosfato e centrifugadas a 4°C. O sobrenadante foi armazenado para as análises de malondialdeído (MDA), óxido nítrico (ON), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutationa-S-transferase (GST) e proteínas totais. O pellet formado foi utilizado para quantificação proteína carbonilada (PCN). Os dados foram normalizados de acordo com os níveis de proteína total no sobrenadante.

2.3.2 Malondialdeído (MDA)

Após centrifugação do homogenato, foi acrescentada a solução que contém ácido tricloroacético (Sigma Aldrich®, Brasil) e tiobarbitúrico (Merck®, Alemanha) (solução de TBARS) ao sobrenadante resultante. A reação foi mantida em banho-maria. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para leitura em espectrofotômetro (Thermo

Scientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia) a 540 nm. A concentração de MDA foi determinada utilizando a curva padrão de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMPO) (WALLIN et al., 1993).

2.3.3 Óxido nítrico (ON)

A produção de ON foi estimada pela produção de NO₂/NO₃ pela reação padrão de Griess (TSIKAS, 2007). Foram incubados 50 µL homogeneizado obtido na etapa 2.3.1 e 100 µL de solução AB (1% sulfanilamida, 0,1% N-(1-Naftil) etilenodiamina e 2,5% H₃PO₄) à temperatura ambiente, por 10 minutos. A conversão da absorbância em concentrações micromolares de NO foi obtida a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (0–125 µM) e expressa em concentrações de NO (µM/L). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Cientific) a 570 nm.

2.3.4 Atividade da enzima catalase (CAT)

Para determinar a atividade da catalase (CAT), foram adicionados o sobrenadante do homogeneizado (diluído na proporção 1:10, em água), tampão fosfato (pH 7,0) + H₂O₂ (cada 25 mL de tampão 40 µL de H₂O₂ 30%). As absorbâncias foram determinadas nos tempos 0, 30 e 60 segundos a 240 nm em espectrofotômetro (ThermoScientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia) (AEBI, 1984). A concentração da enzima foi expressa em U de catalase/mg de proteína da amostra.

2.3.5 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada a partir de sua habilidade de eliminar o radical livre superóxido e, conseqüentemente, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (Sigma Aldrich[®], Japão) (DIETERICH et al., 2000). As amostras, padrão e branco foram incubados a 37°C durante 5 minutos e a leitura executada em espectrofotômetro (ThermoScientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia) a 570 nm.

2.3.6 Atividade da glutatona (GST)

A atividade da glutatona-S-transferase (GST) foi determinada segundo Habig et al. (2002). Assim, após centrifugação do homogeneizado, foi acrescentado o CDNB (Sigma Aldrich[®], EUA) e a glutatona reduzida (GSH) (Sigma Aldrich[®], EUA). As absorbâncias foram determinadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 segundos a 340 nm em espectrofotômetro (ThermoScientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia) (HABIG e JAKOBY, 1981).

2.3.7 Proteína carbonilada (PCN)

A concentração de proteína carbonilada foi medida utilizando o procedimento 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com base nos grupos carbonil que reagem com DNPH (LEVINE et al., 1990).

2.4 Expressão gênica

2.4.1 Extração do RNA

O RNA total das amostras de músculo gastrocnêmio foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA). Em microtubos de 2 mL, foi adicionado 1 mL de Trizol para cada 50-100 g de amostra. Em seguida, a mesma foi macerada com homogeneizador de tecidos e foram adicionados 200 µL de clorofórmio. O conteúdo foi agitado manualmente por 3 minutos. Após centrifugação (15.000 x g/10 min), a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 2 mL, no qual foi adicionado 1 mL de isopropanol, e armazenada a -80°C por 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 500 µL de etanol 75% no precipitado. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, as amostras foram ressuspensas em 30 µL de água ultrapura.

Após essa etapa, as amostras foram tratadas com RQ1 DNase (Promega, Madison, EUA) utilizando 1,5 U de enzima por reação. As reações foram incubadas a 37 °C por 30 minutos, e após o período de incubação a enzima foi inativada pela incubação a 70 °C por 10 minutos.

2.4.2 PCR quantitativo (qPCR)

O qPCR foi realizado utilizando o kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, EUA). Para cada reação, foram utilizados 10 µL de Master Mix (2X), 0,4 µL de enzima GoScript™ RT Mix (50X) e 0,4 µL de cada primer (*forward* e *reverse*). Foi padronizada a concentração de 600 ng/mL de RNA e a água foi adicionada para completar o volume final de 20 µL. As sequências dos *primers* que foram utilizados estão descritas na Tabela 2.

A amplificação e detecção foram realizadas com o sistema Eco™ Real-Time PCR (Illumina, CA, EUA), com as seguintes condições de reação qPCR: transcrição reversa a 48 °C

por 15 minutos, desnaturação a 95 °C por 10 segundos, anelamento e extensão a 60 °C por 30 segundos.

Para cálculo do aumento da expressão do gene foi utilizado o método $2^{-\Delta Ct}$.

Tabela 2. Sequências de primers para análise de qPCR

Genes	Oligonucleotídeos (5' – 3')	
	Forward	Reverse
GAPDH	CCCCCAATGTATCCGTTGTG	TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT
IL-6	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC
IL-10	TTGAACCACCCGGCATCTAC	CCAAGGAGTTGTTCCCGTTA
TNF-α	TGGGCTACGGGCTTGTCCTC	GGGGGCCACCACGCTCTT

2.5 Análises histopatológicas

Fragmentos do músculo (bíceps) de todos os animais foram removidos e fixados em formaldeído em temperatura ambiente. Após fixação, os tecidos foram desidratados em gradiente crescente de etanol (70 % até absoluto), e incluídos em resina contendo endurecedor (Leica, Historesin[®]). Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com 3 μ m de espessura em micrótomo automático Leica[®] utilizando navalha de vidro. Em seguida foram submetidos à coloração pela técnica com hematoxilina e eosina (H&E), montadas com Entellan (Merck[®]) e analisadas em microscópio de luz (LEICA DM750).

As imagens das secções histológicas foram capturadas com a objetiva de 20X por meio da câmera digital LEICA MC170 HD. A partir de 10 fotos por animal, foram quantificadas as áreas contendo fibra muscular, tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório no músculo utilizando o aplicativo ImagePro-Plus[®] versão 4.5 (Media Cybernetics) por meio da contagem manual de pontos sobre o tecido (SABARENSE et al., 2012).

2.6 Análise de lactato sanguíneo durante o teste de exaustão

Amostras de sangue foram coletadas em dois momentos: antes (repouso) e após o final do teste de exaustão em natação (momento final) (adaptado de GOBATTO et al., 2001). As amostras sanguíneas foram coletadas da extremidade da cauda do animal. Para evitar diluição com a água, os animais foram rapidamente secos com uma toalha antes da coleta sanguínea. A concentração de lactato foi determinada utilizando o analisador automático de lactato sanguíneo Accutrend Check (Accusport - Roche).

2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média \pm DP). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças entre o mesmo grupo (sedentário x TE) foram testadas pelo teste T. Diferenças intra grupos (AIN-93M, WPC + CCM e CCM) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de médias de Newman-Keuls a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas e construção dos gráficos foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 8 para *Windows* (GraphPad Prism Inc, EUA).

Resultados

Balanco oxidativo

A atividade de SOD não diferiu entre os grupos AIN-93M, WPC+CCM e CCM, independente da realização ou não do TE (Figura 1-A). Entre os animais não submetidos ao TE, a atividade da CAT foi maior no grupo AIN-93M, quando comparados aos animais que consumiram CCM ($p < 0,05$). Por outro lado, a atividade da CAT não foi alterada nos animais dos grupos submetidos ao TE. Os animais do grupo WPC+CCM TE, bem como os animais do grupo CCM TE, apresentaram maior atividade de CAT, em relação aos animais do grupo WPC+CCM e CCM, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 1-B). A atividade da glutathiona, por sua vez, também não diferiu entre os grupos, independente da realização ou não do TE. No entanto, os animais do grupo CCM TE apresentaram maior atividade da GST, quando comparados aos animais do grupo CCM não submetidos ao TE ($p < 0,05$) (Figura 1-C).

As concentrações de MDA não foram diferentes entre os grupos AIN-93M, WPC+CCM e CCM, independente da realização ou não do TE. Entretanto, os animais do grupo WPC+CCM TE apresentaram menores concentrações de MDA, quando comparados aos animais do grupo WPC+CCM ($p < 0,05$) não submetidos ao TE (Figura 1-D). Entre os animais dos grupos AIN-93M, WPC+CCM e CCM não submetidos ao TE, as concentrações de PCN foram similares. No entanto, os animais do grupo CCM TE apresentaram menores concentrações de PCN ($p < 0,05$), quando comparados aos animais do grupo AIN-93M TE e do grupo WPC+CCM TE (Figura 1-E).

Entre os animais não submetidos ao TE, os níveis de ON foram maiores no grupo CCM quando comparado aos grupos AIN-93M e WPC+CCM ($p < 0,05$). Ainda, entre os animais não submetidos ao TE, o grupo WPC+CCM apresentou maior quantidade de ON, quando comparado ao grupo AIN-93M ($p < 0,05$). Em relação aos animais submetidos ao TE, os animais

do grupo CCM TE, bem como os animais do grupo WPC+CCM TE apresentaram maiores níveis de ON, quando comparados aos animais do grupo AIN-93M TE ($p < 0,05$) (Figura 1-F).

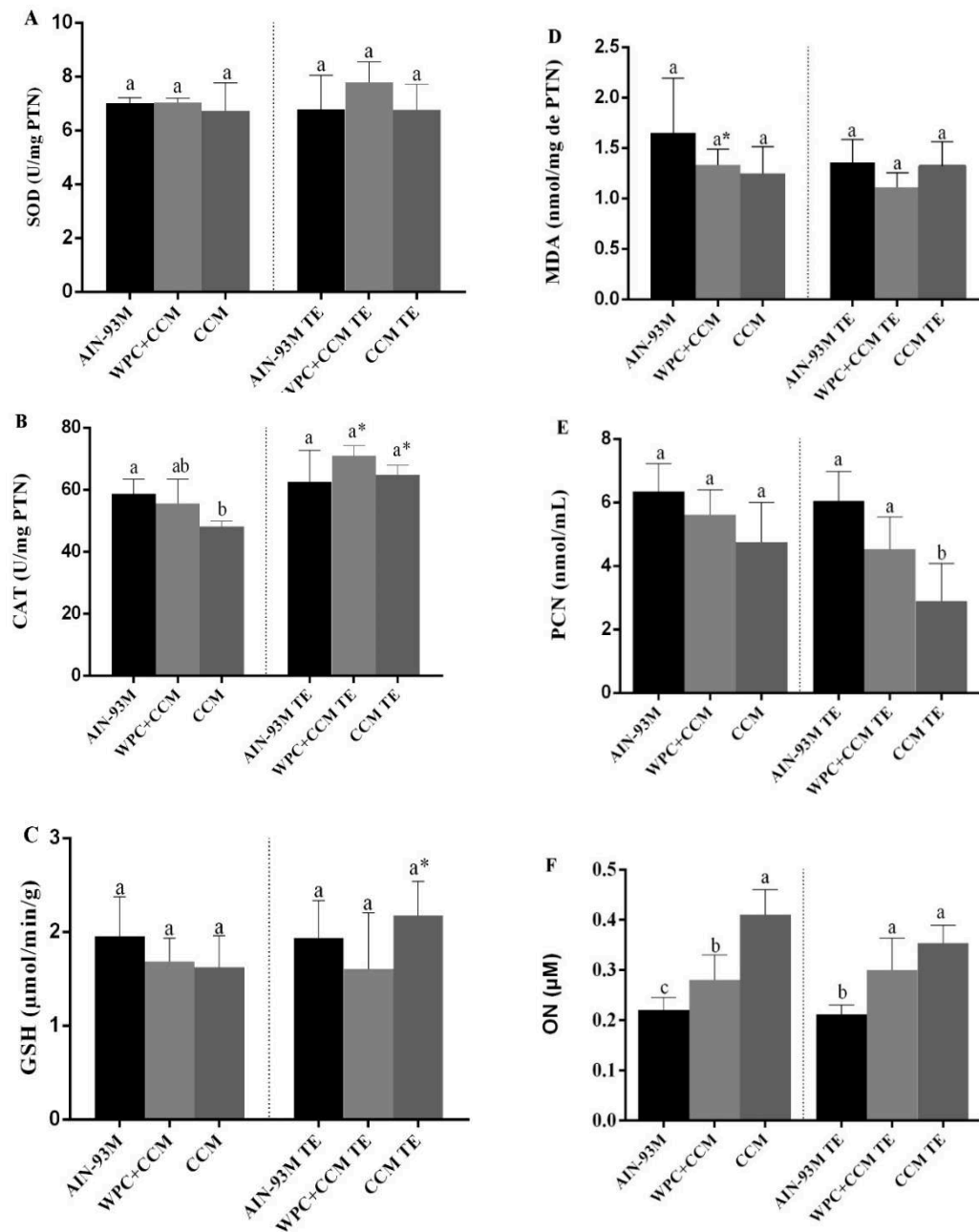


Figura 1. Análises do balanço oxidativo no músculo. AIN-93M TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu dieta padrão; WPC+CCM: grupo sedentário que recebeu *whey protein* concentrado adicionado de curcumina; WPC+CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu *whey protein* concentrado adicionado de curcumina; CCM: grupo sedentário que recebeu curcumina; CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu curcumina; TE: teste de exaustão. Os gráficos mostram (A) Superóxido dismutase, (B) Catalase, (C) Glutationa S-transferase, (D) Malondialdeído, (E) Proteína Carbonilada, (F) Óxido nítrico. * indica diferenças significativas entre o mesmo grupo (sedentário x TE), de acordo com o teste t ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes (a – c) indicam diferenças intra grupos, de acordo com a ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Expressão gênica de TNF- α , IL-6 e IL-10

Os níveis de expressão de TNF- α permaneceram similares entre os grupos (Figura 2-A). A expressão gênica da citocina pró-inflamatória IL-6 foi maior no grupo controle submetido ao teste de exaustão (AIN-93M TE) quando comparada aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 2-B). A expressão gênica da citocina anti-inflamatória IL-10 foi maior nos grupos que receberam WPC+CCM e CCM, independente da realização ou não do TE, quando comparada ao grupo AIN-93M TE ($p < 0,05$) (Figura 2-C).

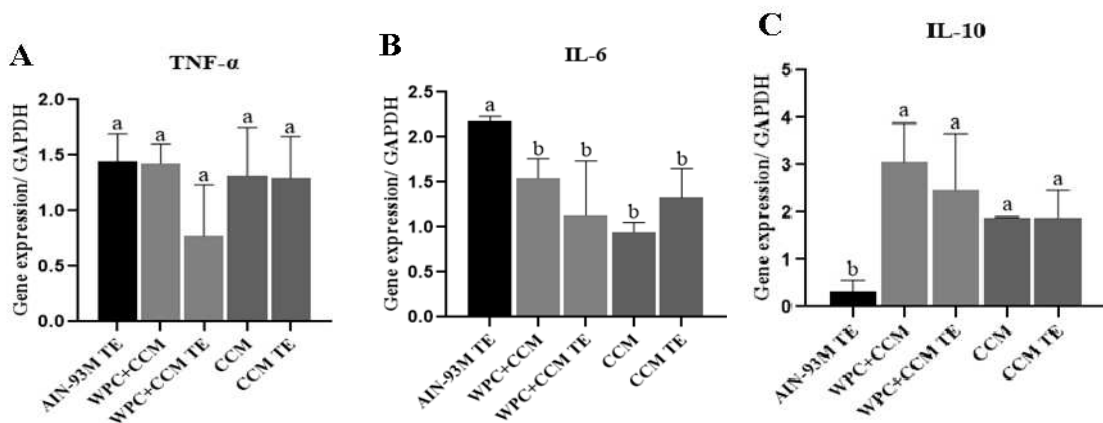


Figura 2. Expressão gênica de TNF- α , IL-6 e IL-10 no músculo. AIN-93M: grupo sedentário que recebeu dieta padrão; AIN-93M TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu dieta padrão; WPC+CCM: grupo sedentário que recebeu *whhey protein* concentrado adicionado de curcumina; WPC+CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu *whhey protein* concentrado adicionado de curcumina; CCM: grupo sedentário que recebeu curcumina; CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu curcumina; TE: teste de exaustão. Os gráficos mostram (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-10. Letras minúsculas diferentes (a – b) indicam diferenças significativas intra grupos, de acordo com a ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Histopatologia

Entre os animais não submetidos ao TE, foram observadas maiores áreas de inflamação nos animais do grupo AIN-93M ($p < 0,05$), quando comparados aos animais dos grupos WPC+CCM e CCM (Figura 3-A). O mesmo foi observado entre os grupos submetidos ao TE, sendo que os animais do grupo WPC+CCM TE e CCM TE apresentaram menores áreas de inflamação, quando comparados aos animais do grupo AIN-93M TE ($p < 0,05$) (Tabela 3).

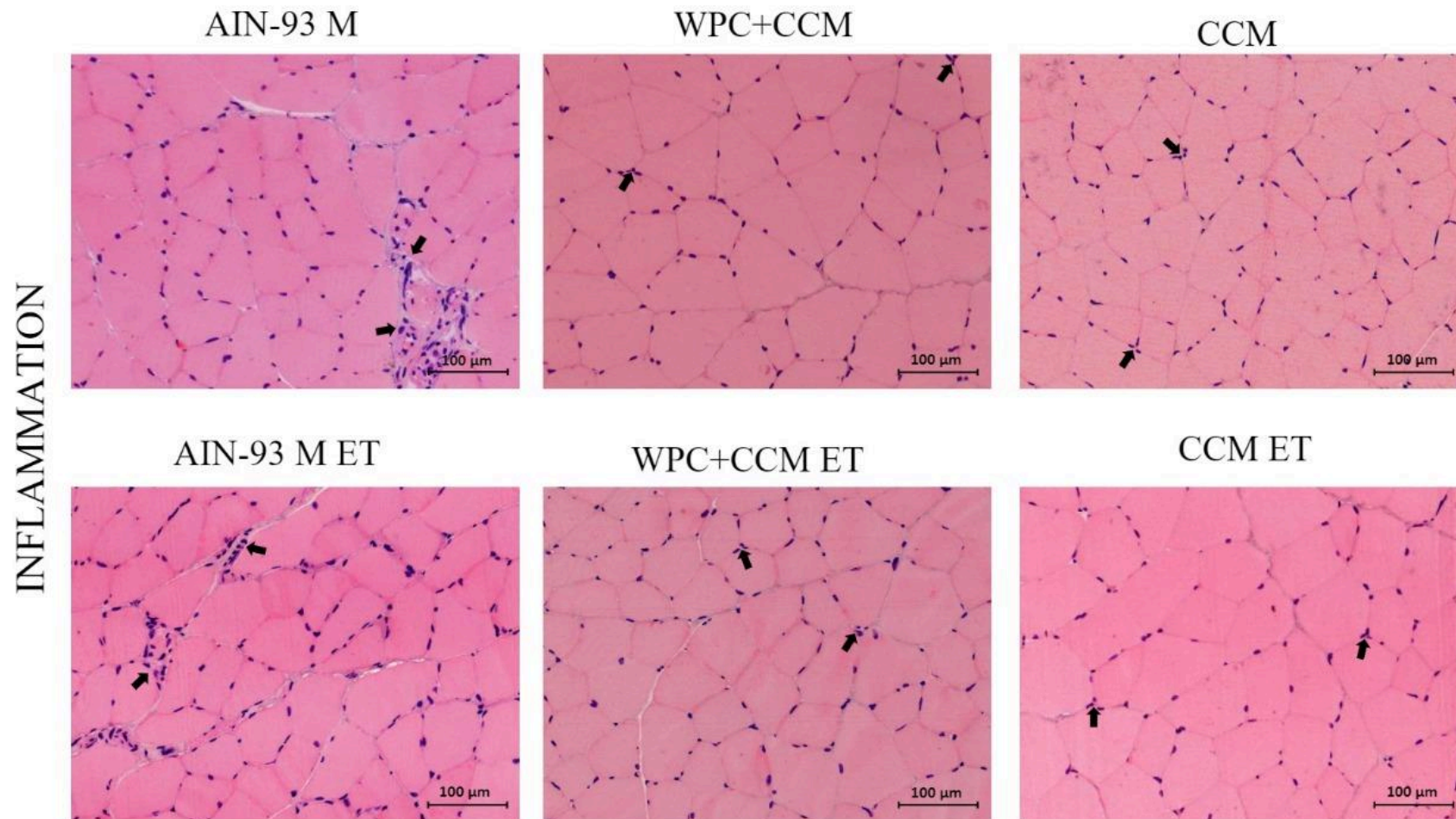
Foi possível observar, entre os animais não submetidos ao TE, maior quantidade de fibra muscular nos grupos WPC+CCM e CCM, quando comparados ao grupo AIN-93M ($p < 0,05$). Entre os animais submetidos ao TE, os animais dos grupos WPC+CCM e CCM apresentaram maior quantidade de fibra muscular por área avaliada, quando comparados aos animais do grupo

AIN-93M ($p < 0,05$) (Figura 3-B). A presença de tecido conjuntivo, por sua vez, entre os animais não submetidos ao TE, foi maior no grupo AIN-93M, quando comparado aos grupos WPC+CCM e CCM ($p < 0,05$). O mesmo foi observado entre os animais submetidos ao teste exaustivo, com maior presença de tecido conjuntivo nos tecidos musculares dos animais do grupo AIN-93M TE, quando comparados aos animais dos grupos WPC+CCM TE e CCM TE ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Histopatologia do músculo de ratos sedentários que foram ou não submetidos a teste exaustivo em natação

Grupos	Inflamação (%)	Ponto sobre fibra muscular	Ponto sobre tecido conjuntivo
AIN-93M	3,69 ± 0,53 ^a	243,38 ± 5,92 ^b	43,01 ± 5,88 ^a
WPC + CCM	2,03 ± 0,45 ^b	254,00 ± 5,72 ^a	33,70 ± 5,52 ^b
CCM	1,92 ± 0,28 ^b	258,60 ± 4,59 ^a	24,60 ± 1,93 ^c
AIN-93M TE	3,59 ± 0,29 ^a	236,80 ± 4,43 ^b	39,31 ± 3,23 ^a
WPC + CCM TE	2,02 ± 0,29 ^b	259,15 ± 5,08 ^a	26,65 ± 4,88 ^b
CCM TE	1,73 ± 0,49 ^b	258,06 ± 4,88 ^a	26,46 ± 2,55 ^b

AIN-93M: grupo sedentário que recebeu dieta padrão; AIN-93M TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu dieta padrão; WPC+CCM: grupo sedentário que recebeu *whey protein* concentrado adicionado de curcumina; WPC+CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu *whey protein* concentrado adicionado de curcumina; CCM: grupo sedentário que recebeu curcumina; CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu curcumina; TE: teste de exaustão. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si para uma mesma condição (sedentário e TE). * indica diferenças significativas entre o mesmo grupo (sedentário x TE), de acordo com o teste t ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes (a – c) indicam diferenças intra grupos, de acordo com a ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. Dados expressos como média ± desvio padrão.



Figura

3-A. Seção transversal do músculo de ratos sedentários que foram ou não submetidos ao teste exaustivo. AIN-93M: grupo sedentário que recebeu dieta padrão para roedores em fase de manutenção; AIN-93M TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu dieta padrão para roedores em fase de manutenção; WPC+CCM: grupo sedentário que recebeu *whey protein* concentrado adicionado de curcumina; WPC+CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu *whey protein* concentrado adicionado de curcumina; CCM: grupo sedentário que recebeu curcumina; CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu curcumina. Infiltrado inflamatório (→).

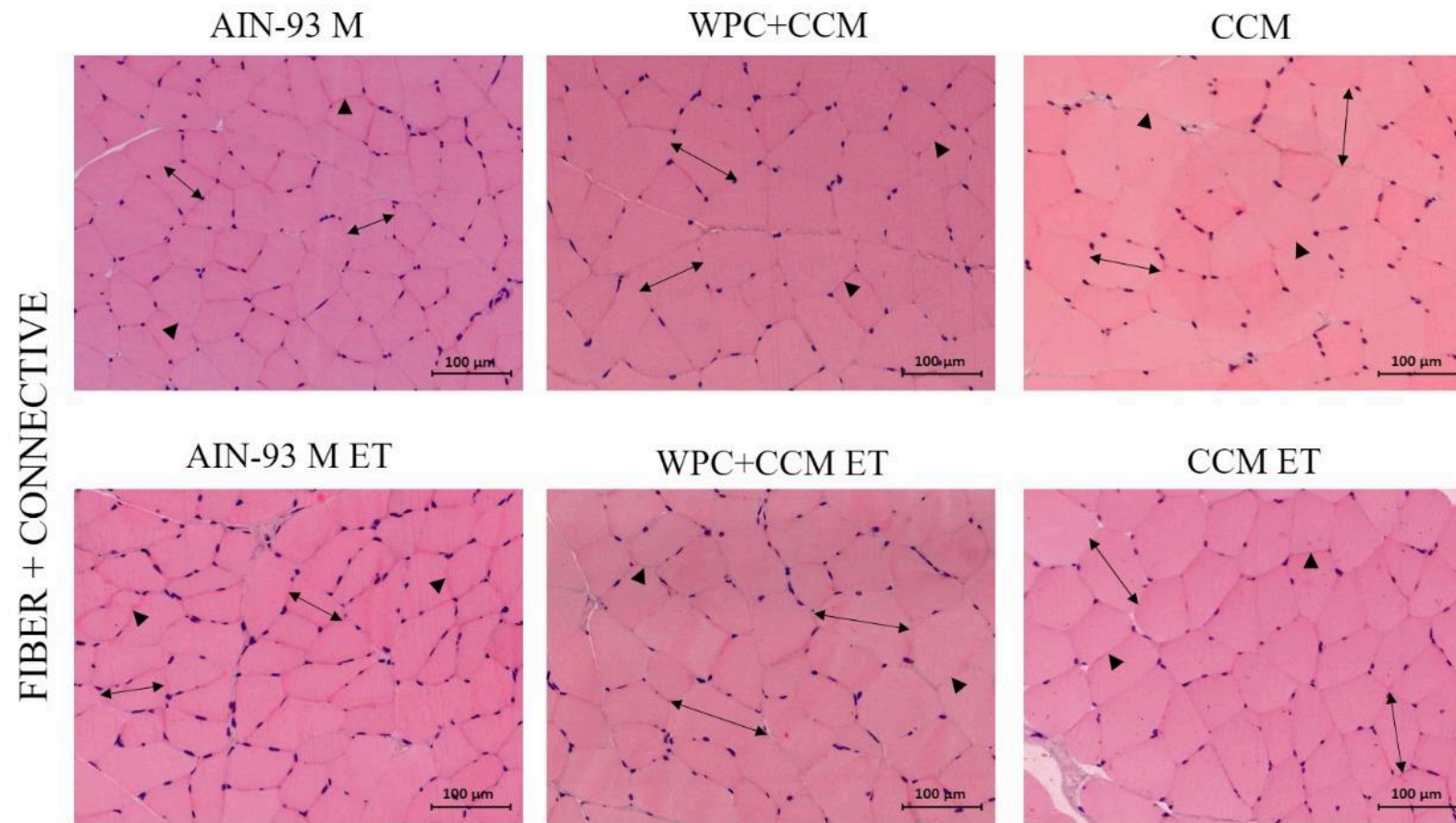


Figura 3-B. Seção transversal do músculo de ratos sedentários evidenciando as fibras musculares e o tecido conjuntivo que foram ou não submetidos ao teste exaustivo. AIN-93M: grupo sedentário que recebeu dieta padrão para roedores em fase de manutenção; AIN-93M TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu dieta padrão para roedores em fase de manutenção; WPC+CCM: grupo sedentário que recebeu *whey protein* concentrado adicionado de curcumina; WPC+CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu *whey protein* concentrado adicionado de curcumina; CCM: grupo sedentário que recebeu curcumina; CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu curcumina. Fibra muscular (↔); Tecido conjuntivo (▴).

Entre os animais não submetidos ao TE, as medidas de área permaneceram similares. Também não foram observadas diferenças entre o mesmo grupo (sedentário vs. TE). Entre os animais submetidos ao TE, os animais dos grupos WPC+CCM TE e CCM TE apresentaram maior área de fibra muscular, quando comparados aos animais do grupo AIN-93M TE ($p < 0,05$) (Figura 4-A).

Em relação ao diâmetro das fibras musculares, foi possível observar maior diâmetro entre os animais do grupo WPC+CCM TE, quando comparados aos do grupo AIN-93M TE ($p < 0,05$) (Figura 4-B). Entre os animais do grupo CCM TE, o diâmetro das fibras musculares permaneceu similar aos do grupo WPC+CCM TE e AIN-93M TE. Ainda, quando comparados os diâmetros entre o mesmo grupo (sedentário x TE), os animais dos grupos WPC+CCM TE e CCM TE apresentaram maior diâmetro de fibra muscular quando comparados aos grupos WPC+CCM e CCM não submetidos ao TE, respectivamente (Figura 4-B). Entre os animais do grupo AIN-93M (sedentário x TE), não foram observadas diferenças.

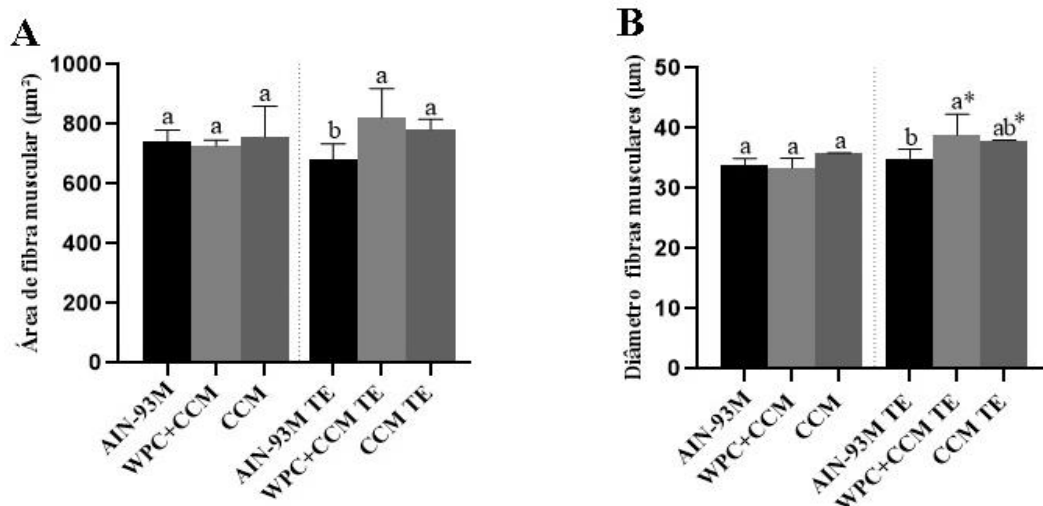


Figura 4. Análise histopatológica do tecido muscular. AIN-93M: grupo sedentário que recebeu dieta padrão; AIN-93M TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu dieta padrão; WPC+CCM: grupo sedentário que recebeu *whey protein* concentrado adicionado de curcumina; WPC+CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu *whey protein* concentrado adicionado de curcumina; CCM: grupo sedentário que recebeu curcumina; CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu curcumina; TE: teste de exaustão. Os gráficos mostram (A) Área das fibras musculares (μm^2), (B) Diâmetro das fibras musculares (μm). * indica diferenças entre o mesmo grupo (sedentário x TE), de acordo com o teste t ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes (a – b) indicam diferenças intra grupos, de acordo com a ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Análise de lactato sanguíneo

Os níveis de lactato em repouso não diferiram entre os grupos. No entanto, após a realização do TE, os animais do grupo WPC+CCM apresentaram menores níveis de lactato, quando comparados aos animais do grupo AIN-93M ($p < 0,05$). Além disso, por meio de comparações entre grupos, foi possível observar que os níveis de lactato após o término do TE foram mais elevados no grupo AIN-93M após a realização do TE, quando comparados ao mesmo grupo antes da realização do TE ($p < 0,05$). Nos grupos WPC+CCM e CCM, os valores de lactato antes e após a realização do TE permaneceram similares (Figura 5).

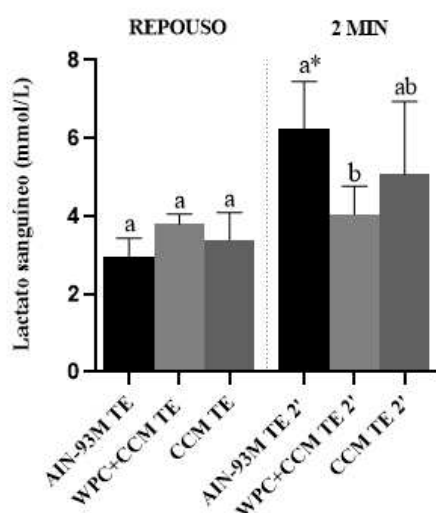


Figura 5. Níveis de lactato sanguíneo coletado em repouso e 2 minutos após a realização do teste exaustivo em natação. AIN-93M: grupo sedentário que recebeu dieta padrão; AIN-93M TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu dieta padrão; WPC+CCM: grupo sedentário que recebeu *whey protein* concentrado adicionado de curcumina; WPC+CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu *whey protein* concentrado adicionado de curcumina; CCM: grupo sedentário que recebeu curcumina; CCM TE: grupo submetido ao teste de exaustão que recebeu curcumina; TE: teste de exaustão. * indica diferenças entre o mesmo grupo (antes x após o TE), de acordo com o teste t ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes (a – b) indicam diferenças intra grupos, de acordo com a ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Discussão

O exercício físico agudo e de alta intensidade está associado ao aumento de estresse tecidual em especial da inflamação, estresse oxidativo e, conseqüentemente, modificações na morfologia muscular. Neste contexto, a curcumina, bem como as proteínas do soro do leite, têm se mostrado seguras para o consumo e exercem efeitos antioxidante e anti-inflamatório. Utilizamos um modelo animal de ratos *Wistar* submetidos a um teste de exaustão em natação para avaliar as possíveis alterações teciduais que podem ocorrer devido à realização de um exercício físico agudo e desacostumado. No geral, nossos resultados mostraram que o consumo

do concentrado proteico de soro de leite associado à curcumina apresentou efeitos positivos em relação ao balanço oxidativo, bem como o desenvolvimento de inflamações no tecido muscular com consequente alteração na morfologia muscular. Neste sentido, podemos destacar redução de marcadores oxidativos, bem como aumento de enzimas antioxidantes e redução da inflamação e do de lactato sanguíneo após realização do teste exaustivo.

O tecido muscular esquelético normalmente se mostra um ambiente pró-oxidante, em especial na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a contração. O dano muscular resultante do exercício não habitual e de alta intensidade relaciona-se à produção de radicais livres e consequentemente de EROs associado a inflamação (CAMPBELL, CARLINI, FLEENOR, 2021), que podem levar a lesões celulares, como desorganização da membrana, oxidação de proteínas e alterar funções celulares processo denominado estresse oxidativo (GONÇALVES, COSTA, GRZESKWIAK, 2021). O estresse oxidativo aumentado associado a uma incapacidade do sistema antioxidante endógeno em remover o excesso de radicais livres prejudica a recuperação e diminui o desempenho no exercício físico (RADAK e TAYLOR, 2019; CAMPBELL, CARLINI, FLEENOR 2021).

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ou malondialdeído (MDA) e os níveis de proteína carbonilada constituem produtos da oxidação de biomoléculas e são biomarcadores comumente usados e indicativos de estresse oxidativo. Por sua vez, enzimas como CAT, SOD e GST são utilizadas como parâmetros para refletir o estado antioxidante (HENDRIX et al., 2020). No nosso estudo, observamos que as concentrações de SOD permaneceram similares entre os grupos, possivelmente porque não houve uma produção de radicais livres suficientes para ativar o sistema de enzimas antioxidantes além do que a célula já expressa normalmente. Por outro lado, observamos aumento da atividade da enzima catalase quando comparamos os grupos WPC+CCM TE e CCM TE aos grupos WPC+CCM e CCM ($p < 0,05$), respectivamente, demonstrando que tanto o concentrado proteico de soro de leite adicionado de curcumina, quanto a exposição à curcumina de forma isolada, proporcionaram aumento da atividade antioxidante devido ao maior recrutamento pela realização do teste exaustivo. O mesmo foi observado para as concentrações da enzima antioxidante GST quando comparamos o grupo CCM TE ao grupo CCM ($p < 0,05$). Nossos resultados mostram que WPC e CCM apresentam significativa capacidade antioxidante para o tecido muscular e consequentemente atividade protetora para o tecido. No entanto, surpreendentemente, as concentrações de CAT entre os animais não submetidos ao TE foram menores no grupo CCM, provavelmente devido à menor formação de H_2O_2 . Vale ressaltar que nossos dados se baseiam

na análise da atividade das enzimas e não na expressão gênica dos mesmos, por isto, acreditamos que estudos futuros são necessários para continuar as investigações e esclarecer possíveis mecanismos de ação com conseqüentes alterações teciduais com a realização de análises de expressão gênica dessas enzimas, por exemplo.

O consumo do concentrado proteico de soro de leite adicionado de curcumina foi associado à melhora da atividade antioxidante da enzima CAT e aumento da concentração de SOD, no fígado de ratos *Wistar* submetidos ao teste exaustivo. Além disso, apresentou redução de produtos da oxidação, como proteína carbonilada e óxido nítrico (DA CONCEIÇÃO et al., 2021). O organismo mantém a concentração de EROs dentro dos limites fisiológicos por meio do mecanismo antioxidante enzimático, formado pelas enzimas SOD, CAT e GST (DA CONCEIÇÃO et al., 2021). Outra forma de defesa do organismo ocorre pelo mecanismo não enzimático, proveniente dos antioxidantes exógenos (RIBEIRO et al., 2005). Assim, sugere-se que o consumo do WPC+CCM e da CCM tenha representado uma importante fonte de antioxidantes exógenos.

Em relação aos produtos de oxidação, observamos menores níveis de MDA no músculo no grupo WPC+CCM TE ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo WPC+CCM, indicando que a administração do concentrado proteico adicionado de curcumina possibilitou redução da peroxidação lipídica induzida por radicais livres e ERO's como H_2O_2 e provocada pela realização do teste exaustivo em natação. Similarmente, um estudo com ratos machos submetidos a um treinamento de exercício de resistência para induzir danos musculares também demonstrou os efeitos modulatórios positivos da curcumina, com atenuação nas concentrações de MDA (SAHIN et al. 2016). Além disso, em nosso estudo, os animais do grupo CCM TE apresentaram menores concentrações de proteína carbonilada (PCN), quando comparados aos animais do grupo controle (AIN-93M TE) e quando comparados aos animais do grupo WPC+CCM TE, demonstrando que a CCM, devido às suas propriedades antioxidantes, foi capaz de reduzir a oxidação das proteínas, possivelmente reduzindo a formação de proteínas maldobradas no tecido, uma vez que já é conhecido que a oxidação proteica é um dos principais responsáveis pelo mal dobramento de proteínas dentro do retículo endoplasmático rugoso e conseqüentemente pelo mal funcionamento das mesmas. O estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (DA CONCEIÇÃO et al., 2021) constatou que o consumo da CCM foi responsável por reduzir as concentrações de MDA e que a exposição à CCM, bem como ao WPC+CCM, foi capaz de reduzir as concentrações de PCN no fígado, em relação ao grupo controle, independente da realização ou não do TE. Nossos achados corroboram em partes com o estudo

anterior. As diferenças encontradas possivelmente podem ser relacionadas ao tecido investigado, uma vez que o fígado é o principal órgão do metabolismo e, portanto, as alterações principais são encontradas nele. No entanto, o presente estudo traz achados importantes no tecido muscular e que, certamente, contribuirão no direcionamento de estudos futuros nesta área.

Em condições de estresse oxidativo, níveis elevados de íon superóxido reagem com o óxido nítrico (ON), formando uma espécie reativa de nitrogênio (ERN), produzindo, consequentemente, o peroxinitrito (HALLIWELL et al., 2015). Por outro lado, mesmo uma molécula facilmente oxidada na presença de O₂ (oxigênio molecular), o ON é essencial para o funcionamento endotelial, já que possui função vasodilatadora e, por isso, é considerado uma molécula cardioprotetora, além de estar relacionado à defesa imunológica, neurotransmissão, sinalização intracelular, além diminuição das inflamações agudas e crônicas (MENON e SUDHEER, 2007; HALLIWELL et al., 2015). Em nosso estudo, observamos maiores níveis de óxido nítrico nos animais que receberam o WPC+CCM e também nos animais do grupo CCM, quando comparados aos animais do grupo controle (AIN-93M). O mesmo foi observado entre os animais submetidos ao TE. Os grupos WPC+CCM TE e CCM TE apresentaram maiores níveis de óxido nítrico, corroborando com estudos anteriores que relatam possíveis benefícios cardioprotetores da curcumina devido ao seu papel antioxidante (HERNANDEZ; WICS; CORRAL, 2016; YU et al., 2016; XU et al., 2018). Já é conhecido que o ON suprime a instalação de um processo inflamatório pela diminuição da ativação linfocitária e pela diminuição da adesão leucocitária, impedindo o rolamento e a migração das células e, consequentemente, inibindo a instalação de um processo inflamatório tecidual (ROBBINS; GRISHAM, 1997; GARCIA; SESSA, 2019). Estes relatos corroboram nossos achados, uma vez que os tratamentos com WPC+CCM e CCM apresentaram aumento nos níveis de NO e também diminuição de focos de infiltrado inflamatório no tecido.

Após exercícios excêntricos e/ou prolongados, o dano muscular estimula a resposta inflamatória por meio do recrutamento de células do sistema imune, como neutrófilos (CAMPBELL, CARLINI, FLEENOR 2021), que enviam sinais para a migração de macrófagos que, por sua vez, medeiam a expressão de citocinas, fatores de crescimento, EROs e ERNs diretamente envolvidas na progressão da inflamação (GONÇALVES, COSTA, GRZESKWIAK, 2021). Dessa forma, o exercício pode promover aumento de citocinas inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), interleucina (IL)-1 β e fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), por meio do fator nuclear kappa beta (NF- κ B) e vias da ciclooxigenase (COX)-2

(CAMPBELL, CARLINI, FLEENOR, 2021). Para evitar danos persistentes aos tecidos devido à ação contínua de radicais livres e EROs, é necessário que o processo inflamatório seja controlado (GONÇALVES, COSTA, GRZESKWIAK, 2021). Nossos resultados mostraram que o WPC e a CCM representam uma terapia promissora no controle da inflamação após o exercício exaustivo, pois o consumo do WPC+CCM ou da CCM isolada reduziu os níveis de IL-6 e aumentou os níveis de IL-10, quando comparados ao controle AIN-93M TE, refletindo diretamente em uma atenuação da resposta inflamatória provocada pelo exercício e uma recuperação muscular melhorada.

O aumento de IL-6 no músculo esquelético está relacionado à incidência de lesão muscular induzida por exercícios extenuantes e/ou de alta intensidade. Além disso, a duração da atividade física também pode afetar as concentrações de IL-6 (PRESTES et al., 2006). A razão pela qual observamos menor concentração de IL-6 nos grupos que consumiram o WPC+CCM ou a CCM isolada está provavelmente relacionada às altas concentrações de peptídeos bioativos do WPC e às concentrações de CCM no sangue, que foram mantidas durante e após o exercício exaustivo. Estudos anteriores também relataram que a resposta inflamatória é suprimida quando a curcumina é ingerida por vários dias antes do exercício (DROBNIC et al., 2014; TANABE et al., 2019b). Além disso, corroborando com nossos resultados, Davis et al. (2007) mostraram que a curcumina foi capaz de reduzir as concentrações de IL-6 e TNF- α após um exercício excêntrico controlando a inflamação e protegendo o tecido. Observamos, em nosso estudo, aumento nos níveis de expressão de IL-10 no músculo dos animais submetidos ao teste exaustivo em natação, que receberam o WPC+CCM ou a CCM isolada. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que atua suprimindo a ativação das células imunes após o surgimento de uma resposta inflamatória inicial (MOSSER; ZHANG, 2008). Além disso, inibe a produção de TNF- α e promove a produção de mediadores imunes anti-inflamatórios, como receptores solúveis de TNF- α (LIU et al., 2017). O aumento da concentração de IL-10 pode acelerar o processo de recuperação inflamatória (FARIA et al., 2020). Tem sido demonstrado que a curcumina tem a capacidade de induzir a expressão e liberação de IL-10 (MOLLAZADEH et al. 2017), o que explica em parte seus efeitos anti-inflamatórios. Em nosso estudo anterior (DA CONCEIÇÃO et al., 2021) também observamos aumento das concentrações de IL-10 no fígado de ratos *Wistar* que receberam WPC+CCM ou CCM isolada.

O papel anti-inflamatório do WPC está relacionado a sua concentração de peptídeos bioativos, presentes nas proteínas de soro de leite, que podem ser gerados por hidrólise

enzimática, fermentação microbiana ou por meio da digestão gastrointestinal das proteínas alimentares (MA et al., 2016). A ingestão de CCM isolada tem se mostrado eficaz na redução de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que a CCM pode regular negativamente as enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclo-oxigenase-2 (COX-2), lipoxigenase e atividade da xantina oxidase, suprimindo a ativação do NF- κ B (KOCAADAM e SANLIER, 2017) – fator de transcrição que controla a expressão de proteínas inflamatórias, crescimento celular e apoptose, além de ser ativado durante a contração muscular devido ao aumento da produção de radicais livres (SAHIN et al., 2016).

Em apoio aos nossos achados das análises de expressão gênica, as avaliações histológicas indicaram menor inflamação tanto nos animais que receberam WPC+CCM, quanto nos animais que receberam somente CCM, independente da realização ou não do teste exaustivo, em comparação ao grupo controle, demonstrando a capacidade do produto WPC+CCM e também da CCM em reduzir a inflamação. Além disso, também foi possível observar aumento dos pontos sobre fibras musculares nos grupos WPC+CCM e CCM, que podem estar relacionados ao aumento da força muscular e do desempenho no exercício.

Outro importante achado deste trabalho mostra maior quantidade de pontos sobre tecido conjuntivo nos animais do grupo controle, quando comparados aos animais dos grupos WPC+CCM e CCM. O aumento de tecido conjuntivo, formado principalmente por fibras de colágeno tipo III, implica, conseqüentemente, em diminuição de fibras musculares. No geral, o espessamento de fibras colágenas está relacionado a algum tipo de lesão, normalmente ao início do processo fibrótico e morte celular (HARGIS e MYERS, 2017; NOGUEIRA et al., 2021). Possivelmente, estes achados devem estar associados a cronificação da inflamação e o desenvolvimento de processos degenerativos que culminaram para morte celular com conseqüente deposição de colágeno. O teste de exaustão em natação ocasionou alterações morfológicas que podem ter levado à morte celular e ao aumento de fibrose tecidual. No entanto, mais estudos são necessários para investigar esses efeitos.

Além disso, análises histológicas também mostraram que, após o teste de exaustão em natação, foram observadas diferenças na área de fibra muscular e diâmetro. Assim, maior área de tecido muscular, bem como maior diâmetro das fibras musculares foram identificados nos animais que ingeriram WPC+CCM ou CCM, corroborando com os nossos dados de aumento dos pontos sobre fibra muscular e sustentando as afirmações de que o produto WPC+CCM ou a CCM isolada é capaz de melhorar o desempenho, por meio do aumento de força muscular.

A fadiga fisiológica resultante de esforço, carga física e repouso inadequado pode ser classificada como fadiga central ou periférica. A fadiga periférica pode ser avaliada por indicadores séricos, como o lactato (WANG et al., 2019). O lactato é um substrato oxidável no músculo esquelético e precursor da gliconeogênese nos músculos ou fígado após o exercício físico (BROOKS, 2000). No nosso estudo, observamos que o grupo suplementado com WPC+CCM apresentou níveis de lactato inferiores ao grupo controle (AIN-93M) após o teste de exaustão em natação, indicando que o grupo WPC+CCM manteve um estado de fadiga periférica mais baixo. Níveis elevados de lactato no músculo e no sangue durante o exercício podem provocar sensações de dor e desconforto, aumentando a percepção de esforço e, conseqüentemente, reduzindo o desempenho (KANTANISTA, 2016).

Achados semelhantes foram demonstrados por Sahin et al. (2016), em seu estudo com ratos *Wistar* machos submetidos a um protocolo de exercício físico, no qual foram fornecidos 20 mg de curcuminoides por dia durante 6 semanas, e verificou-se que os níveis de lactato sérico no grupo suplementado foram diminuídos em comparação aos níveis do grupo controle. Ainda, Wang et al. (2019) também relataram redução nos níveis séricos de lactato em mulheres suplementadas com curcumina após desafio de bicicleta giratória. No presente estudo, embora sem significância estatística, a CCM isolada mostrou tendência a um menor aumento nas concentrações de lactato após o teste de exaustão, quando comparada ao grupo controle. Além disso, quando associada ao concentrado proteico de soro de leite (WPC+CCM), foi possível observar concentrações de lactato significativamente mais baixas quando comparados ao grupo controle. Assim, o WPC+CCM pode melhorar a fadiga decorrente do exercício, o desempenho e reduzir danos musculares.

Os resultados deste trabalho corroboram com nossos achados anteriores de que o consumo do WPC+CCM e da CCM isolada contribuem para redução da inflamação e dos danos oxidativos ocasionados pelo teste de exaustão em natação, apesar da baixa dosagem ofertada de CCM (3mg/ kg/ dia). Além disso, maiores benefícios foram observados quando o consumo da CCM esteve associado ao WPC como, por exemplo, menor produção de lactato, possibilitando redução da fadiga no exercício extenuante e conseqüentemente, melhor desempenho. Alguns resultados inconsistentes e/ou inesperados podem estar associados ao tempo de intervenção do presente estudo. Portanto, são necessários estudos futuros para esclarecer os mecanismos agudos e crônicos relacionados às respostas antioxidantes e anti-inflamatórias geradas pelo consumo do WPC+CCM e da CCM isolada, bem como uma avaliação por maior tempo após a realização de um teste exaustivo.

Conclusão

O consumo de WPC+CCM e/ou CCM isolada, por quatro semanas, antes da realização de um teste exaustivo em natação, foi capaz de reduzir a resposta inflamatória, por meio da redução de IL-6 e aumento de IL-10. Além disso, o consumo de WPC+CCM foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica provocada pelo exercício extenuante (WPC+CCM TE vs. WPC+CCM) e o consumo da CCM reduziu as concentrações de proteína carbonilada. Maiores níveis de óxido nítrico foram observados pelo consumo do WPC+CCM e CCM, evidenciando uma possível ação cardioprotetora. Ainda, o consumo do WPC+CCM e CCM foi capaz de reduzir as áreas de infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo no músculo causadas pelo exercício exaustivo, além de aumentar a área e diâmetro das fibras musculares. A associação do WPC+CCM possibilitou, ainda, menor produção de lactato durante o exercício exaustivo, reduzindo a fadiga e, conseqüentemente, melhorando o desempenho.

Referências

- AEBI, H. Oxygen radicals in biological systems. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121-126, 1984.
- ATHERTON, P. J.; SMITH, K. Muscle protein synthesis in response to nutrition and exercise. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 5, p. 1049-1057, 2012.
- ATHIRA S, MANN B, SHARMA R, KUMAR R Ameliorative potential of *whey protein* hydrolysate against paracetamol-induced oxidative stress. **Journal of Dairy Science**. V.96, p.1431–1437, 2013.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CAMPBELL, Marilyn S.; CARLINI, Nicholas A.; FLEENOR, Bradley S. Influence of curcumin on performance and post-exercise recovery. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 61, n. 7, p. 1152-1162, 2021.
- CLARKSON PM, NOSAKA K, BRAUN B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 24, n. 5, p. 512-520, 1992.
- DA CONCEIÇÃO, A. R., DIAS, K. A., PEREIRA, S. M. S., SARAIVA, L. C., OLIVEIRA, L. A., de SOUZA, E. C. G., ... & DELLA LUCIA, C. M. Protective effects of *whey protein* concentrate admixture of curcumin on metabolic control, inflammation and oxidative stress in *Wistar* rats submitted to exhaustive exercise. **British Journal of Nutrition**, 1-36, 2021.
- DAVIES, Robert W.; CARSON, Brian P.; JAKEMAN, Philip M. The effect of *whey protein* supplementation on the temporal recovery of muscle function following resistance training: A systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 221, 2018.
- DAVIS, J. M.; MURPHY, E. A.; CARMICHAEL, M. D.; ZIELINSKI, M. R.; GROSCWITZ, C. M.; BROWN, A. S.; GANGEMI, J. D.; GHAFFAR, A.; MAYER, E. P. Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 6, p. R2168-R2173, 2007.
- DAWSON, C.; HORVATH, S. M. Swimming in small laboratory animals. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, p. 51–78, 1970.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K. et al. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Circulation**, v. 101, p. 33-39, 2000.

DROBNIC F, RIERA J, APPENDINO G, ET AL. Reduction of delayed onset muscle soreness by a novel curcumin delivery system (Meriva®): a randomised, placebo-controlled trial. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2014.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

FARIA, F. R., GOMES, A. C., ANTUNES, A., REZENDE, K. R., PIMENTEL, G. D., OLIVEIRA, C. L. P., ... & MOTA, J. F. Effects of turmeric extract supplementation on inflammation and muscle damage after a half-marathon race: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **European journal of applied physiology**, v. 120, n. 7, p. 1531-1540, 2020.

FUSTER-MUNOZ, E. et al. Effects of pomegranate juice in circulating parameters, cytokines, and oxidative stress markers in endurance-based athletes: A randomized controlled trial. **Nutrition**, v. 32, n. 5, p. 539-45, 2016.

G. A. BROOKS, "Intra- and extra-cellular lactate shuttles," **Medicine & Science in Sports & Exercise**, vol. 32, no. 4, pp. 790–799, 2000.

GARCIA, Victor; SESSA, William C. Endothelial NOS: perspective and recent developments. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 2, p. 189-196, 2019.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.130(A), p. 21-27, 2001.

GONÇALVES, Reggiani Vilela; COSTA, Andrea; GRZESKOWIAK, Lukasz. Oxidative Stress and Tissue Repair: Mechanism, Biomarkers, and Therapeutics. 2021.

GONZÁLEZ-BARTHOLIN R, MACKAY K, VALLADARES D, ZBINDEN-FONCEA H, NOSAKA K, PEÑAILILLO L. Changes in oxidative stress, inflammation and muscle damage markers following eccentric versus concentric cycling in older adults. **European journal of applied physiology**, v. 119, n. 10, p. 2301-2312, 2019.

HABIG, WH.; JAKOBY, WB. Glutathione S-Transferase (ratandhuman). **Methods in Enzymology**, 77(27), 218-239, 1981.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HARGIS, A.M., MYERS, S., 2017. The integument1. In: Pathologic Basis of Veterinary Disease. Elsevier. 1009- 1146.e1.

HENDRIX, J., NIJS, J., ICKMANS, K., GODDERIS, L., GHOSH, M., & POLLI, A. The Interplay between Oxidative Stress, Exercise, and Pain in Health and Disease: Potential Role of Autonomic Regulation and Epigenetic Mechanisms. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1166, 2020.

HERNANDEZ, M.; WICZ, S.; CORRAL, R.S. Cardioprotective actions of curcumin on the pathogenic NFAT/COX-2/prostaglandin E-2 pathway induced during Trypanosoma cruzi infection. *Phytomedicine* 2016, 23, 1392–1400.

HEWLINGS, Susan J.; KALMAN, Douglas S. Curcumin: a review of its effects on human health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 2017.

HOWATSON, Glyn et al. Influence of tart cherry juice on indices of recovery following marathon running. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 20, n. 6, p. 843-852, 2010.

HOWATSON, Glyn; VAN SOMEREN, Ken A. The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage. **Sports medicine**, v. 38, n. 6, p. 483-503, 2008.

HUANG, Wen-Ching et al. Effect of curcumin supplementation on physiological fatigue and physical performance in mice. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 905-921, 2015.

KANTANISTA, A., KUSY, K., ZAREBSKA, E., WLODARCZYK, M., CIEKOT-SOLTYSIAK, M., & ZIELINSKI, J. Blood ammonia and lactate responses to incremental exercise in highly-trained male sprinters and triathletes. **Biomedical Human Kinetics**, v. 8, n. 1, p. 32, 2016.

KERASIOTI E, STAGOS D, JAMURTAS A, KISKINI A, KOUTEDAKIS Y, GOUTZOULAS N, POURNARAS S, TSATSAKIS AM, KOURETAS D. Anti-inflammatory effects of a special carbohydrate-*whey protein* cake after exhaustive cycling in humans. **Food and Chemical Toxicology**. V. 61, p. 42- 46, 2013.

KOCAAADAM, B.; ŞANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2889-2895, 2017.

LEVINE, R. L. et al. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. C, p. 464–478, 1 jan. 1990.

LI, CHENG et al. Curcuminoids: implication for inflammation and oxidative stress in cardiovascular diseases. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 5, p. 1302-1317, 2019.

LI, MENG; LIU, FENG. Effect of *whey protein* supplementation during resistance training sessions on body mass and muscular strength: A meta-analysis. **Food & function**, v. 10, n. 5, p. 2766-2773, 2019.

LIU, F.R.; GAO, S.; YANG, Y.X.; ZHAO, X.D.; FAN, Y.M.; MA, W.X.; YANG, D.R.; YANG, A.M.; YU, Y. Antitumor activity of curcumin by modulation of apoptosis and autophagy in human lung cancer A549 cells through inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway. **Oncol. Rep.** v.39, p.1523–1531, 2018.

LIU, L.; WU, X.; ZHANG, B.; YANG, W.; LI, D.; DONG, Y.; YIN, Y.; CHEN, Q. Protective effects of tea polyphenols on exhaustive exercise-induced fatigue, inflammation and tissue damage. **Food & nutrition research**, v. 61, n. 1, p. 1333390, 2017.

LOWRY, O.H.; ROSE BROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

MA, Y.; LIU, J.; SHI, H.; YU, L. L. Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from *whey protein*. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 9, p. 6902-6912, 2016.
MENON, V. P.; SUDHEER, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. In: **The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease**. Springer, Boston, MA, 2007. p. 105-125.

MOLLAZADEH, H., CICERO, A. F., BLESSO, C. N., PIRRO, M., MAJEED, M., & SAHEBKAR, A. Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 1, p. 89-101, 2019.

MOSSER, David M.; ZHANG, Xia. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological reviews**, v. 226, n. 1, p. 205-218, 2008.

NICOL, L. M., ROWLANDS, D. S., FAZAKERLY, R., & KELLETT, J. Curcumin supplementation likely attenuates delayed onset muscle soreness (DOMS). **European journal of applied physiology**, v. 115, n. 8, p. 1769-1777, 2015.

NOGUEIRA, B. C. F., CAMPOS, A. K., ALVES, R. S., FARIA, R. D. C. V., SARANDY, M. M., E SILVA, F. F., & GONÇALVES, R. V. Oxidative and local histopathological response on skin wound of horses due to *Amblyomma sculptum* tick parasitism. **Research in Veterinary Science**, v. 136, p. 550-560, 2021.

PRESTES, J.; DONATTO, F.F.; DIAS, R.; FROLINNI, A.B.; CAVAGLIERI, C.R. Papel da Interleucina-6 como um sinalizador em diferentes tecidos durante o exercício físico. **Fitness & Performance Journal**, v.5, nº 6, p. 348-353, 2006.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **American Institute of Nutrition**. v.123, p.1939-51, 1993.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROBBINS, Richard A.; GRISHAM, Matthew B. Nitric oxide. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 29, n. 6, p. 857-860, 1997.

SABARENSE, C. M. et al. A new computational method for hepatic fat microvesicles counting in histological study in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 418, n. 2, p. 284–289, 10 fev. 2012.

SAHIN, K.; PALA, R.; TUZCU, M.; OZDEMIR, O.; ORHAN, C.; SAHIN, N.; JUTURU, V. Curcumin prevents muscle damage by regulating NF- κ B and Nrf2 pathways and improves performance: an in vivo model. **Journal of inflammation research**, v. 9, p. 147-154, 2016.

SCHOENFELD, B. J.; ARAGON, A. A. How much protein can the body use in a single meal for muscle-building? Implications for daily protein distribution. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 10, 2018.

TANABE, Y., CHINO, K., SAGAYAMA, H., LEE, H. J., OZAWA, H., MAEDA, S., & TAKAHASHI, H. Effective timing of curcumin ingestion to attenuate eccentric exercise-induced muscle soreness in men. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 65, n. 1, p. 82-89, 2019.

TANABE, Y.; CHINO, K.; OHNISHI, T.; OZAWA, H.; SAGAYAMA, H.; MAEDA, S.; TAKAHASHI, H. Effects of oral curcumin ingested before or after eccentric exercise on markers of muscle damage and inflammation. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 29, n. 4, p. 524-534, 2019.

TANABE, Y.; MAEDA, S.; AKAZAWA, N.; ZEMPO-MIYAKI, A.; CHOI, Y.; RA, S. G.; IMAIZUMI, A.; OTSUKA, Y.; NOSAKA, K. Attenuation of Indirect Markers of Eccentric Exercise-Induced Muscle Damage by Curcumin. **Eur. J. Appl. Physiol.** 2015, 115 (9), 1949–1957.

TEIXEIRA, K. R., SILVA, M. E., DE LIMA, W. G., PEDROSA, M. L., & HARAGUCHI, F. K. *Whey protein* increases muscle weight gain through inhibition of oxidative effects induced by resistance exercise in rats. **Nutrition Research**, v. 36, n. 10, p. 1081-1089, 2016.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, v. 851, n. 1-2, p. 51-70, 2007.

VENDETTI, P., Di MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 331, p. 63-68, 1996.

WALLIN, B. et al. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 208, n. 1, p. 10-15, 1993.

WANG, I. L.; HSIAO, C. Y.; LI, Y. H.; MENG, F. B.; HUANG, C. C.; CHEN, Y. M. Nanobubbles Water Curcumin Extract Reduces Injury Risks on Drop Jumps in Women: A Pilot Study. Evidence-based Complement. **Altern. Med.** 2019.

XU, X. Y., MENG, X., LI, S., GAN, R. Y., LI, Y., & LI, H. B. Bioactivity, health benefits, and related molecular mechanisms of curcumin: Current progress, challenges, and perspectives. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1553, 2018.

YU, W.; ZHA, W.L.; KE, Z.Q.; MIN, Q.; LI, C.R.; SUN, H.R.; LIU, C. Curcumin protects neonatal rat cardiomyocytes against high glucose-induced apoptosis via PI3K/Akt signalling pathway. **J. Diabetes Res.** 2016, 2016, 4158591.

7. CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo utilizou o *whey protein* do tipo concentrado e a CCM altamente absorvível e biodisponível. A CCM foi adicionada ao WPC de modo que se obtivesse um produto com a concentração de 0,8 g de CCM em cada 100 g de WPC. O consumo do WPC+CCM e/ou CCM isolada, antes da realização de um teste exaustivo em natação, foram capazes de reduzir a resposta inflamatória, por meio da redução de IL-6 e aumento de IL-10.

Além disso, o consumo de WPC+CCM foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica provocada pelo exercício extenuante (WPC+CCM TE vs. WPC+CCM) e o consumo da CCM reduziu as concentrações de proteína carbonilada. Maiores níveis de óxido nítrico foram observados pelo consumo do WPC+CCM e CCM, evidenciando uma possível ação cardioprotetora. O consumo do WPC+CCM e CCM foi capaz de reduzir as áreas de infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo no músculo causadas pelo exercício exaustivo, além de aumentar a área e diâmetro das fibras musculares. A associação do WPC+CCM possibilitou ainda uma menor produção de lactato durante o exercício exaustivo, reduzindo a fadiga.

Ademais, a realização da revisão sistemática possibilitou esclarecer os possíveis efeitos da suplementação de curcumina em humanos antes e/ou após o exercício físico agudo, demonstrando seu potencial benéfico. Em conclusão, os resultados do presente trabalho contribuem para avanços em pesquisas nesta área e podem direcionar estudos futuros na investigação do uso do WPC+CCM em humanos submetidos ao exercício físico exaustivo.

ANEXOS

Anexo I: Theracurmin®; Theravalues, Tóquio, Japão

Value creation through innovation



THERAVALUES CORPORATION

1F, Kioicho Building,3-12, Kioicho, Chiyoda-ku,Tokyo 102-0094,Japan
<http://theravalues.com/english/index.html>

NUTRITIONAL DATA ANALYSIS

Sample Theracurmin CR-033P

Test Item	Result	Detection Limit	Note	Method
Water	3.1g/100g	-		Heat under Reduced Pressure Method
Protein	0.6g/100g	-	1	Kjeldahl Method
Lipid	1.4 g/100g	-		Thermal Decomposition Method
Ash	0.3 g/100g	-		Direct Ashing Method
Carbohydrate	94.6 g/100g	-	2	-
Energy	393kcal/100g	-	3	-
Sodium	7.2mg/100g	-		Atomic Absorption Method
Nacl equivalent	0.018g/100g	-	4	-
Fe	0.32mg/100g	-		ICP Atomic Emission Spectroscopy
Ca	95.2mg/100g	-		ICP Atomic Emission Spectroscopy
Vitamin A (Retinol Activity Equivalent)			5	
Retinol	Not Detected	3µg/100g		HPLC
α-Carotene	Not Detected	6µg/100g		HPLC
β-Carotene	Not Detected	6µg/100g	6	HPLC
Total Ascorbic Acid	Not Detected	1mg/100g	7	HPLC
Fructose	Not Detected	0.05g/100g		HPLC
Glucose	1.62/100g	-		HPLC
Sucrose	Not Detected	0.05g/100g		HPLC
Maltose	25.5g/100g	-		HPLC
Lactose	Not Detected	0.05g/100g		HPLC
Galactose	Not Detected	0.05g/100g		HPLC
Saturated Fatty acid	Not Detected	0.01g/100g		GC
Trans Fatty Acid	Not Detected	0.05g/100g	8	GC
Cholesterol	Not Detected	1mg/100g		GC
Total Fat	1.4g/100g	0.01g/100g		ICP
Potassium	67mg/100g	1mg/100g		ICP
Vitamin D	0µg/100g	1000mcg/100g		GC
Added Sugars	38g/100g	0.1g/100g	9	GC

Note1. Nitrogen-protein Scale Factor:6.25

Note2. Calculation Formula (The Food Labelling Standard,2015 Cabinet Office Ordinance No.10):100-(water+Protein+Lipid+Ash)

Note3. Calculation Formula (The Food Labelling Standard,2015 Cabinet Office Ordinance No.10):100-(water+Protein+Lipid+Ash+Dietary)

Note4. Calculation Formula Na×2.54

Note5. Not calculated due to not detected

Note6. By The Food Labelling Standard, 2015 Cabinet Office Ordinance No.10)

Note7. Modified by hydrazine, first.

Note8. Measurement Object: Carbon 14-22 monotrans fatty acid and carbon 18 di- and tri-trans fatty acid (Ref.AOAC 996.06.AOCS Cc)

Note9. Including Maltose 30% (Composition ratio)

For and Behalf of : THERAVALUES CORPORATION
 Position : Director

Signature : 
 Kim Young Min.

Date : ...July 31, 2018.....

Anexo II: Aprovação CEUA**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 72/2018, intitulado **“Whey protein concentrado adicionado de cúrcuma: efeitos sobre parâmetros bioquímicos inflamatórios, antioxidantes e histológicos de ratos Wistar submetidos a exercício exaustivo”**, coordenado pela professora Ceres Mattos Della Lucia do Departamento de Nutrição e da Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 12/11/2018, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 72/2018, named **“Whey protein concentrate added to turmeric: effects on inflammatory, antioxidant and histological biochemical parameters of Wistar rats undergoing exhaustive exercise”**, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on November 12, 2018 valid for 12 months.



Prof.ª Átima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV