UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Efeito da cafeína na melhoria da performance atlética, fisiológica e metabólica de ciclistas

Anderson Pontes Morales

Rio de Janeiro
Março 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Efeito da cafeína na melhoria da performance atlética, fisiológica e metabólica de ciclistas

Anderson Pontes Morales
Orientadora: Dr.ª Beatriz Gonçalves Ribeiro

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requerimentos para o título de doutor em Ciências Nutricionais.

Rio de Janeiro
2021

Anderson Pontes Morales

Efeito da cafeína na melhoria da performance atlética, fisiológica e metabólica de ciclistas

Examinada por:

Prof. Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Adriana Farah de Miranda Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr.Tatiana El-Bacha Porto
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Rafael Pereira de Paula
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

AGRADECIMENTOS

À Deus por me iluminar em todos os momentos difíceis da minha vida e me proporcionar grandes conquistas.

À minha esposa Isabelle Morales e à nossa filha Lorena Morales pelo incentivo e amor ao longo deste longo percurso.

Aos meus pais, Carlos Morales e Eliane Morales por incentivarem e me mostrarem que as únicas coisas plausíveis nesse mundo estão associadas à Deus, o amor e a educação.

Aos meus irmãos (Alexandro e Guilherme) e demais familiares e amigos pelo apoio que sempre me proporcionaram na minha vida acadêmica.

À minha orientadora Profa Beatriz Ribeiro que além dos ensinamentos, é exemplo e inspiração para minha vida acadêmica.

Aos professores da pós-graduação UFRJ pela participação em minha formação acadêmica.

Ao Prof. Carlos Logullo por participar da minha vida acadêmica e pela criteriosa revisão do presente trabalho.

Aos alunos de nutrição (Bianca, Natália, Andreza, Remely e Willian) e a nutricionista Gisele que participaram direta ou indiretamente de todas as etapas deste trabalho.

Agradecimento especial aos amigos Tiago Costa Leite, Luiz Felipe Rangel, Alexandre, Henrique e Alessandra Alegre pelo auxílio em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Thiago Barth pela amizade construída nesse período e pela paciência por me ensinar a "arte" do método de separação de compostos químicos (HPLC).

Ao Felipe Sampaio-Jorge pelas discussões científicas desafiadoras e pela confiança depositada em nossa amizade.

Ao Prof. Ronaldo Maciel por compartilhar seus conhecimentos de aplicações práticas em minhas pesquisas.

Ao esporte "voleibol" que me despertou a buscar o conhecimento científico da Performance Humana.

À Secretaria Municipal de Esporte e Lazer de Macaé (SEMEL) pelo apoio logístico à pesquisa e a todos os secretários de esporte.

À Instituição ISECENSA, à vice-diretora Beth Landim, aos coordenadores (Maurício, Felipe e Aline), aos professores e aos meus alunos por me apoiarem nesse período importante em minha vida acadêmica.

RESUMO

Morales, A. P. Efeito da cafeína na melhoria da performance atlética, fisiológica e metabólica de ciclistas. 2021. 190 f. Tese (Doutorado em Nutrição) - Instituto de Nutrição Josué de Castro INJC, Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ, Rio de Janeiro, 2021.

Introdução: O presente estudo investigou a suplementação de cafeína por 4 dias na tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda em parâmetros fisiológicos, metabólicos e de performance. A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) tem sido descrita como um recurso ergogênico lícito, que é capaz de aumentar a performance em ciclistas. No entanto, as recomendações atuais não abordam o impacto do consumo usual de cafeína, bem como se a suplementação durante dias consecutivos poderia gerar tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda. **Objetivo**: O presente estudo investigou se a suplementação de cafeína por 4 dias induziria tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda em parâmetros fisiológicos, metabólicos e de desempenho de ciclistas. **Métodos**: Foram selecionados 14 ciclistas do sexo masculino classificados como atletas recreativos (idade: 34.1±4.3 anos; massa corporal: 79.1±11.8 kg; estatura: 178±0.09 cm; índice de massa corporal: 24.6±2.07 kg/m^2; consumo máximo de O_2: 51.5±6.3 $mL \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$; volume de treinamento: 202±83 km/semana; consumo de cafeína: 285.31±130.34 mg/dia) que completaram 4 sessões experimentais. Os ciclistas foram submetidos ao protocolo de contrarrelógio de 16 km utilizando uma carga de 50% (398.9±35.10 Watts/máx) da potência máxima de saída alcançada na avaliação cardioventilatório máxima. Foi realizado um experimento randomizado, duplo-cego, placebo/controlado e cruzado, envolvendo quatro ensaios experimentais; placebo (4 dias)-placebo (agudo) / PP, placebo (4 dias)-cafeína (agudo) / PC, cafeína (4 dias)-cafeína (aguda) / CC e cafeína (4 dias)-placebo (agudo) / CP. Os ciclistas ingeriram cápsulas de placebo ou cafeína (6 $mg \cdot kg^{-1}$) por 4 dias. No dia 5 (agudo), as cápsulas de placebo ou cafeína (6 $mg \cdot kg^{-1}$) foram ingeridas 60 minutos antes de completar um contra-relógio de 16 km (TT) no laboratório. **Resultados**: Os ensaios CC e PC mostraram melhorias no tempo (3,54%, *effect size* = 0,72; 2,53%, *effect size* = 0,51) e na potência de saída (2,85%, *effect size* = 0,25; 2,53%, *effect size* = 0,20) ($p < 0,05$) comparados às condições CP e PP, respectivamente. Esses efeitos foram acompanhados por aumento da frequência cardíaca (2,63%, *effect size* = 0,47; 1,99%, *effect size* = 0,34), volume minuto (13,11%, *effect size* = 0,61; 16,32%, *effect size* = 0,75), fração expirada de O_2 (3,29%, *effect size* = 0,34) = 0,96; 2,87, *effect size* = 0,72), concentração de lactato no sangue (imediatamente após, 29,51% *effect size* = 0,78; 28,21% *effect size* = 0,73; após a recuperação de 10 min, 36,01% *effect size* = 0,84; 31,22% *effect size* = 0,81) e redução na fração expirada de CO_2 (7,64%, *effect size* = 0,64; 7,75%, *effect size* = 0,56). **Conclusão**: Os resultados indicam que a cafeína, quando ingerida por ciclistas na dose de 6 $mg \cdot kg^{-1}$ por 4 dias, não induz tolerância aos

efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda em parâmetros fisiológicos, metabólicos e de performance.

Palavras-chave: Ciclismo; performance; cafeína; fadiga.

ABSTRACT

Introduction: The present study investigated caffeine supplementation for 4 days in tolerance to ergogenic effects promoted by acute ingestion in physiological, metabolic, and performance parameters. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) has been described as a licit ergogenic resource, which can increase performance in cyclists. However, current recommendations do not address the impact of usual caffeine consumption, as well as whether supplementation for consecutive days could generate tolerance to the ergogenic effects promoted by acute ingestion. Objectives: The present study investigated whether the caffeine supplementation for four days would induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters of cyclists. Methods: A double-blind placebo-controlled cross-over design was employed, involving four experimental trials; placebo (4-day)-placebo (acute)/PP, placebo (4-day)-caffeine (acute)/PC, caffeine (4-day)-caffeine (acute)/CC and caffeine (4-day)-placebo (acute)/CP. Fourteen male recreationally-trained cyclists ingested capsules containing either placebo or caffeine (6 mg·kg-1) for 4 days. On day 5 (acute), capsules containing placebo or caffeine (6 $mg \cdot kg^{-1}$) were ingested 60 min before completing a 16 km time-trial (TT). Results: CC and PC showed improvements in time (3.54%, ES = 0.72; 2.53%, ES = 0.51) and in output power (2.85%, ES = 0.25; 2.53%, ES = 0.20) ($p < 0.05$) compared to CP and PP conditions, respectively. These effects were accompanied by increased heart rate (2.63%, ES = 0.47; 1.99%, ES = 0.34), minute volume (13.11%, ES = 0.61; 16.32%, ES = 0.75), expired O2 fraction (3.29%, ES = 0.96; 2.87, ES = 0.72), lactate blood concentration (immediately after, 29.51% ES = 0.78; 28.21% ES = 0.73 recovery (10 min), 36.01% ES = 0.84; 31.22% ES = 0.81), and reduction in expired CO2 fraction (7.64%, ES = 0.64; 7.75%, ES = 0.56). Conclusion: These results indicate that caffeine, when ingested by cyclists in a dose of 6 $mg \cdot kg^{-1}$ for 4 days, does not induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters.

Keywords: caffeine; endurance; exercise; fatigue.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
2. REFERENCIAL TEÓRICO 17
2.1. CICLISMO E OS MODELOS DE EXERCÍCIOS 17
2.2. FADIGA E PERFORMANCE 19
2.2.1. FADIGA CENTRAL 19
2.2.2. FADIGA PERIFÉRICA 23
2.3. MECANISMOS DE MONITORAMENTO DA PERFORMANCE NO CICLISMO 24
2.3.1. PERCEPÇÃO SUBJETIVA DE ESFORÇO 24
2.3.2. POTÊNCIA DE SAÍDA MECÂNICA 24
2.3.3. CONCENTRAÇÃO DE LACTATO E CORTISOL SANGUÍNEO 26
2.3.4. CONSUMO DE OXIGÊNIO E A ECONOMIA DE MOVIMENTO 28
2.4. CAFEÍNA DE FONTES ALIMENTARES E ALTERNATIVAS 29
2.5. TAXA DE ABSORÇÃO DA CAFEÍNA 32
2.6. METABOLIZAÇÃO DA CAFEÍNA 34
2.7. MECANISMO DE AÇÃO DA CAFEÍNA 38
2.8. CAFEÍNA E PERFORMANCE 46
2.9. EFEITOS DE TOLERÂNCIA DA CAFEÍNA E PERFORMANCE 47
3. JUSTIFICATIVA 52
4. HIPÓTESES 53
5. OBJETIVOS 54
6. MÉTODO 56
6.1. AMOSTRAGENS 56
6.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO: 56
6.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 57
6.4. AVALIAÇÃO DIETÉTICA: ENERGIA, MACRONUTRIENTES E CAFEÍNA 58
6.5. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA 59
6.6. AVALIAÇÃO CARDIOVENTILATÓRIA MÁXIMA (ACM) 59
6.7. SUPLEMENTAÇÃO DIÁRIA, INGESTÃO AGUDA E CEGAMENTO 60
6.8. PROTOCOLO DE FAMILIARIZAÇÃO 61
6.9. CONTRARRELÓGIO E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E DE PERFORMANCE 61
6.10. AMOSTRAS DE SANGUE 62
6.11. ANÁLISES DE CAFEÍNA, LACTATO, GLICOSE E CORTISOL 63
7. RESULTADOS 65

7.1. MANUSCRITO 1 66
7.2. MANUSCRITO 2 83
7.3. MANUSCRITO 3 98
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS 118
9. REFERÊNCIAS 119
APÊNDICES 138
APÊNDICE 1 - Termo de consentimento 139
APÊNDICE 2 - Ordem contrabalançada dos testes com ingestão de cápsulas de placebo e cafeína 142
APÊNDICE 3 - Listagem de alimentos contendo cafeína 143
APÊNDICE 4 - Avaliação dietética: consumo de cafeína 145
APÊNDICE 5- Avaliação antropométrica 147
APÊNDICE 6 - Avaliação cardioventilatória máxima 148
APENDICE 7 - Escala subjetiva adaptada de Borg-10 149
APÊNDICE 8 - Perfil cromatográfico de um atleta antes (A) e 1 hora após (B) a ingestão da cápsula de cafeína 150
APÊNDICE 9 - Manuscrito publicado 1 151
APÊNDICE 10 - Manuscrito publicado 2 160
APÊNDICE 11 - Manuscrito publicado 3 171
ANEXOS 183
ANEXO 1 Parecer do comitê de ética 184
ANEXO 2 Laudo da cafeína fornecida pela farmácia de manipulação 189

LISTAS DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Reações da glicólise que envolvem doação ou recepção de íons hidrogênio.....26
Quadro 2 - Estratégia de busca bibliográfica..... 47
Tabela 1 - Concentração de cafeína em fontes alimentares e não alimentares 30
Tabela 2 - Distribuição dos receptores de adenosina nos tecidos, sinalização intracelular e a afinidade de ligação dos efetores.....42

MANUSCRITO 1

Table 1 - General characteristic of the studies included on systematic review and meta-analysis ..71
Table 2 - Subgroup analysis for the effect of caffeine ingestion on maximum running distance, time trial performance and muscle power using a random effect model.....73

MANUSCRITO 2

Table I - The values obtained in the maximum incremental test are shown in Table I. 89
Table II - Training routine per week (hours). Mean ± SD (n = 5). 89

MANUSCRITO 3

Table 1 - Food intake of cyclists 24-h before the trials. 104
Table 2 - Mean (± SD) RPE for every 2 km of distance traveled in cycling TT. 105
Table 3 - Analysis of blood samples (n = 14). Mean ± SD and median (interquartile deviation). .109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de fadiga por inibição reflexa supra-espinhal 20
Figura 2 - Modelo experimental de exercício de carga progressiva na modulação do metaborreflexo. 22
Figura 3 - Ponto de deflexão da potência de saída e da frequência cardíaca em 290 ciclistas profissionais (A). Teste máximo de 30 segundos realizado na esteira ergométrica adaptada em 8 mulheres (B). 25
Figura 4 - Perfil na economia de movimento de dois atletas com os mesmos níveis de VO_2máx. 29
Figura 5 - Concentração plasmática de cafeína em 12 voluntários saudáveis do sexo masculino administrada por meio de uma dose de 200 mg de cafeína em cápsula ou goma. 32
Figura 6 - Comparação da absorção gástrica com diferentes valores de pKa. 33
Figura 7 - Esquema simplificado do metabolismo de cafeína *in vivo*. 35
Figura 8 - Fatores genéticos e não genéticos que influenciam na decisão em manipular a cafeína em atletas 38
Figura 9 - Modulação da contração muscular entre a ação da epinefrina aos receptores β_2-adrenérgicos e a adenosina no músculo esquelético. 39
Figura 10 - Principais vias de sinalizações da adenosina no SNC de uma célula nervosa excitatória. 41
Figura 11 - Fluxograma ilustrando a influência dos quimioreceptores e dos efetores (adenosina e cafeína) no controle da ventilação. 44
Figura 12 - Relação dose resposta de diferentes doses agudas de cafeína na atividade locomotora de camundongos submetidos ao uso crônico (100 mg/kg/dia de cafeína por 7 dias). 48
Figura 13 - Fluxograma do estudo de ensaio clínico 57
Figura 14 - Desenho Experimental 58
Figura 15 - Recipientes com as cápsulas (cafeína e placebo) utilizadas nos 4 dias e as dos ensaios experimentais no laboratório 60
Figura 16 - Protocolo do contrarrelógio de 16 km 62
Figura 17 - Coleta das amostras de sangue 63

MANUSCRITO 1

Figure 1. Flow chart of articles reviewed 70
Figure 2. Summary of the quality of the 13 studies. 74
Figure 3. Forest plot of the total effect size from the two studies that assessed the effect of caffeine intake on maximum running distance. 75

Figure 4. Forest plot of the total effect size from the seven studies that assessed the effect of caffeine ingestion on time trial performance.....75
Figure 5. Forest plot of the total effect size from the four studies that assessed the effect of caffeine ingestion on muscle power in cycling. 76

MANUSCRITO 2

Figure 1 - Experimental design. 86
Figure 2 - Cardiopulmonary responses of the following variables: (A) heart rate, (B) oxygen uptake, (C) output of carbon dioxide, (D) minute ventilation, (E) expired oxygen fraction, and (F) rate of perceived exertion. Error bars represent the standard deviation of the mean. 90
Figure 3 - *Power variables in the figures (A) peak power output, (B) mean power output, (C) fatigue index, and (D) curve power output recorded in the Wingate test of the athletes according to the experimental conditions (PP, placebo-placebo [n = 5]; PC, placebo-caffeine [n = 5]; CC, caffeine-caffeine [n = 5]). Error bars represent the standard deviation of the mean. (*) Significant difference between the PC vs. PP trials (P<0.05)*. 91
Figure 4 - *Analysis of blood samples: (A) serum caffeine, (B) lactate concentration (PP, placebo-placebo [n = 5]; PC, placebo-caffeine [n = 5]; CC, caffeine-caffeine [n = 5]). Error bars represent the standard deviation of the mean. Figure 4A: (*) Significant difference between the PC, CC vs. PP (P<0.001). Figure 4B: (*) Significant difference between the PC vs. PP in R (p<0.05). (**) Significant difference of PC and CC trials compared to Rest (P<0.01). (***) Significant difference of PP, PC, and CC trials compared with Rest (P<0.001)*. 92

MANUSCRITO 3

Figure 1 - Experimental design. 101
*Figure 2 - Mean (±SD). Mean (±SD). Curve values and the average of cardiorespiratory parameters during TT performance: (A) HR, (B) VO_2, (C) VCO_2, (D) V_E, (E) FeO_2, and (F) $FeCO_2$. *Significant difference to CC from CP (P <0.05). $^{\#}$Significant difference from CP (P < 0.05). $^{\#\#}$Significant difference from PP (P < 0.05)*. 107
*Figure 3 - Mean (±SD). Curve values and the average of performance parameters during TT performance: (A) Power output and (B) time of simulated cycling TT performance. *Significant difference to CC from CP (P < 0.05). **Significant difference to PC from PP (P < 0.05). $^{\#}$Significant difference from CP (P < 0.05). $^{\#\#}$Significant difference from PP (P < 0.05)*. 108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SNC	Sistema Nervoso Central
CBC	Confederação Brasileira de Ciclismo
UCI	*Union Cycliste Internationale*
Na^{+}	Sódio
K^{+}	Potássio
Ca^{2+}	Cálcio
Mg^{2+}	Magnésio
ATP	Adenosina trifosfato
Pi	Fosfato inorgânico
$CaHPO^{4}$	Fosfato de Ca^{2+}
PSE	Percepção subjetiva de esforço
Borg	Escala Borg
pH	Potencial hidrogeniônico
ATPase	Enzima que catalisam a trifosfato de adenosina
H^{+}	Prótons
LDH	Enzima lactato desidrogenase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
VO_2máx	Consumo máximo de oxigênio
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
O_2	Oxigênio
VO_2	Consumo de oxigênio
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
pK_a	Constante de dissociação ácida
CYP450	Complexo enzimático citocromo P450
CYP1A2	Enzima responsável pela metabolização da cafeína
ADORA2A	Receptor celular de adenosina
Genótipo AC	Metabolizadores lentos
Genótipo CC	Metabolizadores lentos
Genótipo AA	Metabolizadores rápidos
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
RER	Quociente respiratório

ADK	Enzima adenosina kinase
Proteína G	Proteínas envolvidas na transdução de sinais celulares
A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3	Subtipos de receptores celulares de adenosina
NECA	5'-N-etilcarbodiimida adenosina
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
CO_2	Dióxido de carbono
VE	Ventilação minuto
pO_2	Pressão parcial de oxigênio alveolar
SaO_2	Saturação arterial de oxi-hemoglobina
DL50	Dose Letal 50%
P-450	Complexo enzimático hepático responsável pela metabolização
WADA	Agência Mundial Antidoping
NMDA	N-metil D-aspartato
Wmáx	Unidade de potência de saída máxima
CR	Simulado de contrarrelógio
IMC	Índice de massa corporal
PP	Ensaio experimental Placebo-Placebo
PC	Ensaio experimental Placebo-Cafeína
CC	Ensaio experimental Cafeína-Cafeína
CP	Ensaio experimental Cafeína-Placebo
TACO®	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ACM	Avaliação cardioventilatória máxima
Woutput	Potência de saída
FeO_2	Fração expiratória de O_2
$FeCO_2$	Fração expiratória de CO_2
FC	Frequência Cardíaca
VO_2pico	Maior taxa de consumo de O_2 medido durante o teste de esforço

APRESENTAÇÃO

Na linha de pesquisa em bioquímica nutricional do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), a Professora Beatriz Gonçalves Ribeiro realiza estudos relacionados à Nutrição Esportiva. As pesquisas são realizadas pela equipe do Laboratório de Pesquisa e Inovação em Ciências do Esporte (LAPICE/UFRJ) na UFRJ - Campus Macaé, RJ, em parceria com a Secretaria Municipal de Esporte e Lazer de Macaé (SEMEL). No LAPICE são desenvolvidos estudos relacionados aos efeitos de estratégias nutricionais nas respostas metabólicas associadas com a performance e/ou recuperação do atleta. A presente tese apresenta a estratégia de suplementação de cafeína em atletas de *endurance*. A pesquisa foi realizada de dezembro de 2017 a novembro de 2019, sob a coordenação da Professora Beatriz Gonçalves Ribeiro e conduzida por mim, educador físico, e outros integrantes do LAPICE, incluindo mestrandos, doutorandos e alunos de iniciação científica (graduandos UFRJ-Macaé), em equipe multidisciplinar (medicina, fisioterapia, nutrição e educação física). De acordo com os resultados obtidos, no escopo da pesquisa foram produzidos três manuscritos, que constituem a presente tese. Embora independentes, os manuscritos abordam a temática dos efeitos da ingestão de cafeína em parâmetros fisiológicos, metabólicos e de performance em atletas.

Os três manuscritos foram formatados de acordo com as normas dos periódicos e publicados. Os manuscritos serão apresentados na seção de resultados. O primeiro manuscrito foi originado da revisão de literatura que abordou o efeito agudo da ingestão de cafeína na performance atlética intitulado "Acute effects of caffeine intake on athletic performance: A systematic review and meta-analysis". (*Revista Chilena de Nutrición*, v. 44, n. 3, p. 283-291, 2017). O segundo manuscrito resultou de um estudo preliminar realizado com atletas de *triatlo* a fim de testar o modelo experimental proposto para os ciclistas intitulado "Caffeine supplementation for 4-day, followed by acute ingestion, did not impact triathlete output power after submaximal intensity exercise". (*Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício*, v. 18, n. 3, p. 118-128, 2019). O terceiro manuscrito aborda os efeitos da suplementação de cafeína por 4 dias na tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda em parâmetros fisiológicos, metabólicos e de performance, intitulado "Caffeine Supplementation for 4 days does not induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters of cyclists: A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled study" (*Nutrients,* v. 12, n. 7, p. 2101, 2020). Este manuscrito compõem os principais resultados apresentados na tese. A apresentação da tese foi estruturada sob forma de artigo, incluindo os seguintes itens: introdução, revisão de literatura, justificativa, objetivos, métodos, resultados, considerações finais, referências bibliográficas, apêndices e anexos.

1. INTRODUÇÃO

A busca por recursos ergogênicos lícitos é crescente por parte dos ciclistas na tentativa de minimizar a fadiga muscular gerada em períodos de treinamentos e competições. Várias fontes alimentares de cafeína (leite achocolatado, chocolate quente, chocolates, chá, refrigerantes e café) são consumidas por atletas de elites (TUNNICLIFFE *et al*., 2008). Recentemente, a disponibilidade de suplementos contendo cafeína, incluindo cápsulas e bebidas energéticas, provavelmente contribuiu para o aumento do consumo usual de cafeína por atletas (GUEST *et al*., 2021). Em atletas, a fadiga muscular é manifestada pela incapacidade de produzir repetidamente a força/potência muscular durante um determinado período de tempo (RIBEIRO *et al*., 2017). O auxílio ergogênico pode ser caracterizado como um suplemento que pode retardar a fadiga muscular, mantendo assim a potência muscular elevada por um determinado tempo, contribuindo para a melhora da performance esportiva (RIBEIRO *et al*., 2017; RIBEIRO *et al*., 2016). Neste cenário, a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) tem sido descrita como um recurso ergogênico lícito, que é eficaz para aumentar a performance em vários esportes (triatlo e ciclismo) (RIBEIRO *et al*., 2017; POTGIETER, WRIGHT & SMITH, 2018), em particular, esportes que envolvem principalmente força/potência muscular e resistência aeróbia (RIBEIRO *et al*., 2017). O principal mecanismo de ação descrito da cafeína é seu "papel" de estimulante do sistema nervoso central (SNC), que atua como um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina centrais e periféricos (A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3) (LOPES, PLIÁSSOVA & CUNHA, 2019). A adenosina é um neurotransmissor que modula diversos parâmetros fisiológicos (perceptuais e cardiorrespiratórios) e metabólicos (cortisol e lactato) (FREDHOLM *et al*., 2001).

No intuito de estabelecer o protocolo ideal de ingestão de cafeína a fim de induzir ergogenicidade, pesquisadores vêm desenvolvendo estratégias e para isso, estabelecendo diferentes dados tais como: a fonte de cafeína (COX *et al*., 2002), a dose (POTGIETER, WRIGHT & SMITH, 2018) e o tempo de ingestão antes da realização do exercício (BELL & MCLELLAN, 2002). Entre essas estratégias, a ingestão aguda de cafeína antes do exercício tem recebido atenção de diversos pesquisadores (IRWIN *et al*., 2011; BEAUMONT *et al*., 2017; GONÇALVES *et al*., 2017; LARA et al., 2019; WILK *et al*., 2019).

Segundo as diretrizes de nutrição esportiva (MAUGHAN *et al*., 2018; GUEST *et al*., 2021), a ingestão de cafeína 1 hora antes do exercício (aguda) em doses que variam de 3 a 6 $mg \cdot kg^{-1}$ de massa corporal é considerada a estratégia ergogênica mais eficiente. No entanto, as recomendações atuais não abordam o impacto do consumo usual de cafeína, de fontes alimentares (GUEST *et al*., 2021) e não alimentares (MAUGHAN *et al*., 2018), bem como se a suplementação durante dias consecutivos (crônica) poderia gerar tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão

aguda (MAUGHAN *et al*., 2018). Por exemplo, Beaumont *et al* (2017) observaram que a suplementação crônica (28 dias) de cafeína (1,5 $mg \cdot kg^{-1} \cdot dia^{-1}$), seguido pela ingestão aguda (3 $mg \cdot kg^{-1}$ de massa corporal de cafeína) induziu tolerância aos efeitos ergogênicos da cafeína na performance. Lara *et al* (2019), usaram um modelo de teste incremental no cicloergômetro e demonstraram que a suplementação diária de cafeína (3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot dia^{-1}$) por um período de 20 dias, reduziu a magnitude dos efeitos ergogênicos da cafeína na resposta ventilatória. Em ambos os estudos, os autores (BEAUMONT *et al*., 2017; LARA *et al*., 2019) usaram doses de cafeína que excederam a quantidade média de consumo usual dos indivíduos e observaram que a suplementação crônica seguida por uma dose aguda produziu tolerância aos efeitos ergogênicos da cafeína na performance.

Por outro lado, Irwin *et al* (2011) não observaram tolerância aos efeitos ergogênicos da cafeína na performance utilizando um teste de contrarrelógio em indivíduos classificados como consumidores baixos a moderados de cafeína. Os autores utilizaram uma dose de 3 $mg \cdot kg^{-1}$ de massa corporal de cafeína semelhante ao consumo usual dos participantes (3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot dia^{-1}$) em um curto período (4 dias), seguido por uma dose aguda (6 $mg \cdot kg^{-1}$ de massa corporal de cafeína). Esta investigação (IRWIN *et al*., 2011) é comparável ao presente estudo, mas difere na quantidade de cafeína ingerida, 6 $mg \cdot kg^{-1} \cdot dia^{-1}$, acima do consumo usual e no tipo de consumidores, classificados como moderados a altos.

Considerando esta lacuna na literatura, tem-se especulado se a ingestão crônica de cafeína, por um período curto (4 dias) poderia causar a mesma intensidade de tolerância já demonstrada por períodos longos (≥ 20 dias) (BEAUMONT *et al*., 2017; LARA *et al*., 2019). A resposta a esse questionamento é fundamental para os atletas de ciclismo que participam de provas no período de 4 e 5 dias consecutivos (ex. *Race Across América, La Ruta de Los Conquistadores, Tour do Rio e* Campeonato Brasileiro de Pista e Estrada de Ciclismo), considerando que nesse período o atleta recebe gradativamente maiores cargas fisiológicas no decorrer dos dias de realização das provas (WALLET *et al*., 2018).

Assim, o presente estudo investigou se a suplementação de cafeína por 4 dias induziria tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda em parâmetros fisiológicos, metabólicos e de performance em ciclistas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CICLISMO E OS MODELOS DE EXERCÍCIOS

O uso de bicicletas continua sendo o principal meio de transporte em vários países do mundo. Em especial, o ciclismo, que pode ser praticado como esporte recreativo e competitivo, continua se tornando cada vez mais popular. Corroborando esta afirmação, diversos autores descrevem que o ciclismo continuou a se expandir devido à atividade recreativa, e se intensificando ainda mais devido a sua natureza competitiva do esporte (FARIA, PARKER & FARIA, 2005).

No ano de 1890 iniciaram as provas de ciclismo de pista em velódromo, com a inauguração do velódromo de Paris. Em 1896, ocorreu a primeira Olimpíada da época moderna, onde o ciclismo era uma das modalidades, e foram disputadas provas em estradas e em pistas. Um século depois, em 1996, estreia nas olimpíadas de Atlanta uma nova modalidade do ciclismo, o mountain bike, que surgiu por volta dos anos 50, na Califórnia e foi criada por ciclistas cansados de correr em asfalto, que passaram então a disputar provas em trilhas nas montanhas e colinas mais próximas. Desde então, surgiu a primeira bicicleta própria para esse tipo de prova, com alguns acessórios próprios para esse novo tipo de superfície, a montanha. No Brasil, o ciclismo começou a ganhar adeptos aos poucos e, em 1904, teve o primeiro participante em uma competição internacional onde um brasileiro conquistou o sexto lugar (CBC, 2020). Atualmente, inúmeras provas nacionais (CBC, 2020) e internacionais (UCI, 2020) são disputadas no Brasil.

O ciclismo competitivo se divide basicamente em duas modalidades: provas de estrada, que exige mais resistência muscular do ciclista e provas de pista, com largadas de alta potência, seguidas por corrida constante de alta intensidade. As competições podem ainda ser divididas em individuais ou coletivas. Existem ainda as corridas de estrada de multi-estágios que são caracterizadas por vários dias consecutivos de provas. As principais provas longas (duração de 3 semanas) no calendário de competições internacionais e nacionais são o *Giro d'Italia*, *Tour de France* e *Vuelta a Espanã* (UCI, 2020). Além disso, os ciclistas participam de provas consideradas de períodos curtos (duração de 4-5 dias) como a *Race Across América*, *La Ruta de Los Conquistadores, Tour do Rio e* Campeonato Brasileiro de Pista e Estrada de Ciclismo (UCI, 2020; CBC, 2020).

Os ciclistas profissionais nesse tipo de modalidade (multi-estágios) devem ser capazes de tolerar altas cargas de trabalho. Nessa perspectiva, vários modelos de protocolos laboratoriais são utilizados por pesquisadores para medir parâmetros de performance e verificar possíveis mecanismos elucidadores na instalação da fadiga no ciclismo (HOPKINS, SCHABORT & HAWLEY, 2001; PATON & HOPKINS, 2001), são eles:

• Trabalho constante (contrarrelógio) - o ciclista completa uma quantidade de trabalho ou uma distância definida no menor tempo possível.

• Duração constante - o ciclista completa o maior trabalho ou uma distância maior em um determinado tempo estabelecido.

• Potência constante ou carga constante - o ciclista mantém a potência de saída até a exaustão.

• Teste de carga incremental para determinar o consumo máximo de oxigênio ou potência máxima de saída - o ciclista aumenta a potência gradativamente até atingir o esforço máximo, que geralmente é atingida no tempo de 8 a 12 minutos.

• Teste incremental para determinar o limiar anaeróbico - o ciclista executa uma série de exercícios de potência constante em intensidade crescente; o limiar anaeróbico é determinado pela intensidade associada a níveis de lactato sanguíneo ou pelas alterações das variáveis respiratórias.

• Potência de saída crítica - o ciclista realiza séries de exercícios de potência constante, carga constante ou duração constante em diferentes intensidades; a duração e a potência média de cada teste são combinadas em um modelo matemático para estimar a capacidade anaeróbica, a capacidade de trabalho e potência aeróbica máxima.

Dentre esses modelos citados anteriormente, dois são bem utilizados por pesquisadores em estudos que mensuram a instalação da fadiga neuromuscular; o de carga constante e o contrarrelógio. No teste de carga constante onde geralmente é executado a 75% do VO_2máx, os resultados podem apresentar maior variabilidade no tempo final alcançado pelos atletas (JEUKENDRUP *et al*., 1996) e maior sensibilidade em induzir alterações das variáveis psicofisiológicas (Plenitude gástrica, Sensação térmica, Sensação de sede, Percepção de Esforço e Percepção de dor). O teste de carga constante foi posteriormente criticado pela comunidade científica, uma vez que, o ciclista não possui a liberdade de alternar mudanças de ritmo e intensidade ao longo do evento (CURRELL & JEUKENDRUP, 2008). Isso se deve, ao teste possuir características de ser realizado pelo atleta de forma monótona, sem final conhecido (FARIA *et al*., 2016). Marino (2012) e Tucker *et al* (2006) sugerem que esse modelo de avaliação os ciclistas raramente mantêm uma produção de energia constante até a exaustão em uma competição. Em contraste, o modelo de exercício contrarrelógio apresenta maior validade ecológica pela liberdade de regulação da intensidade, onde apresenta semelhanças das competições (PASSFIELD & COAKLEY, 2014). No contrarrelógio, o atleta estabelece então uma estratégia para alcançar o ponto final do exercício no menor tempo possível sem que ele atinja a fadiga neuromuscular prematura. Nesse sentido, a estratégia utilizada pelo atleta durante o contrarrelógio é denominada como *pacing*. O *pacing* pode ser regulado em resposta da memória de tarefas prévias com duração ou distância similar, às condições ambientais externas e as condições metabólicas, processadas no cérebro (COUTO *et al*., 2015).

No entanto, vale ressaltar que os dois modelos de exercício apresentam similar sensibilidade a intervenção experimental em que os pesquisadores analisam diversas variáveis de performance,

pois apesar dos atletas apresentarem maior variação no tempo final no teste até a exaustão (teste de carga constante), o efeito da intervenção é substancialmente mais sensível que no contrarrelógio (AMANN; HOPKINS & MARCORA, 2008). Além disso, identificar e intervir o aparecimento da fadiga pode ser importante uma vez que, os atletas podem manipular as variáveis de treinamento (volume x intensidade) de forma mais precisa às suas rotinas de treinamento (GRAHAM, 2001).

2.2. FADIGA E PERFORMANCE

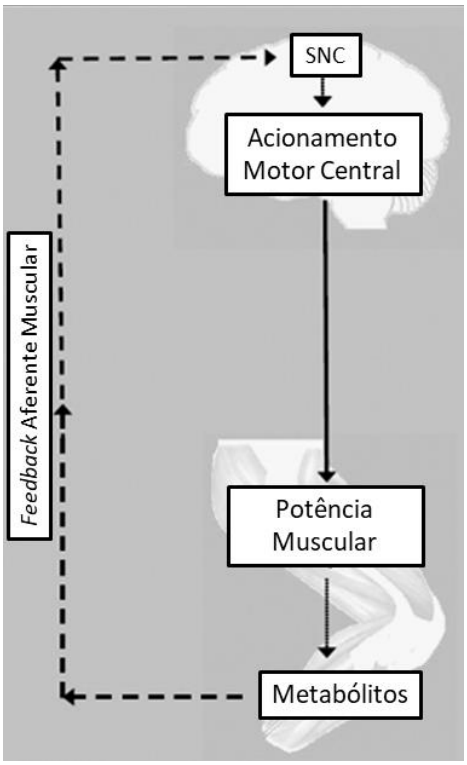
A fadiga é definida como a incapacidade transitória de manter a força ou a potência muscular necessária na realização do exercício (EDWARDS, 1981). Pesquisadores relatam que esse fenômeno é multifatorial, dinâmico e não linear, que inclui componente fisiológico (AMANN, 2011; NOAKES, 2012). A etiologia da fadiga foi dividida em dois mecanismos: central e periférica. Em relação ao exercício cíclico, a fadiga periférica pode manifestar-se pelas alterações bioquímicas no interior do músculo em exercício, levando a uma resposta reduzida a excitação neural para gerar força muscular (GREEN, 1997; AMANN, 2011; HSU *et al*., 2020). Já a fadiga central refere-se a eventos que se iniciam no interior do sistema nervoso central (SNC), que reduz a estimulação eferentes dos neurônios por meio de vias supra-espinhais (isto é, redução do estímulo neural ao músculo esquelético e ventilatório) (GANDEVIA, 2001, WAN *et al*., 2017).

Embora esses mecanismos apresentem de forma integrada à importância de cada um varia de acordo com o modelo de exercício, o nível de condicionamento físico, disponibilidade de O_2 ao músculo e o estado nutricional do atleta (NOAKES, 2012). A fadiga é assunto muito debatido pela literatura científica atualmente, onde não há um consenso sobre os reais mecanismos desencadeadores. A dificuldade ainda é maior em estudar esse fenômeno quando os mecanismos que envolvem múltiplos sistemas possam ser quantificados in vivo (WAN *et al*., 2017; HSU *et al*., 2020).

2.2.1. FADIGA CENTRAL

Em 1891, August Waller sugeriu que o componente central seria responsável pela fadiga. Subsequentemente, Alessandro Mosso demonstrou uma capacidade reduzida de realizar trabalho após um estresse mental acentuado, resultando no termo "fadiga mental". Francis Bainbridge concluiu mais tarde que a "fadiga muscular" foi designada como a "fadiga nervosa" (BAINBRIDGE, 1919; ABBISS & LAURSEN, 2005; NOAKES, ST CLAIR GIBSON & LAMBERT, 2005). Apesar dos primeiros pesquisadores estudarem a fadiga central, a falta de técnicas disponíveis para quantificar a função do SNC provavelmente impediu a realização de inúmeras pesquisas nessa área (BARKER, JALINOUA & FREESTON, 1985). Nos últimos anos, vários modelos foram propostos para explicar a fadiga durante o exercício prolongado, com enfoque

no cardiovascular, bioquímico, termorregulador, psicológico/motivação e governador central (HSU *et al*., 2020; ABOODARDA *et al*., 2020). Um modelo tradicional de fadiga integrado que ocorre durante a realização do exercício de *endurance* foi proposto por Amann (2011) (Figura 1).



Fonte: Adaptado de Amann (2011).

Figura 1 - Modelo de fadiga por inibição reflexa supra-espinhal

O mecanismo nervoso proposto está envolvido pelas informações elétricas geradas pelo SNC até as junções neuromusculares. Para ativação da musculatura alvo envolvida no exercício os neurônios motores somáticos descendentes do córtex motor geram potenciais elétricos até os motoneurônios-α e então para a junção neuromuscular. A incapacidade desse sistema em produzir uma alta frequência de estímulos (contrações intensas) ou a sua persistência por longa duração (contrações repetidas) pode alterar a homeostase iônica ou impedir o restabelecimento dos sistemas elétricos de informação. Isso pode impedir a melhora da performance em exercícios aeróbios realizados em alta intensidade, por exemplo, na prova de ciclismo isso poderia impactar negativamente na manutenção das contrações musculares por um período elevado e reduzir a potência de saída gerada (TAYLOR *et al*., 2016).

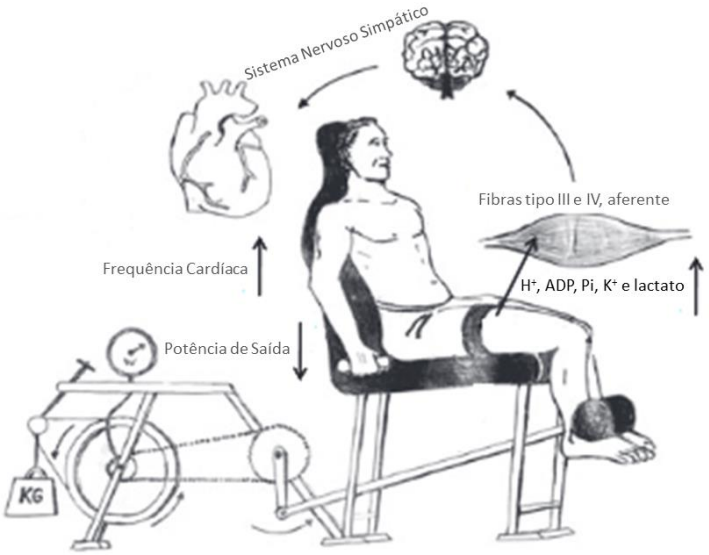
Mais especificamente parece que as fibras nervosas do grupo III e IV são as mais influenciadas no mecanismo de fadiga central pela estimulação do receptor metaborreflexo muscular (AMANN, 2012; TAYLOR *et al*., 2016; SIDHU *et al*., 2017). Estas fibras espinhais são

projetadas ao SNC que são sensíveis e respondem a vários metabólitos produzidos pelo músculo esquelético durante a realização do exercício (ABOODARDA *et al*., 2020). Esse processo é contínuo, pois informa o estado físico-químico do músculo ao SNC. Com isso, a descarga espontânea dessas fibras aumenta à medida que os sinalizadores de fadiga (Pi e H+) também aumentam, gerando uma influência inibitória no comando motor central e, consequentemente, diminuição na taxa de disparos para os neurônios eferentes. Portanto, a magnitude das mudanças bioquímicas no interior do músculo durante a realização do exercício exerce um efeito inibitório no acionamento do córtex motor e, portanto, o desenvolvimento da fadiga central (AMANN, 2011). Não obstante, a inibição do grupo III e IV no comando motor central tem um papel importante na supressão à fadiga central (AMANN *et al*., 2007; SIDHU *et al*., 2017).

Para verificar a modulação das respostas dessas fibras (III e IV) estudos foram conduzidos com bloqueadores farmacológicos dessas vias suprimindo as respostas do SNC. Amann *et al* (2009) observaram um aumento na produção de potência durante a primeira metade de uma prova contrarrelógio de 5 km de ciclismo. Os resultados surpreenderam os pesquisadores, pois aumentou a acidose metabólica e antecipou a fadiga durante a segunda metade do contrarrelógio. Além disso, o sistema ventilatório e cardiovascular foram prejudicados pela redução da atividade durante a realização do contrarrelógio. No estudo de Sidhu *et al* (2014) foi observado uma supressão na produção de força utilizando os membros superiores após a realização de um teste no ciclismo utilizando 80% do VO_2máx no tempo de ~9 min. Foi demonstrado ainda que essa queda não ocorria quando as aferências periféricas dos membros inferiores eram bloqueadas farmacologicamente, confirmando a hipótese.

A ativação do metaborreflexo pela contração dos músculos esqueléticos é amplamente conhecida. Entretanto, apenas na última década, descreveu-se que o metaborreflexo também pode ser ativado pelo trabalho dos músculos respiratórios. Nos estudos de Amann *et al* (2010); Amann *et al* (2011), as respostas cardiovasculares e ventilatórias foram comprometidas com bloqueios farmacológicos das fibras III e IV, o que reduziu a oferta de O_2 para a musculatura ativa, diminuindo a saturação da hemoglobina/mioglobina e consequentemente aumentou a acidose metabólica e ventilatória nos diferentes modelos de intensidades do exercício proposto. Essas fibras aferentes não mielinizadas do tipo III e IV são sensíveis a metabólitos, especialmente à acidose, e também sensíveis a prostaglandinas e bradicininas (AGOSTONI *et al*., 2002). Uma vez ativadas, estimulam diretamente o drive simpático, que leva a aumento da frequência cardiorrespiratória e vasoconstrição nos músculos que não estão em exercício, efeito que, combinado, leva mais sangue oxigenado aos músculos esqueléticos em atividade. A estimulação das fibras aferentes tipo III e IV parece ser essencial para a resposta hemodinâmica normal ao exercício em indivíduos saudáveis. A maioria das fibras aferentes dos grupos III e IV entra na medula espinhal via corno dorsal; impulsos

dessas fibras provavelmente apresentam diversos níveis de integração, o reflexo parece não necessitar do tronco cerebral apesar de haver um nível de integração supraespinhal (BOUSHEL, 2010) (Figura 2).



Fonte: Adaptado de Boushel (2010)

Figura 2 - Modelo experimental de exercício de carga progressiva na modulação do metaborreflexo.

Esse fenômeno pode ser explicado por estudos utilizando técnicas de microesferas para medir o fluxo sanguíneo em animais (ratos e porcos). Essas observações mostram aumentos substanciais desse fluxo para o diafragma, que muitas vezes esses níveis são próximos dos músculos esqueléticos envolvidos durante a realização do exercício de carga progressiva máxima (MANOHAR, 1986; ARMSTRONG *et al*., 1987; LAUGHLIN *et al*., 1989). Teoricamente, o custo metabólico da respiração requerido pelos músculos respiratórios e mais a sua demanda de perfusão para suprir a demanda de O_2, poderia limitar o fluxo sanguíneo disponível para os músculos locomotores e, assim, diminuir a produção de trabalho muscular. Adicionalmente evidenciou-se que o aumento do trabalho muscular inspiratório eleva os níveis de noradrenalina, reduzindo o fluxo sanguíneo da perna durante exercício máximo em bicicleta (HARMS *et al*., 1997). No estudo subsequente evidenciou a existência de redistribuição do fluxo sanguíneo dos músculos periféricos ativos para o diafragma, conferindo a mais de 14 - 16% do débito cardíaco (HARMS *et al*., 1998). A hipótese é de que o aumento da ventilação durante a realização do exercício de alta intensidade leva acúmulo de metabólitos no diafragma e comprometimento do fluxo sanguíneo aos músculos solicitados por meio de um reflexo vasoconstritor simpaticamente mediado (KATAYAMA *et al*., 2019).

Já em outro cenário, autores relatam que durante a realização do exercício de *endurance* com carga progressiva, o trabalho muscular aumentaria de forma constante tendo a necessidade de

elevar os níveis de saturação de O_2 na mioglobina (BELL *et al*., 1999; CHAPMAN & STAGER, 2008). Diante disso à fadiga poderia ocorrer no músculo diafragmático, pois aumentaria a redistribuição do fluxo sanguíneo aos músculos esqueléticos (BONSIGNORE *et al*., 1998; CHAPMAN & STAGER, 2008). O estudo de Katayama *et al* (2019) confirmam esses achados onde foi observado a manutenção do fluxo sanguíneo da artéria femoral em dez indivíduos durante a realização do exercício submáximo em cicloergômetro, utilizando um protocolo de indução de fadiga para o músculo diafragma (os indivíduos realizavam uma hiperventilação voluntária com 40% da pressão inspiratória máxima e com frequência respiratória de 40 respirações min-1). Esses autores sugerem que o controle simpático da redistribuição do fluxo sanguíneo para os membros ativos é facilitado, em parte, pelo metaboreflexo do músculo diafragma.

2.2.2. FADIGA PERIFÉRICA

A fadiga periférica é definida quando a "maquinaria contrátil" do tecido muscular diminui a capacidade de gerar força. Alterações no potencial de ação pela membrana do sarcolema e túbulos T (NOAKES *et al*., 2005; MUKUND & SUBRAMANIAM, 2020), a liberação e resgate de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (DECORTE *et al*., 2012) e alterações metabólicas (DEBOLD, 2012) são os principais fatores que podem acometer a geração de força. Alterações no mecanismo envolvendo a bioeletrogênese podem desencadear a fadiga periférica, por abranger a movimentação de íons K^+, Na^+ e Cl^- entre os compartimentos intra e extracelulares (CLAUSEN, 2003; MUKUND & SUBRAMANIAM, 2020). Para muitos autores a fadiga periférica está associada à falha em reestabelecer os gradientes de Na^+ e K^+ antes do estímulo subsequente ocasionar uma taxa menor na propagação do potencial de ação e, consequentemente, reduzir a produção de força e potência muscular (CHAPMAN & STAGER, 2008; DECORTE *et al*., 2012).

Outra possibilidade no encadeamento desse fenômeno pode estar ligada a redução da liberação do Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático. A redução na concentração de Ca^{2+} pode ocorrer por fatores como: 1) redução na amplitude do potencial de ação, diminuindo a ativação dos receptores diidropiridínicos, o que acontece simultânea ou consequentemente ao fator anteriormente descrito; 2) depleção de ATP e o aumento na concentração de Mg^{2+}, que também podem atenuar a responsividade dos receptores de diidropiridina e rianodina, diminuindo a liberação de Ca^{2+}; 3) elevação da concentração de Pi, que pode inibir os receptores de rianodina ou se ligar ao Ca^{2+} no lúmen do retículo sarcoplasmático, provocando a precipitação do Ca^{2+} ($CaHPO^4$) e a redução de sua disponibilidade (DECORTE *et al*., 2012).

2.3. MECANISMOS DE MONITORAMENTO DA PERFORMANCE NO CICLISMO

Estudar os mecanismos envolvidos na performance, principalmente como medir e intervir, tem se tornado um desafio constante dos pesquisadores e treinadores em manipular as condições de treinamento dos ciclistas. Em linhas que se seguem será descrito como a percepção subjetiva de esforço, potência de saída mecânica, avaliação da concentração de lactato e cortisol sanguíneo e o volume de oxigênio consumido e a economia de movimento vêm sendo utilizadas no monitoramento da performance.

2.3.1. PERCEPÇÃO SUBJETIVA DE ESFORÇO

Fatores psicológicos também podem influenciar nas respostas da fadiga central. Para muitos autores, alterações na percepção subjetiva de esforço (PSE) e na motivação parecem melhorar a performance. Por exemplo, no estudo de Wingfield, Marino & Skein (2018) observou-se uma taxa maior de potência de saída associada à melhora da atividade do córtex motor em ciclistas que receberam informações da distância percorrida durante a realização do contrarrelógio de 30 km. A percepção subjetiva de esforço envolve a integração de *feedback* aferente de estímulos cardiorrespiratórios, metabólicos e térmicos para permitir que um indivíduo avalie o quão difícil ou fácil é a realização do exercício. O PSE no esporte baseia-se em suas fortes relações com a intensidade do exercício (trabalho, velocidade e potência) e fatores fisiológicos (frequência cardíaca, ventilação, consumo de O_2 e lactato sanguíneo). Para medir a PSE é utilizado a escala de Borg (escala de 6-20) ou o Borg adaptado (escala de 1-10) (BORG, 1982).

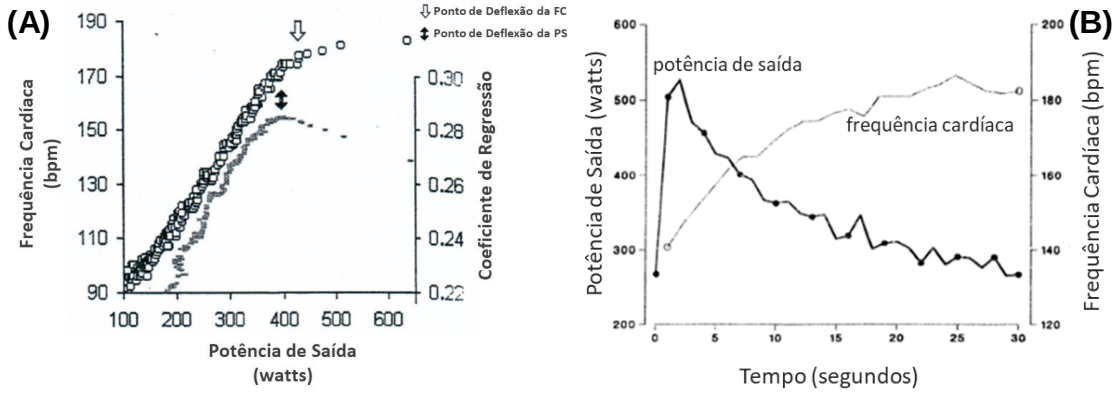
Durante a realização de exercício o SNC recebe e integra constantemente informações de respostas fisiológicas e psicológicas que são expressas verbalmente pela PSE (NOAKES, 2004). O PSE é muito utilizado na prescrição de exercícios e monitoramento de respostas agudas e crônicas da carga de treinamento. Achados de estudos mostram que o PSE aumenta linearmente em relação às respostas fisiológicas em modelos diferentes de exercícios (WINGFIELD, MARINO & SKEIN, 2018; ESTON, 2012). Dessa forma, a PSE é uma “ferramenta” fácil e acessível, que pode ser usada rotineiramente para quantificar a percepção do esforço produzido em uma determinada atividade ou carga (TUCKER, 2009).

2.3.2. POTÊNCIA DE SAÍDA MECÂNICA

A potência é a quantidade de trabalho (ou energia de uma força) efetuado por unidade de tempo, o que equivale à velocidade de mudança de energia num sistema ou ao tempo disponível para realizar um trabalho. Portanto, a potência é igual à energia total dividida pelo tempo. Entretanto, a potência mecânica é o trabalho que realiza um indivíduo ou uma máquina num determinado período de tempo. Trata-se da potência de saída transmitida por meio da ação de forças

físicas de contato ou elementos mecânicos, nomeadamente alavancas e engrenagens (CORMIE, MCGUIGAN & NEWTON, 2010; STIG & GERTJAN, 2011). Atualmente os ciclistas vêm buscando "ferramentas" para melhor medir o aparecimento da fadiga neuromuscular e quantificar a intensidade do treino (MORGAN *et al*., 2019). Os potenciômetros (*power meters*) estão disponíveis comercialmente desde o ano de 1986 e, tornaram-se indispensáveis ao treino, competição, testes e pesquisa científica especificamente ligada ao ciclismo (KARSTEN *et al*., 2018).

Anteriormente a identificação da fadiga neuromuscular no treino/competição de ciclismo, baseava-se em respostas da frequência cardíaca do ciclista ao esforço e não na medição direta do trabalho. Considerando esse tema, autores como Grazzi *et al* (1999) avaliaram em seu estudo clássico a relação entre a potência de saída mecânica realizada em 290 ciclistas do sexo masculino, totalizando quinhentos testes incrementais (Figura 3A). Os autores concluíram que na fase final do teste o ponto de deflexão da curva de potência de saída ocorria precocemente em relação à frequência cardíaca. Esse fenômeno também foi observado por Cheetham *et al* (1986) em um teste máximo realizado com duração de 30 segundos por 8 indivíduos (Figura 3B). Baseado nesses achados, o monitoramento da potência de saída indica uma medida precisa de esforço dos ciclistas, que permite aos treinadores visualizar em detalhes a exigência rápida da carga de esforço. Até este ponto, a frequência cardíaca era a única maneira de avaliar a performance, mas pode apresentar atraso em sua resposta, principalmente em provas de contrarrelógio, dificultando o monitoramento da carga de esforço ou fadiga momentânea.



Fonte: Adaptado de Grazzi *et al* (1999) e Cheetham *et al* (1986)

Figura 3 - Ponto de deflexão da potência de saída e da frequência cardíaca em 290 ciclistas profissionais (A). Teste máximo de 30 segundos realizado na esteira ergométrica adaptada em 8 mulheres (B).

2.3.3. CONCENTRAÇÃO DE LACTATO E CORTISOL SANGUÍNEO

O lactato sanguíneo alguns anos atrás, foi associado à atenuação na geração de força e na produção de *endurance* muscular. Foi relatado por vários pesquisadores que o acúmulo poderia inibir a via da glicólise provocada pela redução do pH intra-celular que afetaria a atividade da miosina ATPase (ROTH, 1991; BANGSBO *et al*., 1995). Entretanto, o resultado da pesquisa produzido por Juel (2008) demonstrou que o acúmulo desse metabólito conservaria o equilíbrio ácido-base intramuscular. Por exemplo, quanto mais ácido ficar o meio intracelular e quanto mais lactato for produzido, mais lactato tende a se associar aos prótons (H^+) produzidos pela hidrólise de ATPs durante a contração muscular. Assim, durante a realização do esforço em que prótons são produzidos, certa quantidade está se associando ao lactato formado, podendo funcionar como um "tampão auxiliar". Esta reação tende a contribuir na regulação do pH celular removendo um próton do meio (JUEL, 2008). Nesse mesmo raciocínio, autor como Robergs (2001) demonstrou detalhadamente em seu trabalho, que a estequiometria dos íons hidrogênio na via glicolítica é somada à reação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Ao final das reações a mesma concentração de íons hidrogênio liberada é reutilizada, com saldo zero sem alteração do pH (Quadro 1). Além disso, neste mesmo trabalho Robergs (2001) postula que a acidose é causada pela hidrólise do ATP em consequência da alta atividade das ATPases (como a própria miosina). O aumento no número de trabalhos experimentais com modelos de hiperlactatemia mostrando que esta não causava prejuízos às funções fisiológicas gerou diversas investigações até recentemente (ROBERGS; GHIASVAND & PARKER, 2004; ALLEN & WESTERBLAD, 2004; CAIRNS, 2006; WAN *et al*., 2017; BANGSBO & HOSTRUP, 2019; BROOKS, 2020)

Reações	Íons Hidrogênio (H^+)
Glicose + ATP → Glicose 6-Fosfato + ADP + H^+	+1
Frutose 6-Fosfato + ATP → Frutose 1,6-bisfosfato + ADP + H^+	+1
Gliceraldeído 3-Fosfato + Pi + NAD^+ → 1,3 Bisfosfoglicerato + NADH + H^+ (x2)	+2
Fosfoenolpiruvato + ADP + H^+ → Piruvato + ATP (x2)	-2
Piruvato + NADH + H^+ → Lactato + NAD^+ (x2)	-2
Saldo	0

Quadro 1 - Reações da glicólise que envolvem doação ou recepção de íons hidrogênio (adaptado de Robergs, 2001).

Supondo que a alterações no pH celular tenha um efeito sobre a fadiga muscular, alguns estudos mostraram que treinamento de *endurance* pode melhorar o sistema de *buffering* nas células e, portanto, resistir às mudanças de pH intramuscular (BANGSBO *et al*., 1995; ROBERGS, 2001). Esses resultados geraram pesquisas posteriores utilizando modelos de exercícios e estimulação elétrica muscular. Foram verificadas que as alterações no pH não mostravam consistentemente correlação com a fadiga muscular, nos casos em que a estimulação mioelétrica ou exercício era cessada, a força muscular recuperava muito mais rapidamente que o pH (ALLEN, LAMB & WESTERBLAD, 2008).

Em um estudo utilizando 11 ciclistas foi observado que o acúmulo de lactato sanguíneo não estava relacionado com o tempo de exaustão. Esses achados foram confirmados utilizando o cicloergômetro com diferentes cargas constantes (40%, 60%, 80% ou 100% VO_2pico) (SALAM, MARCORA & HOPKER, 2018). Além disso, estudos atentaram para outros fatores envolvidos, como a depleção do glicogênio muscular em exercícios de alta intensidade (WESTERBLAD, 2016; BLACKWOOD, HANYA & KATZ, 2018).

O exercício é um poderoso estimulante do sistema endócrino. A resposta hormonal à realização do exercício é dependente de vários fatores, incluindo intensidade, duração, modo e nível de treinamento (HACKNEY & LANE, 2015). Assim, outra possibilidade de avaliação do estresse provocado pelo exercício é a mensuração do cortisol sanguíneo em condições de repouso ou de exercício. Por exemplo, baseado na premissa de que o sobretreinamento é um desequilíbrio entre o treinamento e recuperação, tem-se hipotetizado que um desequilíbrio neuroendócrino seja uma das principais razões. Pois durante um intenso treinamento de *endurance*, a maioria dos resultados dão evidências de um incremento da secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise, gerando um incremento dos níveis de cortisol de repouso, o que é geralmente verificado no sobretreinamento (CADEGIANI *et al*., 2020) e nas respostas agudas ao exercício (TSUDA *et al*., 2020).

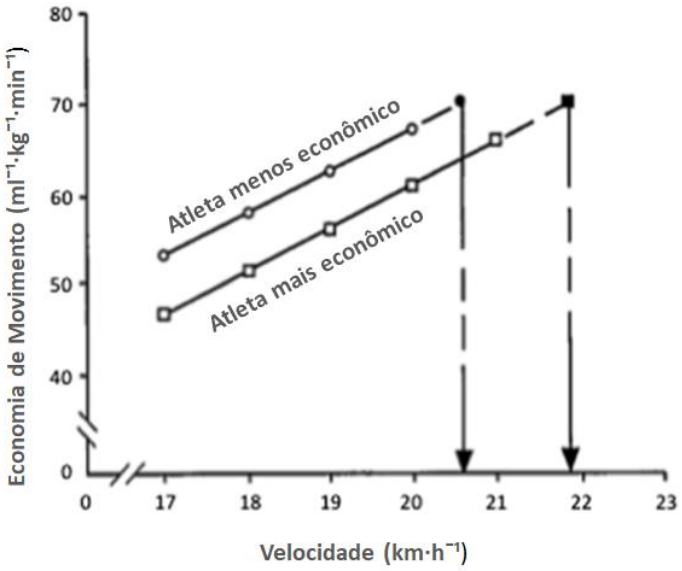
Avaliar as respostas agudas na realização do exercício por meio da concentração sanguínea de cortisol é uma das maneiras de verificar o nível de fadiga (resposta fisiológica e psicológica) no SNC (ALVES *et al*., 2020). Além disso, Tsuda *et al* (2020) observaram que a elevação na concentração sanguínea de cortisol durante e após a realização do exercício pode resultar no aumento na concentração sanguínea de glicose e ácidos graxos. Consistentemente, foi demonstrado que uma intensidade de exercício superior a 60% do consumo máximo de oxigênio (VO_2máx) induz a elevação na concentração de cortisol acima dos níveis de repouso. Uma duração mínima de 10 a 15 minutos na realização de exercício pode resultar em níveis aumentados de cortisol com concentrações máximas entre 20 a 30 minutos após a cessação do exercício (KIRSCHBAUM & HELLHAMMER, 1994). Os autores Herman *et al* (2003) associam esses resultados à maior

exigência do cortex pré-frontal que possui projeções neurais no hipotálamo, provocando maior solicitação do eixo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Dessa maneira parece razoável pensar que a mensuração dos níveis de lactato e cortisol pode revelar um indicativo da exigência do exercício nas respostas metabólicas.

2.3.4. CONSUMO DE OXIGÊNIO E A ECONOMIA DE MOVIMENTO

Pesquisas envolvendo fatores limitantes para a melhora da performance em exercícios de *endurance* é um dos principais focos de estudiosos em fisiologia do exercício. Tem sido relatado que níveis mais altos de consumo máximo de oxigênio (VO_2max) estão correlacionados com o desempenho em exercícios de *endurance* e maior tolerância à fadiga (BURGOMASTER *et al*., 2005; DAVID & EDWARD, 2000). Entretanto, o VO_2max é limitado por quatro mecanismos possíveis: débito cardíaco, capacidade de transporte de oxigênio pelo sistema cardiovascular, capacidade de perfusão, uso de oxigênio pelas células musculares e capacidade de difusão pulmonar (WAGNER, 2015). A partir desses fatores em particular, a taxa de oxigênio usada pelas células musculares durante a realização do exercício de *endurance* (ciclismo ou corrida) dado uma determinada velocidade de execução, é relatado como um forte determinante na identificação da fadiga muscular.

Muitas vezes percebida como um conceito simples, a economia de movimento é na verdade uma medida multifatorial que reflete o funcionamento combinado dos sistemas metabólico, cardiopulmonar, biomecânico e neuromuscular que mostra a eficiência em gerar trabalho. A eficiência metabólica refere-se à utilização da energia disponível para facilitar a melhora da performance, enquanto a eficiência cardiopulmonar se refere a uma redução na produção de trabalho (menor consumo de O_2 em uma dada velocidade) para os processos relacionados ao transporte e utilização de oxigênio (figura 4). Por fim, as características neuromusculares e biomecânicas referem-se à interação entre os sistemas neurais e musculoesqueléticos e sua capacidade de converter em melhora da potência de saída e/ou velocidade (BARNES & KILDING, 2015).



Fonte: Adaptado de Barnes & Kilding (2015)

Figura 4 - Perfil na economia de movimento de dois atletas com os mesmos níveis de VO_2máx.

No ciclismo a economia de movimento é traduzida em eficiência de trabalho e economia no ciclismo. Ciclistas amadores e bem treinados apresentam valores de VO_2máx semelhantes aos dos profissionais (LUCÍA *et al*., 1998), desde que seja alcançado um nível mínimo de VO_2máx (por exemplo, > 65 $ml^{-1}.kg^{-1}.min^{-1}$). A economia no ciclismo e a eficiência de trabalho podem ser especialmente importantes na identificação da fadiga. LUCÍA *et al* (2002) observaram que a taxa de eficiência de trabalho (-0.65; p = 0.03) e a economia no ciclismo (-0.64; p = 0.03) em ciclistas profissionais de nível mundial, estavam inversamente correlacionados com a taxa de VO_2máx. A esse respeito, foi demonstrado que, em ciclistas profissionais, o aumento do consumo de oxigênio (VO_2) verificado por um teste incremental, era menor utilizando cargas de trabalho moderadas à alta até atingir a potência máxima. LUCÍA *et al* (2002) sugerem ainda que o aumento na taxa de eficiência de trabalho e na economia no ciclismo pode compensar um VO_2máx relativamente baixo em ciclistas. Nesse sentido, geralmente é aceito que a eficiência de trabalho no ciclismo é um determinante essencial na melhora da performance. Pelo menos em parte, a melhora na eficiência de trabalho está relacionada à limiares ventilatórios mais altos (limiar anaeróbico e ponto de compensação respiratória), em vez de ganhos no VO_2máx.

2.4. CAFEÍNA DE FONTES ALIMENTARES E ALTERNATIVAS

O café representa um dos principais produtos agrícolas no Brasil, com uma produção total de 59.9 milhões de sacas de café em 2018, conforme estimado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (BRASIL, 2018). A cafeína foi isolada pela primeira vez por Friedlieb Ferdinand Runge em 1819 (ABIC, 2011). A cafeína no Brasil é classificada e designada como

alimento para atletas, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010). A cafeína é um alcalóide conhecida como 1,3,7-trimetilxantina e tem a fórmula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$, uma das substâncias mais investigada no café (ABIC, 2011), além de está presente em várias outras fontes alimentares (chá, bebidas de cacau, barras de chocolate e refrigerantes) (BARONE & ROBERTS, 1996). Na tabela 1 são mostradas concentrações de cafeína.

Tabela 1 - Concentração de cafeína em fontes alimentares e não alimentares

Substância	Quantidade de Cafeína	Quantidade em 100 ml
Café coado (xícara americana)	100 mg/180 ml	55,5 mg
Cafezinho ou dose no Brasil	27,7 mg/50 ml	55,5 mg
Expresso	40 mg/30 ml	133,3 mg
Café instantâneo	70 mg/80 ml	85 mg
Café descafeinado	4 mg/180 ml	2,2 mg
Chá coado	40 mg/180 ml	22,2 mg
Chá instantâneo	30 mg/180 ml	16,6 mg
Refrigerante com cafeína	40 mg/360 ml	11,1 mg
Chocolate quente	7 mg/180 ml	3,8 mg
Leite achocolatado	4 mg/180 ml	2,2 mg
Chocolate amargo	30 mg/45 ml	66,6 mg
Chocolate ao leite	20 mg/45 ml	44,4 mg
Analgésico contendo cafeína	32-65 mg/comprimido	2 mg
Estimulantes	100-200 mg/comprimido	2 mg
Suplementos	100 mg/comprimido	2 mg
Energéticos	80 mg/250 ml	32 mg

Fonte: Adaptado de Fredholm *et al* (1999).

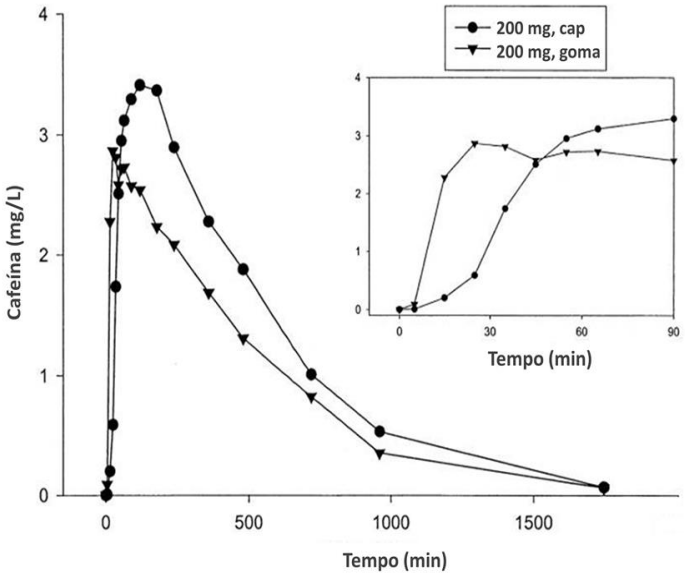
Em uma pesquisa utilizando 600 brasileiros na faixa etária entre 9 a 80 anos de idade, verificou-se um consumo regular de refrigerantes (81%), café (75%), chocolates (65%) e chás (35%), onde o consumo total de cafeína desses produtos variou entre 0.19 a 2.74 mg/kg (CAMARGO, TOLEDO & FARAH, 1999). Corroborando com esses achados, foram verificadas em um estudo recente que os refrigerantes e o café são as principais bebidas mais vendidas e consumidas pelos brasileiros (REYES & CORNELIS, 2018).

Os achados de um estudo conduzido por Farah *et al* (2006), indicaram por meio da análise química dos grãos verdes do café brasileiro, níveis de cafeína de boa qualidade. Indubitavelmente, o café representa fonte primária de cafeína para um indivíduo adulto, sendo consumido em diferentes níveis e segmentos da população mundial (MANDEL, 2002). Por exemplo, o consumo de cafeína pode atingir 210 a 238 mg/dia no EUA, no Canadá mais de 400 mg/dia, na Suécia e Finlândia, 80 a 100% da ingestão de cafeína vem apenas do café (BARONE & ROBERTS, 1996) e no Brasil o consumo médio é de 115,17 mg/dia e as principais fontes alimentares são café (63,1%), café com

leite (24,9%), refrigerantes à base de cola (3,6%) e erva-mate (1,9%) (SARTORI & SILVA, 2016). Além do valor nutricional (pela presença do ácido nicotínico) do café, destacam-se também sua correlação positiva com a atividade antioxidante, podendo alguns de seus efeitos serem atribuídos à presença de trigonelina, ácidos clorogênicos e cafeína (HIGDON & FREI, 2006). Esse alto consumo pela população mundial tem despertado o interesse de vários pesquisadores pelas propriedades biológicas relacionadas à saúde e performance em exercícios físicos (RIBEIRO *et al*., 2017; GRGIC *et al*., 2018). De fato, os achados de uma revisão sobre café e exercício de *endurance*, relatou que a ingestão de café que fornece de 3 a 8,1 mg/kg de cafeína pode melhorar a performance em provas de contrarrelógio (HIGGINS *et al*., 2016).

Outras formas de cafeína comumente consumidas por atletas têm despertado interesse de diversos pesquisadores, enquanto a farmacocinética (TEEKACHUNHATEAN *et al*., 2013) e seus efeitos ergogênicos comparados aos de fontes alimentares (HODGSON *et al*., 2013; RICHARDSON & CLARKE, 2016). Esse interesse surgiu devido às diferenças observadas na taxa de velocidade de absorção e biodisponibilidade da cafeína aos tecidos (LAIZURE *et al*., 2017).

O consumo de cafeína por meio de bebidas energéticas, goma de mascar, spray nasal, gel de cafeína e de cápsulas tornou-se mais comum utilizado por atletas de diversas modalidades (GUEST *et al*., 2021). Nas últimas duas décadas, numerosos estudos foram reunidos em uma revisão sistemática que examinaram os potenciais efeitos ergogênicos das bebidas energéticas com cafeína na performance atlética (SOUZA *et al*., 2017). No entanto, a maioria desses estudos não avaliou a taxa de absorção e os efeitos ergogênicos dos ingredientes individuais. Dessa maneira, torna-se impossível avaliar a importância relativa de cada ingrediente para quaisquer efeitos ergogênicos observados. Achados de várias investigações vêm sugerindo que a administração de cafeína por meio da goma de mascar pode acelerar a taxa de absorção de cafeína, isso é explicado pela maior vascularização da cavidade bucal (SADEK *et al*., 2017; GUEST *et al*., 2021). Portanto, a utilização da goma de mascar pode aumentar a taxa de absorção de cafeína comparada às outras formas de administração (cápsulas) (KAMIMORI *et al*., 2002) (figura 5).



Fonte: Adaptado de Kamimori *et al*. (2002)

Figura 5 - Concentração plasmática de cafeína em 12 voluntários saudáveis do sexo masculino administrada por meio de uma dose de 200 mg de cafeína em cápsula ou goma.

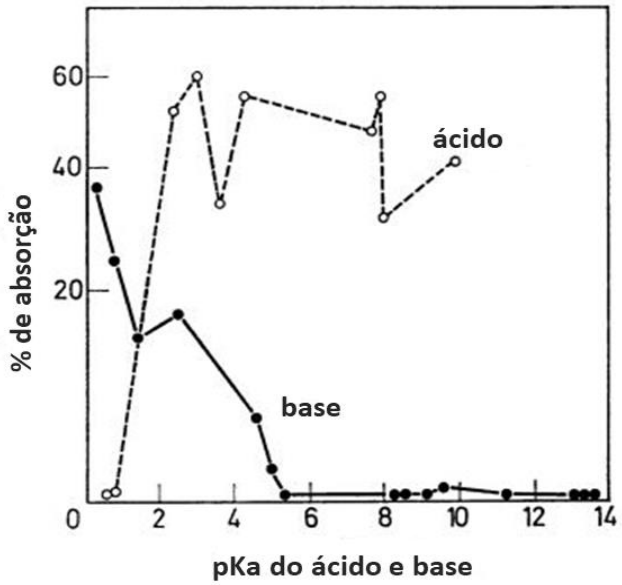
Os géis com cafeína são as principais fontes de cafeína dos atletas durante o treinamento e competição (GUEST *et al*., 2021). De fato, isso se torna verdadeiro pela facilidade de transporte durante a realização de provas longas de *endurance*. Entretanto, os estudos disponíveis até o período atual não realizaram quantificação de cafeína plasmática, embora os achados apontem melhoras na performance semelhantes à ingestão de cápsulas de cafeína e de café (COOPER *et al*., 2014; SCOTT *et al*., 2015). Alternativamente à administração oral, o uso de *spray* nasal de cafeína vem sendo utilizado por diversos atletas que apresentam desconforto gastrointestinal. A cafeína poderia ser potencialmente transportada diretamente da cavidade nasal ao SNC e melhorar a atividade neuromuscular (PHUKAN *et al*., 2016). Entretanto, não foi observado melhora significativa no tempo de reação neuromotor de 10 sujeitos saudáveis, apesar do aumento da atividade das estruturas do SNC (córtex cingulado, insular e sensório-motor) (DE PAUW *et al*., 2017).

2.5. TAXA DE ABSORÇÃO DA CAFEÍNA

A cafeína quando administrada pela via oral, é absorvida completa e rapidamente no trato gastrointestinal e distribuída para o organismo pela corrente sanguínea, atingindo todos os tecidos, pois devido a sua propriedade hidrofóbica permite a sua passagem através de todas as membranas biológicas, inclusive a barreira cerebral (GOLDSTEIN *et al*., 2010). Após a ingestão oral, a cafeína

se dilui no fluido corporal total e atinge um volume de distribuição entre 0.5-1.3 $L \cdot kg^{-1}$ (KAMIMORI *et al*., 2002), e a sua ligação a proteínas plasmáticas, principalmente à albumina, é de 10% a 35%. Em ratos, a concentração de cafeína nos compartimentos do líquido extracelular de vários tecidos (fígado, tecido adiposo, músculo e cérebro) segue em curso de tempo semelhante ao observado no plasma, enquanto no homem a distribuição dos níveis de cafeína no fluido extracelular do tecido adiposo não está intimamente correlacionada com as concentrações plasmáticas (STAHLE, ARNER & UNGERSTEDT, 1992). Isso pode ser explicado devido às diferenças no conteúdo de albumina entre dois compartimentos de fluidos (BONATI *et al*., 1982). Não há barreira hematoencefálica à cafeína no feto (TANAKA *et al*., 1984), e a relação sangue-plasma é reduzida (MCCALL, MILLINGTON & WURTMAN, 1982), indicando limitação a ligação às proteínas plasmáticas. Em recém-nascidos, a concentração de cafeína é semelhante entre o plasma e o líquido cefalorraquidiano (SOMANI, KHANNA & BADA, 1980). As concentrações de cafeína na saliva, que são considerados um índice confiável atingem percentuais entre 65 a 85% das concentrações plasmáticas de cafeína (KHANNA, BADA & SOMANI, 1980).

A taxa de absorção pode ser influenciada pelo pH gastrointestinal (ou o pK_a da solução) (figura 6) (BONATI *et al*., 1982). O intestino delgado apresenta a maior área de superfície gastrointestinal para absorção da molécula de cafeína; entretanto, seu meio varia. No duodeno o pH é de 4 a 5, mas o pH intraluminal se torna progressivamente mais alcalino ao longo do canal alimentar (p. ex., o pH do íleo inferior é cerca de 8). A flora gastrointestinal pode aumentar a absorção da cafeína se o indivíduo fizer uso constante de inibidores da bomba de prótons, elevando a biodisponibilidade se o pH gastrointestinal aumentar (SCHANKER *et al*., 1957; MORGAN, STULTS & ZABIK, 1982; LIGUORI, HUGHES & GRASS, 1997).



Fonte: Adaptado de Schanker *et al* (1957)

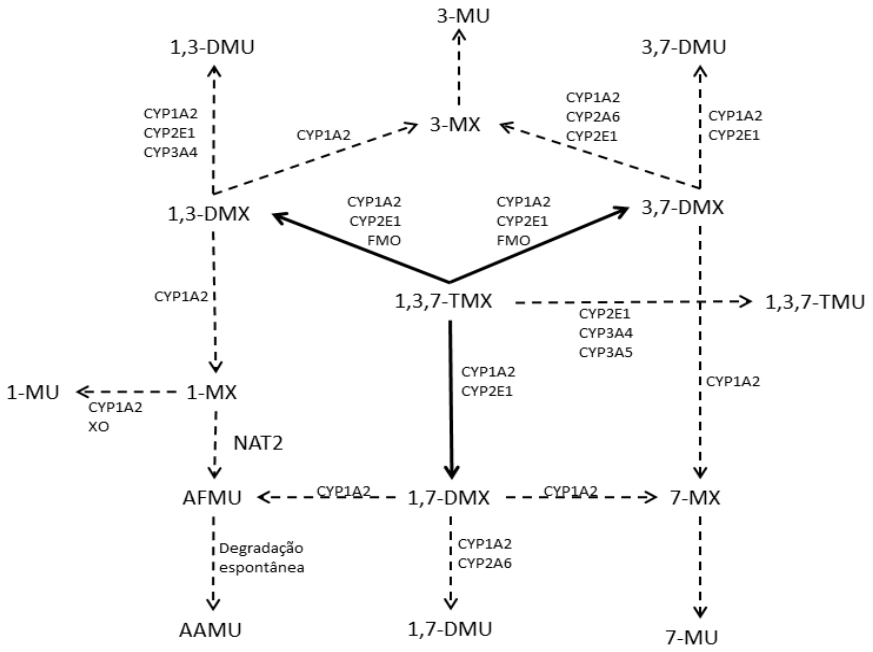
Figura 6 - Comparação da absorção gástrica com diferentes valores de pKa.

A concentração plasmática máxima de cafeína é atingida entre 15 a 120 min após a ingestão oral em humanos, e é igual a 8 a 10 µg/ml para doses de 5 a 8 mg/kg (BONATI *et al*., 1985; RIBEIRO *et al*., 2016). A ingestão de uma única xícara de café fornece uma dose de 0.4 a 2.5 mg/kg e estima-se uma concentração sanguínea de 0.25 a 2 µg/ml. A cinética de eliminação da cafeína é do tipo *Michaelis-Menten*, não linear em doses altas, por saturação enzimática (DALY, 2007). A cafeína é prontamente reabsorvida pelos túbulos renais e uma vez filtrada pelos glomérulos, apenas uma pequena porcentagem é excretada inalterada na urina. Sua aparência limitada na urina indica que o metabolismo da cafeína é o fator limitante na sua depuração plasmática (ARNAUD, 1987). Em humanos saudáveis, a ingestão repetida de cafeína não altera sua absorção ou metabolismo (DALY, 2007; MARTINS *et al*., 2020).

Para doses inferiores a 10 mg/kg, a meia-vida de cafeína pode variar entre 0.7 a 1.2 h em ratos e camundongos, 3 a 5 h em macaco (BONATI *et al*., 1985) e 2.5 a 4.5 h em humanos (ARNAUD, 1987). Não há diferenças na meia-vida de cafeína sanguínea entre jovens e idosos (BLANCHARD & SAWERS, 1983). Por outro lado, a meia-vida da cafeína sanguínea aumenta durante o período neonatal devido a menor atividade do citocromo P-450 (ARANDA *et al*., 1977). Nos homens adultos, a meia-vida da cafeína é reduzida em 30 a 50% nos fumantes em comparação aos não-fumantes (MURPHY *et al*., 1988), enquanto que é aproximadamente o dobro em mulheres que usam contraceptivos orais (PATWARDHAN *et al*., 1980).

2.6. METABOLIZAÇÃO DA CAFEÍNA

A cafeína é metabolizada pelo sistema de enzimas no fígado do complexo citocromo P450 (CYP450), principalmente a enzima CYP1A2 que é codificada pelo gene CYP1A2 (FREDHOLM *et al*., 1999). Como a maioria dos xenobióticos, o sistema das enzimas microssomais hepáticas metaboliza a cafeína para produzir mais de 25 compostos derivados (SOMANI & GUPTA, 1988). A maioria dessas importantes biotransformações são a N3-desmetilação para a paraxantina, N1-desmetilação a teobromina e N7-desmetilação a teofilina; estes são responsáveis por aproximadamente 80%, 11% e 5%, respectivamente, do metabolismo da cafeína in vivo (LELO *et al*., 1986). Uma vez formados, estes compostos sofrem metabolização extensa para formar uma gama de outros metabólitos. Os restantes (~4%) são atribuídos a biotransformações ao ácido trimetilúrico e trimetiluracil, bem como a excreção de cafeína pelos túbulos renais sem sofrer alteração (LELO *et al*., 1986). Um esquema simplificado do metabolismo de cafeína é mostrado na figura 7.



Setas inteiras e tracejadas representam a via principal e secundária, respectivamente. **1,3,7-TMX**, 1,3,7-metilxantina (cafeína); **1,7-DMX**, 1,7-dimetilxantina (paraxantina); **3,7-DMX**, 3,7-dimetilxantina (teobromina); **1,3-DMX**, 1,3-dimetilxantina (teofilina); **1-MX**, 1-metilxantina; **3-MX**, 3-metilxantina**; 7-MX**, 7-metilxantina; **1,3,7-TMU**, 1,3,7-ácido trimetilúrico; **1,3-DMU**, 1,3-ácido dimetilúrico; **1,7-DMU,** 1,7-ácido dimetilúrico; **3,7-DMU,** 3,7-ácido dimetilúrico; **1-MU,** 1-ácido metilúrico; **3-MU,** 3-ácido metilúrico; **7-MU,** 7-ácido metilúrico; **AFMU**, 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil; **AAMU**, 5-acetilamino-6-amino-3-metiluracil; **CYP**, citocromo P450 (vários subtipos); **NAT2**, N-acetiltransferase 2; **XO**, **xantina oxidase**; **FMO**, flavina monooxigenase.

Fonte: Adaptado de Beaumont (2017)

Figura 7 - Esquema simplificado do metabolismo de cafeína *in vivo*.

Numerosos estudos têm investigado o efeito da cafeína sobre a performance em exercício, mas existe considerável variabilidade interindividual na resposta em vários protocolos de testagem quando comparado ao placebo (GRAHAM & SPRIET, 1991; GANIO *et al*., 2009). Essas diferenças interindividuais parecem ser devidas em parte à variação nos genes CYP1A2 (rs762551) e ADORA2A (rs5751876) (gene que codifica o receptor de adenosina A_{2A} nos tecidos), que estão associados ao metabolismo e a sensibilidade à cafeína (YANG, PALMER & DE WIT, 2010; GUEST *et al*., 2021). O polimorfismo rs762551 163A>C do gene CYP1A2 demonstrou alterar a atividade da enzima CYP1A2 (DJORDJEVIC *et al*., 2008) e foi utilizado para identificar e classificar indivíduos como metabolizadores "rápidos" ou "lentos" de cafeína. Indivíduos que são considerados metabolizadores lentos, ou seja, com o genótipo AC ou CC, apresentam risco elevado de infarto do miocárdio, hipertensão, pressão arterial elevada (CORNELIS *et al*., 2006) e pré-diabetes (PALATINI *et al*., 2015), enquanto aqueles com o genótipo AA (metabolizadores rápidos) parecem não apresentar esses riscos.

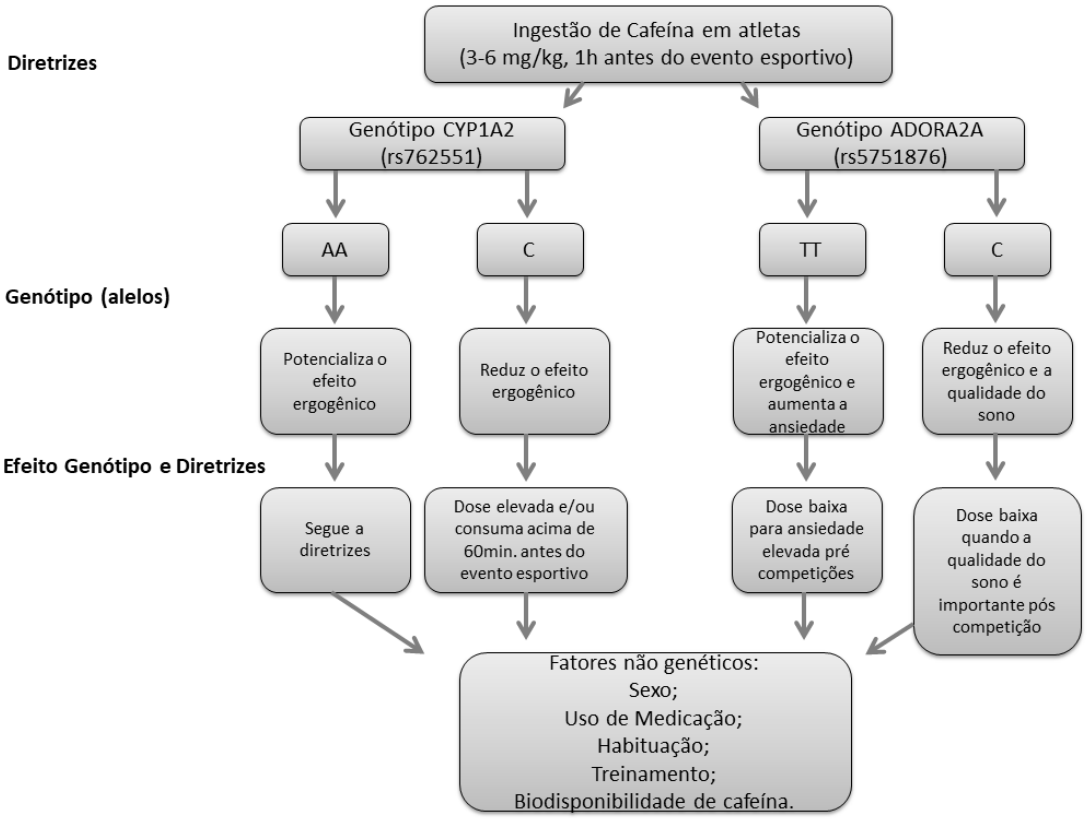
O maior estudo de cafeína e exercício realizado até hoje (GUEST *et al*., 2018) examinou os seus efeitos e do genótipo CYP1A2 em 101 ciclistas masculinos na realização do contrarrelógio (10

km) utilizando diferentes doses de cafeína: Placebo, 2 mg/kg (dose baixa) e 4 mg/kg (dose moderada). Segundo os autores foi observado uma melhora de 3% no tempo utilizando uma dose moderada (4 mg/kg) em todos os indivíduos, o que é consistente com estudos prévios utilizando o mesmo protocolo de exercício (DESBROW *et al*., 2012) e com doses similares (RIBEIRO *et al*., 2017). No entanto, houve uma interação genética significativa em que essa melhora na performance foi potencializada em ambas as doses de cafeína (2 mg/kg e 4 mg/kg), mas apenas aqueles com genótipos AA que são "metabolizadores rápidos". Foi observada uma melhora nesse grupo (AA) de 6,8% no tempo realizado no contrarrelógio. Entre aqueles com o genótipo CC e AC não foi observado melhoras na performance (GUEST *et al*., 2018). Parece que esse efeito também é observado em contrarrelógio com distância maior, por exemplo, Womack *et al* (2012) relataram uma diminuição no tempo de 3,8 minutos na realização do contrarrelógio de 40 km no grupo de ciclistas com o genótipo AA comparado ao genótipo CC e AC. Os autores especularam que o rápido acúmulo de metabólitos da cafeína pode ter sido responsável pela potencialização do efeito ergogênico positivo nos ciclistas homozigotos AA. Com base nesse argumento, a paraxantina e a teofilina apresentam afinidades de ligação aos receptores de adenosina (DALY, BUTTS-LAMB & PADGETT, 1983). Assim, é possível que os metabolizadores rápidos tenham produzido em alta velocidade a paraxantina e/ou a teofilina e, assim, melhorando o efeito ergogênico da cafeína. À medida que o exercício progride, os metabólitos podem anular os efeitos negativos (redução de fluxo sanguíneo aos músculos) dos estágios iniciais do exercício (transição do repouso para o exercício) (GUEST *et al*., 2018).

Alguns estudos não observaram o impacto do gene CYP1A2 que envolviam a ingestão de cafeína e performance no exercício de *endurance* (ALGRAIN *et al*., 2016; SALINERO *et al*., 2017) e outro relatou benefícios apenas em metabolizadores lentos (PATAKY *et al*., 2016). Os autores Pataky *et al*., (2016) propõem várias razões que podem explicar essas divergências nos resultados, incluindo amostras menores (<20 indivíduos) que podem revelar números muito baixos de indivíduos ou nenhum com o genótipo CC e o tipo de protocolo aplicado no ciclismo (distância curta ou longa; modelo de contrarrelógio ou modelo de carga constante) para avaliar a performance. Os autores ainda alertam que embora os resultados dos estudos prévios mostram um papel importante do genótipo CYP1A2 em influenciar a resposta ergogênica da cafeína em atletas, deve-se ter cuidado ao extrapolar esses achados apenas levando em consideração o polimorfismo desse gene.

O gene ADORA2A é outro modificador genético que pode influenciar os efeitos ergogênicos da cafeína na performance. O receptor de adenosina A_{2A}, codificado pelo gene ADORA2A possui afinidade pela molécula de cafeína (agindo como antagonista) e adenosina (nucleotídeo endógeno composto de uma molécula de adenina ligada por meio de uma ligação β-

N9-glicosídica / 6-amino-9-β-d-ribofuranosil-9-H-purina) (ELTZSCHIG, 2009). O receptor de A_{2A} tem se mostrado importante na regulação da demanda miocárdica de oxigênio (HIGGINS & BABU, 2013; NAMDAR *et al*., 2009). As mudanças resultantes nos níveis de adenosina impactam os principais aspectos da função cardiovascular, incluindo o débito cardíaco, controle autonômico e perfusão coronária (RIVKEES & WENDLER, 2012). A atividade da ADORA2A pode ser afetada por polimorfismos genéticos *in vivo* (MARTINS *et al*., 2020; GUEST *et al*., 2021). Portanto, é razoável supor que o polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) no gene ADORA2A possa influenciar a atividade dos receptores de adenosina A_{2A} e afetar ainda mais as respostas do uso de cafeína na regulação da função cardíaca ao exercício. Outra possibilidade é que o receptor A_{2A} também é expresso no cérebro, onde regula a liberação de glutamato e dopamina (RIVKEES & WENDLER, 2012; GUEST *et al*., 2018). A dopamina tem sido associada à motivação dos atletas em aumentar a taxa de trabalho total no exercício, e isso pode ser um mecanismo pelo qual o uso da cafeína potencializa essa resposta. Por exemplo, os autores Loy *et al* (2015) observaram um aumento na taxa de trabalho total realizado por 6 mulheres portadoras do genótipo do alelo T (homozigoto) no contrarrelógio de 10-minutos em um cicloergômetro, utilizando 5 mg/kg de cafeína comparado ao placebo. Entretanto, não foi observado melhora nas mulheres portadoras do alelo C (CT / CC). Os autores acrescentam ainda que o resultado do estudo não pode ser generalizado, pois a amostra com poucos indivíduos foram recrutados. Observa-se que há uma variação genética substancial importante entre os indivíduos quando se trata na potencialização do efeito ergogênico da cafeína para a melhora da performance no esporte. O conhecimento dessa variação pode levar ao desenvolvimento de diretrizes na manipulação do uso de cafeína em atletas por parte dos nutricionistas e técnicos envolvidos com o treinamento (PICKERING & KIELY, 2018).



Fonte: Adaptado de Pickering & Kiely (2018)

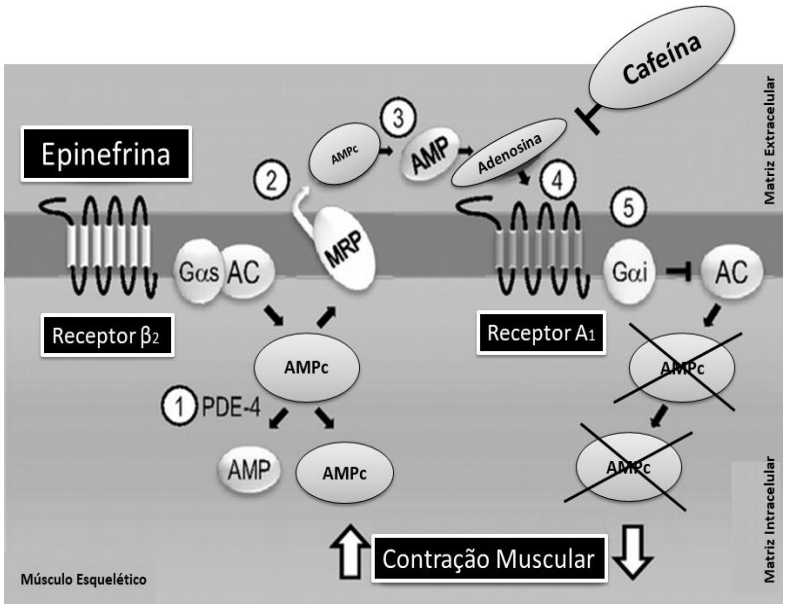
Figura 8 - Fatores genéticos e não genéticos que influenciam na decisão em manipular a cafeína em atletas.

Na figura 8 são apresentadas diversas possibilidades de estratégias na manipulação ao uso de cafeína em atletas. Adicionalmente às essas estratégias, faz necessário o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos entre a cafeína (e seus metabólitos) e os diferentes receptores de adenosina expressos nos tecidos envolvidos na performance nos exercícios.

2.7. MECANISMO DE AÇÃO DA CAFEÍNA

Vários mecanismos de ação foram propostos para explicar os efeitos ergogênicos da cafeína. O primeiro foi investigar a influência da cafeína na propriedade da contração músculo esquelética, o que foi demonstrado há mais de um século (VELEY & WALLER, 1910). Nomeadamente, a cafeína mostrou influenciar a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, provavelmente por meio da modulação do receptor de rianodina (GUEST *et al*., 2021). Outra possibilidade é a potencialização do o uso da cafeína (exercendo antagonismo aos receptores de adenosina muscular) no aumento do tempo de contração muscular, modulada entre a ação da epinefrina aos receptores β_2-adrenérgicos e a adenosina (figura 9).

Esse efeito pode desencadear o aumento na meia vida das enzimas (glicogênio fosforilase-cinase *a* e a glicogênio fosforilase *b* responsáveis pela degradação do glicogênio muscular no exercício exaustivo, tendo como resposta aguda a elevação na concentração sanguínea de lactato sanguíneo (RIBEIRO *et al*., 2016), proporcionando uma taxa maior de tolerância (ROBERGS, 2001). No entanto, concentrações elevadas são necessárias para influenciar esse efeito, o que se mostraria tóxico em humanos (FREDHOLM *et al*., 1999). Após a ingestão oral de 3-9 mg/ kg a cafeína plasmática atinge 10-70 uM (GRAHAM & SPRIET, 1995), níveis que são muito baixos para se elevar o tempo de contração quando aplicado diretamente aos músculos em humanos (JAMES, WILSON & ASKEW, 2004). Apesar disso, a suplementação com 6 mg/kg de cafeína vem sendo utilizada por vários pesquisadores (CONWAY, ORR & STANNARD, 2003; RIBEIRO *et al*., 2016; RIBEIRO *et al*., 2017) e tem melhorado a força isométrica e o tempo de contração até a instalação da fadiga muscular (PLASKETT & CAFARELLI, 2011). Apesar desses resultados, os estudos não verificaram benefícios no comportamento das propriedades contráteis do músculo e, foi proposto que o mecanismo alternativo de ação à cafeína estaria envolvido.



Fonte: Adaptado de Duarte, Menezes-Rodrigues & Godinho (2012)

Figura 9 - Modulação da contração muscular entre a ação da epinefrina aos receptores β_2-adrenérgicos e a adenosina no músculo esquelético.

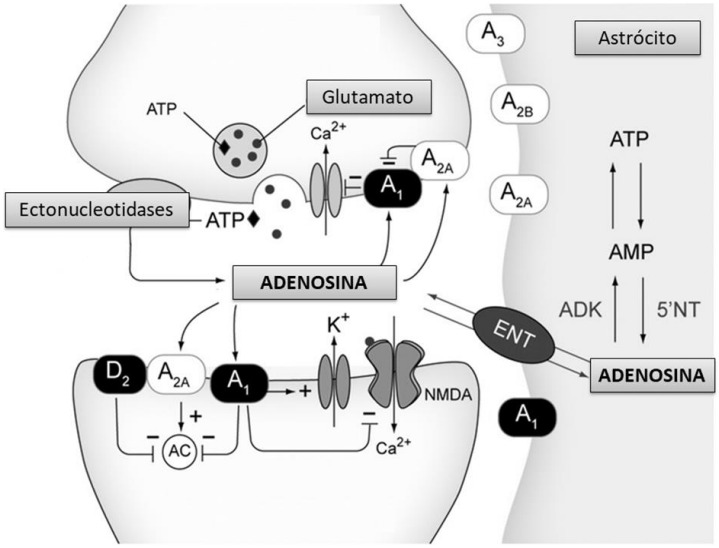
↑ efeito aumentado; ↓ efeito reduzido; Subunidade da proteína G heterotrimérica (Gαi); Subunidade da proteína G heterotrimérica (Gαs); Adenilato Cinase (AC); Adenosina monofosfato cíclico (AMPc); Adenosina monofosfato (AMP); Fosfodiesterase tipo-4 (PDE-4); Proteína de resistência transportadora de múltiplas drogas (MRP).

O mecanismo alternativo dessas respostas estaria associado à inibição da enzima fosfodiesterase (enzima que hidrolisa a ligação fosfodiéster das moléculas de segundo mensageiro, tais como a adenosina monofosfato cíclico - AMPc) pela cafeína e o do seu metabolito (teofilina). A

cafeína e a teofilina inibe a hidrólise da AMPc e aumenta lipólise por meio da ativação de hormônios (ex. epinefrina, cortisol etc...) (FAIN, POINTER & WARD, 1972). No entanto, para que ocorra essa resposta, doses suprafisiológicas de cafeína são necessárias (FREDHOLM *et al*., 1999). Nesta perspectiva, a lipólise e a oxidação dos ácidos graxos possuem um importante papel na manutenção da realização do exercício prolongado. No intuito de observar esse fenômeno fisiológico, os autores como Costill, Dalsky & Fink (1978) realizaram a suplementação com 330 mg de cafeína 60 min. antes do exercício e observaram um aumento na tempo na realização do exercício (até à exaustão) associado à uma taxa (avaliada pelo quociente respiratório - RER) elevada de oxidação de gordura com concentrações aumentadas de ácidos graxos e glicerol no plasma. Isso também foi observado por Ivy *et al* (1979) onde o aumento na produção de trabalho durante o exercício foi associado ao aumento da taxa (avaliada pelo quociente respiratório - RER) de oxidação de gordura, quando a cafeína foi administrada antes do exercício de ciclismo. Os resultados dos estudos prévios levaram alguns questionamentos sobre a validade desse método de análise. Observando essa preocupação Essig, Costill & Van Handel (1980) realizaram biópsias musculares antes e após 30 min. na realização de exercício submáximo utilizando a ingestão de cafeína e relataram uma associação entre o aumento significativo na oxidação de triacilglicerol muscular e a redução do RER.

O pressuposto dessas evidências é que o aumento da oxidação de gordura durante a realização de um exercício prolongado (aumento na concentração de ácidos graxos livres mediada por epinefrina no tecido adiposo) poderia poupar o glicogênio muscular, e assim potencializar a capacidade do atleta em alternar momentos de baixa e alta intensidade (*sprints*) em uma prova de *endurance* (ESSIG, COSTILL & VAN HANDEL, 1980). No entanto, evidências posteriores não confirmaram esses achados (GRAHAM *et al*., 2000; GRAHAM, 2001; GUEST *et al*., 2021). Além disso, um estudo de revisão concluiu que a ingestão de cafeína exerce nenhum efeito sobre o metabolismo do músculo esquelético durante exercício prolongado (GRAHAM *et al*., 2008).

Há fortes evidências de que a cafeína aumenta a performance em exercícios por meio de ações diretas ao SNC (GUEST *et al*., 2021). Especificamente, os efeitos ergogênicos da cafeína dependem de sua capacidade de antagonizar receptores de adenosina no cérebro (FERRÉ, 2010; FREDHOLM *et al*. 1999). A adenosina é uma purina nucleotídeo que modula a atividade neural (reduzindo). Existem duas formas principais de aumentar as fontes de adenosina: (a) desfosforilação da adenina trifosfato pelas enzimas adenosina kinase (ADK) e 5'-nucleotidase (5'NT) dentro dos neurônios (CASS, YOUNG & BALDWIN, 1998); (b) o ATP é co-lançado com glutamato que é rapidamente metabolizado pelas ectonucleotidases em gerar adenosina (BENARROCH, 2008) (figura 10).



Fonte: Adaptado de Benarroch (2008)

Figura 10 - Principais vias de sinalizações da adenosina no SNC de uma célula nervosa excitatória.

↑ efeito aumentado; ↓ efeito reduzido; + ativa; - inibe; Adenilato ciclase (AC); adenosina monofosfato (AMP); canais de cálcio pré-sináptico (Ca^{2+}); canais de potássio (K^{+}); receptor N-metil-D-aspartato (NMDA); receptor de dopamina (D_2); transportador nucleotídeo (ENT).

Nos dois mecanismos celulares, a concentração de adenosina é dependente da atividade do trabalho celular. Os efeitos fisiológicos exercidos pela adenosina são determinados pela presença de receptores. Até o momento, quatro receptores acoplados à proteína G foram clonados: A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3 (FREDHOLM *et al*., 2001; FREDHOLM *et al*., 2011). As concentrações basais de adenosina atuam preferencialmente nos subtipos A_1 e A_{2A}, enquanto doses suprafisiológicas são necessárias para ativar as isoformas A_{2B} e A_3 (FREDHOLM *et al*., 1999; JACOBSON, 1998). Os efeitos neurofisiológicos exercidos pelas baixas doses de cafeína são principalmente mediadas pelo bloqueio central dos receptores A_1 e A_{2A} (FREDHOLM *et al*., 1999). Isso foi demonstrado por Davis *et al* (2003) quando a cafeína foi administrada diretamente no cérebro de ratos com um agonista seletivo (5'-N-etilcarbodiimida adenosina-NECA) para os receptores A_1 e A_{2A}. O tempo até a exaustão (Cafeína: 119.05±12.28 min., Cafeína + NECA: 63.62±14.98 min) realizado na esteira ergométrica (velocidade de 20 m/min a 7.5% de inclinação) foi melhorado após o uso somente da cafeína comparado à administração da Cafeína + NECA. No entanto, estes autores não conseguiram dissociar a contribuição precisa do receptor A_1 e A_{2A}. Enquanto a isoforma A_1 está localizada em todo o cérebro, o receptor A_{2A} possui elevada expressão nas áreas inervadas pelos gânglios da base (dopamina) e desempenha um papel fundamental no controle dos movimentos voluntários (FREDHOLM *et al*., 1999). Embora os efeitos de doses moderadas de cafeína no comportamento motor sejam complexos, parece provável que o bloqueio dos receptores de adenosina A_1 e/ou A_{2A}, seja o principal local de ação molecular da cafeína no cérebro.

A isoforma A_1 está localizada em todo o cérebro, o receptor A_{2A} é expresso nas áreas inervadas no gânglio da base (dopamina), especialmente no corpo estriado (EL YACOUBI *et al*., 2000). Esta região do cérebro é a principal estrutura de entrada dos gânglios que desempenha papel fundamental no controle dos movimentos voluntários, recompensa e motivação (FREDHOLM *et al*., 1999). Foi observado em estudos utilizando animais *knockout* do receptor A_{2A} que os efeitos estimulantes da cafeína são atenuados (LINDSKOG *et al*., 2002; EL YACOUBI *et al*., 2000). Portanto, os efeitos ergogênicos da cafeína, pelo menos em parte, podem ser explicados pelo receptor A_{2A} do corpo estriado. Outra faceta para este mecanismo é a influência da cafeína no sistema intramolecular de efeito cruzado entre o heterômero dos receptores A_{2A}/D_2-dopamina do corpo estriado pós-sináptico. A modulação da adenosina e cafeína no receptor A_{2A} atenua e aumenta, respectivamente, a sinalização de dopamina via receptor D_2-dopamina (FERRÉ *et al*., 1992). A potencialização de sinalização do receptor de D_2-dopamina induzida pela cafeína resulta na desinibição dos neurônios motores superiores aumentando assim o acionamento do córtex motor central (FISONE, BORGKVIST & USIELLO, 2004). São mostradas na tabela 2 as diferenças na distribuição dos receptores nos tecidos, sinalização intracelular e as afinidades de ligação dos seus efetores (adenosina, cafeína, teofilina, teobromina e paraxantina).

Tabela 2 - Distribuição dos receptores de adenosina nos tecidos, sinalização intracelular e a afinidade de ligação dos efetores.

	Receptor: A_1	Receptor: A_{2A}	Receptor: A_{2B}	Receptor: A_3
Expressão Alta	Córtex cerebral; cerebelo; hipocampo; corno dorsal da medula; olhos; glândula renal; miocárdio (átrios).	Putâmen; núcleo accumbens; tubérculo olfatório; bulbos olfatórios; baço; timo; leucócitos; plaquetas.	Ceco; cólon; bexiga.	Testículo; mastócitos.
Expressão Intermediária	Outras regiões do cérebro; músculo esquelético; tecido adiposo; fígado; rim; glândulas salivares; esôfago; cólon; testículo.	Miocárdio; pulmão.	Hipotálamo; pulmão; olhos; mastócitos.	Cerebelo; hipocampo; pulmão; baço; fígado.
Expressão Baixa	Pulmão; pâncreas.	Outras regiões do cérebro.	Outras regiões do cérebro; tecido adiposo; glândula adrenal; rim; glândula pituitária.	Outras regiões do cérebro; miocárdio; intestino.
Efeito Celular (segundos mensageiros)	↓ AMPc ↑ IP_3 / DAG ↑ Araquidonato (PLA_2) ↑ Colina (PLD)	↑ AMPc ↑IP_3	↑ AMPc ↑IP_3/DAG (PLC)	↓ AMPc ↑IP_3/DAG (PLC)
Adenosina (EC_{50}, uM)	0.31	0.73	23.5	0.29
Cafeína (K_D, uM)	33.8	12.3	15.5	>100
Teofilina (K_i, nM)	6.770	1.710	9.070	22.300
Teobromina (K_i, nM)	105.000	>250.000	130.000	>100
Paraxantina (K_i, nM)	21.000	32.000	4.500	>100.00

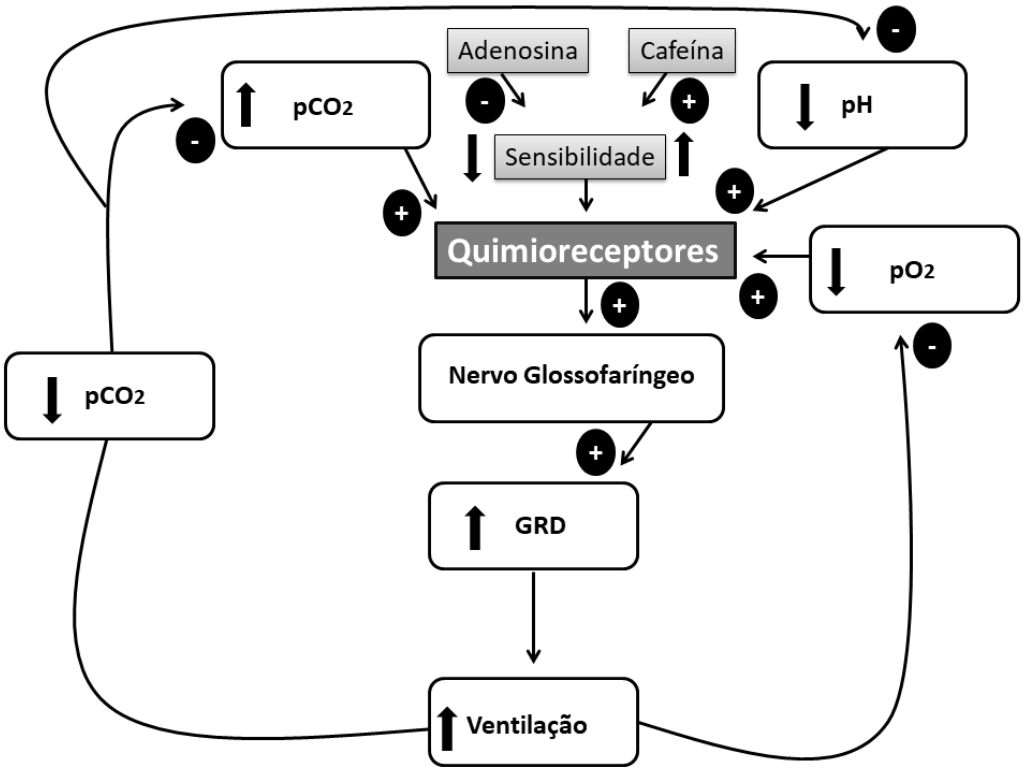
↑ efeito aumentado; ↓ efeito reduzido; AMPc - adenosina monofosfato cíclico; IP_3 - trifosfato de inositol; DAG - diacilglicerol; PLA_2 - fosfolipase A_2; PLD - fosfolipase; PLC - fosfolipase C; EC_{50}, uM - concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo; K_D, uM - constante de dissociação (afinidade); K_i, nM - constante de inibição por afinidade de ligação. Referências: Distribuição = Fredholm *et al* (1999); Fredholm *et al* (2001). Efeito celular: = Fisone, Borgkvist & Usiello (2004). Afinidade de ligação = Fredholm *et al* (2001).

Além dos efeitos do uso da cafeína no SNC demonstrarem fortes evidências na melhora do controle dos movimentos voluntários (aumento do tempo de contração muscular e de endurance) (FREDHOLM *et al*., 1999) e na menor percepção de esforço percebido durante a realização do exercício de *endurance* (ASTORINO & ROBERSON, 2010), muitos pesquisadores argumentam que os efeitos adicionais também são evidenciados pela estimulação do complexo medular ventilatório (D'URZO *et al*., 1990; CHAPMAN & MICKLEBOROUGH, 2009; GUEST *et al*., 2021). Clinicamente, a cafeína e a teofilina tem sido utilizada como estimulante ventilatório seguro e eficaz para o tratamento de apneia fetal e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (CHAPMAN & MICKLEBOROUGH, 2009).

Essa hipótese foi evidenciada pelos estudos realizados com feto e neonatal, mostrando que a adenosina deprime a respiração (BARROS & BRANCO, 2000; BISSONNETTE *et al*., 1990). Acreditava-se que a depressão respiratória fosse apenas mediada via ativação de receptores A_1. No entanto, estudos indicam que a ativação do receptor A_{2A} também pode estar envolvida, sugerindo que o efeito fisiológico é dependente do conteúdo de neurotransmissores de neurônios que expressam a adenosina nos receptores A_{2A} (ZAIDI *et al*., 2006).

A cafeína parece afetar a sensibilidade dos quimiorreceptores centrais e periféricos que controlam a ventilação. Os quimiorreceptores localizados na medula oblonga (local onde são expressos receptores A_{2A} de adenosina que modula a depressão respiratória induzida pela adenosina) respondem a mudanças nas concentrações de íon hidrogênio e dióxido de carbono no líquido cefalorraquidiano, alterando a taxa e a profundidade da respiração (ZAIDI *et al*., 2006). Os quimiorreceptores adicionais localizados nos corpos carotídeos e aórticos monitoram a concentração de dióxido de carbono e oxigênio no sangue arterial das artérias. Alterações na concentração da pressão parcial desses gases (O_2 e principalmente a elevação do CO_2) desencadeiam o disparo de fibras aferentes dentro dos nervos cranianos IX e X para os centros respiratórios (bulbo) para alterar a função respiratória (hiperventilação). Além disso, o metabólito da cafeína (teofilina) age relaxando o músculo liso dos brônquios e dos vasos sanguíneos pulmonares pela inibição das enzimas fosfodiesterases III e IV, que são as responsáveis por catalisar a decomposição do AMPc. Isso aumenta os níveis de AMPc nas células da musculatura lisa brônquica favorecendo uma melhora na difusão do O_2 e CO_2 alveolar (FREDHOLM *et al*., 1999).

Em doses moderadas, a cafeína demonstrou aumentar significativamente a capacidade ventilatória em humanos nas condições de hipóxia e acidose hipercápnica de repouso (D'URZO *et al*., 1990; PIANOSI *et al*., 1994), que são controlados somente ou em parte pelos quimiorreceptores periféricos. Em um estudo com 7 homens adultos não treinados (consumidores habituais de cafeína) descobriram que 650 mg de ingestão de cafeína resultou em um aumento de 135% na resposta ventilatória (relacionando a ventilação minuto e as modificações na saturação de oxi-hemoglobina arterial) à hipóxia induzida de repouso comparado ao placebo. Essas evidências sugerem que o uso da cafeína pode aumentar a sensibilidade dos quimiorreceptores periféricos e potencializar a hiperventilação (D'URZO *et al*., 1990) (Figura 11).



↑ efeito aumentado; ↓ efeito reduzido; + ativado; - desativado; GRD – glânglio da raiz dorsal; pO_2 – pressão de O_2 alveolar; pO_2 – pressão de CO_2 alveolar; pH – potencial de H^+ livres .

Fonte: Elaborado pelo autor, a partir do estudo de Zaidi *et al* (2006).

Figura 11 - Fluxograma ilustrando a influência dos quimioreceptores e dos efetores (adenosina e cafeína) no controle da ventilação.

Como resultado desse mecanismo, vários estudos foram conduzidos com exercícios e demonstraram um aumento significativo na ventilação minuto (VE), durante a realização de esforço submáximo (PIANOSI *et al*., 1994) e máximo (até a exaustão) (POWERS *et al*., 1986). A melhora do mecanismo ventilatório com administração de cafeína em atletas, pode resultar no aumento do

VE e da pressão parcial de oxigênio alveolar (pO_2), melhorando a saturação arterial de oxi-hemoglobina (SaO_2), fornecimento de oxigênio para a musculatura de trabalho e redução da acidose provocada pelo exercício (CHAPMAN & STAGER, 2008). Em teoria, o uso da cafeína poderia ser benéfico em atletas na eliminação precoce de CO_2 provocada pela potencialização da hiperventilação, já que no alto nível esportivo, 50% dos atletas experimentam hipoxemia arterial induzida pelo exercício (DEMPSEY, HANSON & HENDERSON, 1984; POWERS *et al*., 1988). Esse fenômeno é caracterizado por uma significante redução da pO_2 arterial e a SaO_2 durante a realização de exercício com alternância de intensidade, como visto nas provas de contrarrelógio no ciclismo de 20 km (HAMLIN *et al*., 2010).

Dentro de um grupo de atletas de longa distância testados, o uso da cafeína (8 mg/kg) resultou em um aumento médio no VE de 5% a 7% durante a realização do exercício na intensidade de 75% e 80% do VO_2máx comparado ao placebo. Deve-se notar que algumas investigações não conseguiram demonstrar aumento do VE durante a realização do exercício com a administração de cafeína (TITLOW, ISHEE & RIGGS, 1991; TARNOPOLSKY *et al*., 1989). No entanto, muitos desses estudos utilizaram dosagens (6 mg/kg) e exercícios com cargas de trabalho (<75% do VO_2máx) que eram inferiores em comparação ao estudo de Chapman & Stager (2008).

Sabe-se que quando doses muito elevadas de cafeína acidentalmente ingeridas aumentam o nível de toxicidade com uma DL50 (Dose Letal 50%) aproximadamente de 200 mg/kg (EICHLER, 1976). São descritos casos fatais de intoxicação por cafeína e há um relato de caso na literatura de um paciente que sobreviveu a 24 g de cafeína (MORELLI & SIMOLA, 2011). Alguns fármacos causam aumento do efeito e da toxicidade da cafeína. São eles: quinolonas (especialmente ciprofloxacino e ofloxacino) e inibidores da citocromo P-450 (complexo enzimático hepático responsável pela metabolização), como cetoconazol e fluvoxamina (FREDHOLM *et al*., 1999). As intoxicações mais frequentes ocorrem em pessoas que não consomem café, mas também em usuários que aumentam sua dose habitual ou em consumidores habituais de altas doses de cafeína. Os sintomas mais frequentes são taquicardia, inquietação, nervosismo, tremor e insônia (JULIANO & GRIFFITHS, 2004). A intoxicação por cafeína, mesmo em grande quantidade, pode não aparecer devido ao desenvolvimento de tolerância (SAWYNOK, 2011). A toxicidade crônica da cafeína pode manifestar-se como miopatia, hipocalemia, fraqueza muscular, náuseas, vômitos, diarreia e redução de peso (JULIANO & GRIFFITHS, 2004). A cafeína pode diminuir os efeitos sedativos e ansiolíticos dos benzodiazepínicos e barbitúricos (FREDHOLM *et al*., 1999). A cafeína potencializa a absorção e a biodisponibilidade do paracetamol, ácido acetilsalicílico e ergotamina. Diminui a depuração da teofilina e inibe de forma competitiva o metabolismo da clozapina, podendo aumentar suas concentrações plasmáticas e a probabilidade de aparecimento de efeitos adversos (SAWYNOK, 2011).

Entretanto, muitos fatores na literatura atual se revelam obscuros sobre os efeitos reais do uso da cafeína nas respostas dos mecanismos fisiológicos que podem potencializar a performance dos atletas. Um desses fatores propostos está relacionado à habituação ao uso da cafeína, que pode resultar no desenvolvimento de tolerância aos seus efeitos ergogênicos nas respostas agudas fisiológicas e de performance (ROBERTSON *et al*., 1981).

2.8. CAFEÍNA E PERFORMANCE

A fadiga é apontada como fator limitante da performance atlética e constitui um fenômeno complexo ou até mesmo um conjunto de fenômenos de interação simultânea com diferentes graus de influência, dependendo da natureza do exercício físico. No processo de instauração da fadiga deve ser considerado não apenas o componente periférico (NOAKES *et al*., 2005), mas também o componente central (AMANN *et al*., 2009). Neste sentido, a utilização de alguns suplementos nutricionais e substâncias com potencial ergogênico tem se mostrado eficiente por retardar o aparecimento da fadiga e aumentar o poder contrátil do músculo esquelético, cardíaco e a eficiência pulmonar no fornecimento de O_2 aos músculos aprimorando, portanto, a capacidade de realizar trabalho físico (performance atlética) (ALTIMARI *et al*., 2006).

Entre as várias substâncias com potencial para aumentar a performance atlética, podemos citar a cafeína. A cafeína é uma substância amplamente usada que não consta da lista proibida da Agência Mundial Antidoping e é considerada uma substância monitorada (WADA, 2021). De fato, Del Coso, Muñoz & Muñoz-Guerra (2011) avaliaram 20,686 amostras de urina de atletas de diferentes esportes (handebol, triatlo, ciclismo, remo, atletismo, vôlei, futebol e natação) entre os anos de 2004 a 2008 e mostraram que 26,2% apresentavam níveis de cafeína abaixo de 0,1 μg/ml (limite de detecção), 67,3% abaixo de 5 μg/ml, e apenas 0,6% ultrapassou o limiar de 12 μg/ml (ou seja, valor considerado de doping entre os anos de 1985 a 2004). A cafeína tem sido descrita como eficaz em aumentar a performance de diversos esportes que envolvam eventos de força, potência muscular e atividades de *endurance* (ASTORINO & ROBERSON, 2010). A cafeína é um estimulante do sistema nervoso central e seu consumo pré-treino está relacionado à menor percepção de esforço/fadiga (GOLDSTEIN *et al*., 2010). Além disso, ao reduzir o esforço percebido, a administração de cafeína pode aumentar a capacidade de realizar o exercício e atenuar a fadiga. Por isso, a cafeína também é uma útil “ferramenta” para estudar a fadiga neuromuscular (RIBEIRO *et al*., 2017).

Os primeiros trabalhos relacionados à cafeína e exercícios físicos evidenciaram melhoras na potência muscular (RIVERS & WEBBER, 1907). Posteriormente Foltz, Ivy & Barborka (1943) examinaram a influência das infusões de cafeína por via intravenosa em exercícios exaustivos. Durante esse tempo, pesquisadores americanos investigaram os efeitos da cafeína, cocaína, álcool,

estricnina e nitroglicerina na performance em nadadores (HALDI & WYNN, 1946). Achados de pesquisas subsequentes mostraram a influência positiva da cafeína na melhora da performance em exercícios de *endurance* em retardar a fadiga muscular (WEISS & LATIES, 1962; COSTILL, DALSKY & FINK, 1978).

Dúvidas foram relatadas sobre o real potencial ergogênico da cafeína interindividual e, foi hipoteticamente sugerido que essa melhora pode ser atribuída a indivíduos treinados em relação à não treinados, pois os indivíduos treinados têm um potencial de ação neuromuscular maximizado (GRAHAM, 2001). Por outro lado, indivíduos treinados têm uma concentração maior de receptores A2a de adenosina do que os não treinados (MIZUNO *et al*., 2005), o que fornece evidências de que os indivíduos treinados podem precisar de uma ingestão de cafeína elevada para obter os mesmos efeitos ergogênicos de indivíduos não treinados. Assim, os mecanismos por trás de diferentes respostas parecem ser contraditórios. Além disso, a maioria dos autores não relata a verificação do consumo habitual de cafeína entre grupos com *status* de treinamento diferentes (BROOKS & CHRISMAS, 2015; JODRA *et al*., 2020). Essa falta de controle pode resultar em orientações pouco claras sobre a real influência do *status* de treinamento mediado pelo uso de cafeína em exercícios.

Assim, os efeitos descritos da cafeína e seus possíveis fatores intervenientes na performance dependem principalmente do nível de habituação dos atletas (IRWIN *et al*., 2011; RIBEIRO *et al*., 2016; GONÇALVES *et al*., 2017; LARA *et al*., 2019; MARTINS *et al*., 2020; GUEST *et al*., 2021).

2.9. EFEITOS DE TOLERÂNCIA DA CAFEÍNA E PERFORMANCE

Foi realizado um levantamento bibliográfico no portal Pubmed (base de dados MEDLINE), com o objetivo de se obter o quantitativo máximo de publicações disponíveis sobre a relação entre os efeitos de tolerância da cafeína e performance atlética. Para isso, foram utilizados os descritores apresentados no Quadro 2.

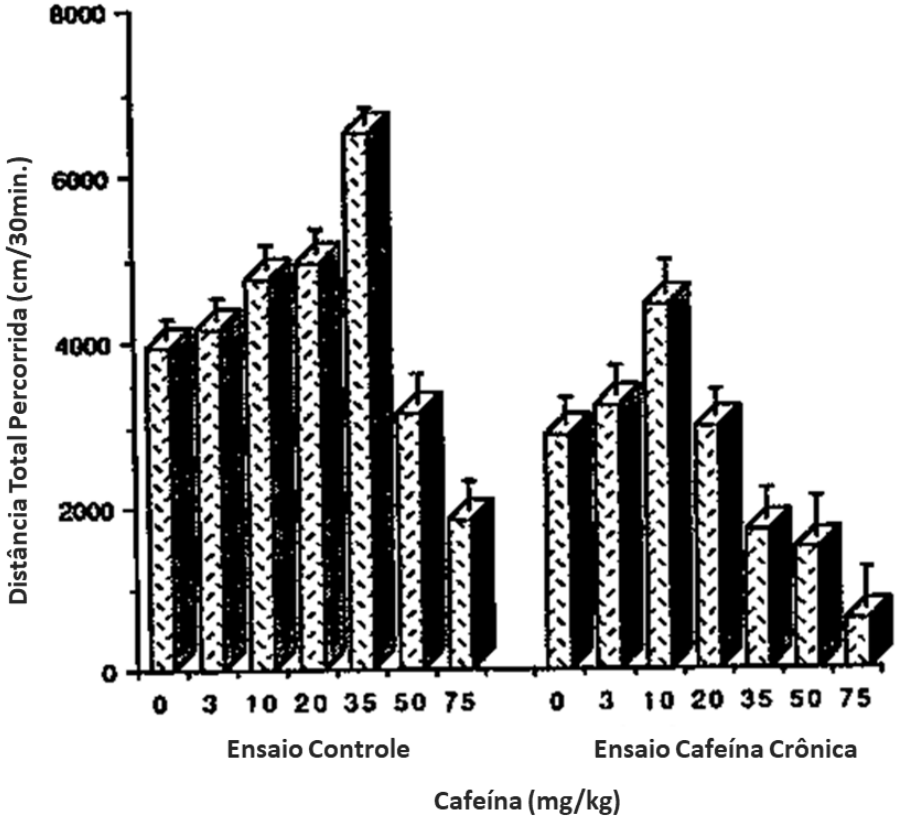
Quadro 2 - Estratégia de busca bibliográfica.

Tema	Descritores
Cafeína, Tolerância, Performance Atlética e Exercício (n= 55) Filtros: Ensaios clínicos e Ensaios Controlados Randomizados (n=22)	(((caffeine)[Title/Abstract] AND (tolerance))[Title/Abstract] AND (performance))[Title/Abstract] AND (exercise)[Title/Abstract]

A maioria dos estudos relacionados à habituação tem como foco a sensibilidade e a concentração dos receptores de adenosina nas células. Nos anos 80, a administração crônica de N6-

R-fenilisopropiladenosina mostrou reduzir os efeitos analgésicos e depressores locomotores da cafeína (AHLIJANIAN & TAKEMORI, 1986). As injeções crônicas de agentes seletivos aos receptores A_1 (8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina) mostraram ter efeitos opostos nas convulsões induzidas por N-metil D-aspartato (NMDA) (VON LUBITZ *et al*., 1994). O tratamento crônico com xantina reduz os efeitos do NMDA, enquanto o tratamento com o análogo da adenosina (N6-ciclopentiladenosina) aumenta as convulsões (reduz potenciais pós-sinápticos excitatórios).

O mecanismo preciso subjacente a estes efeitos não é bem conhecido (ROBERTSON *et al*., 1981; HOLTZMAN & FINN, 1988). Em animais, os pesquisadores tentam relacionar esse fenômeno às alterações no número de receptores de adenosina. Evidências têm mostrado que o número de receptores de adenosina (A_1) se eleva após a administração prolongada da cafeína (FREDHOLM, 1982) e quase todos os estudos subseqüentes sobre o uso crônico relataram um aumento desses receptores (A_1) no córtex motor. Esse efeito de modulação negativa para o uso de cafeína é mais pronunciado em receptores A_1, enquanto os receptores A_{2A} são especificamente relacionados às alterações nas proteínas Gs ou na enzima adenilato ciclase (CHERN *et al*., 1993). Na figura 12 é observado os efeitos na atividade locomotora em camundongos submetidos à ingestão crônica de cafeína (100 mg/kg/dia) no período de 7 dias.



Fonte: Adaptado do estudo de Nikodijevic, Jacobson & Daly (1993).

Figura 12 - Relação dose resposta de diferentes doses agudas de cafeína na atividade locomotora de camundongos submetidos ao uso crônico (100 mg/kg/dia de cafeína por 7 dias).

Os receptores de adenosina não são os únicos receptores centrais, cujos níveis são alterados após a ingestão crônica de cafeína. Na maioria dos casos, ocorre uma regulação ascendente e não a regulação negativa dos receptores. Houve um estudo verificando os efeitos do uso crônico de cafeína sobre os níveis de outros receptores centrais (SHI *et al*., 1993). Verificou-se que a ingestão de cafeína em camundongos machos da raça *Swiss* afetava a densidade de receptores que favorecem as vias noradrenérgica, serotoninérgica, colinérgica e GABAérgica. Notavelmente, uma vez que as evidências indicam que a cafeína afeta a função dopaminérgica (FERRÉ *et al*., 1992), o estudo de Daly *et al*., (1994) mostra que os níveis de receptores de adenosina A_1 corticais são aumentados em 15-20% pelo uso crônico de cafeína, enquanto o nível de receptores de adenosina A_{2A} no corpo estriado no gânglios da base (responsável pela coordenação motora) é inalterado. Os níveis de receptores $ß_1$ e $ß_2$-adrenérgicos corticais e cerebelares são reduzidos em cerca de 25%, enquanto os níveis dos receptores α_1, α_2-adrenérgicos e D_1, D_2-dopaminérgicos do corpo estriado não são significativamente alterados. Os níveis de receptores muscarínicos e nicotínicos corticais aumentam em 40-50%. A aparente regulação positiva dos receptores nicotínicos pode, na verdade, representar a conversão de receptores em um estado dessensibilizado (DALY *et al*., 1994; SHI *et al*., 1993).

Pela dificuldade em quantificar a expressão de receptores de tecidos (muscular, neural, renal etc..) envolvidos na interação da cafeína em modelos humanos, vários pesquisadores observaram essas respostas de forma indireta. Dessa forma, para determinar se a habituação ao uso da cafeína influencia negativamente na performance em exercício incremental de carga constante até exaustão, Dodd *et al* (1991) verificaram que o tempo até a exaustão foi semelhante entre os indivíduos não habituados (<20 mg/dia de cafeína; n = 8) e habituados (>300 mg/dia de cafeína; n = 9) utilizando a ingestão de cafeína (3 e 5 mg/kg de cafeína) 1 h antes da realização do exercício. Posteriormente, Bell & Mclellan (2002) compararam o tempo até a exaustão (80% VO_2máx) no cicloergômetro em indivíduos habituados (> 300 mg/dia de cafeína; n = 13) e não habituados (<50 mg/dia de cafeína; n = 8) após ingerir 5 mg/kg de cafeína. Os autores também avaliaram o efeito ergogênico da cafeína com os protocolos de exercício iniciando 1, 3 ou 6 horas pós a ingestão, respectivamente (BELL & MCLELLAN, 2002). Curiosamente, tanto a magnitude e a duração dos efeitos agudos ergogênicos da cafeína foi influenciada pelo nível de habituação. No ensaio com os indivíduos habituados, a performance foi melhorada em 1 e 3 horas pós a ingestão de cafeína, mas foi semelhante comparado ao ensaio com placebo às 6 horas. Por outro lado, a performance foi potencializada 1, 3 e 6 horas após a ingestão de cafeína no ensaio com os indivíduos não habituados. Robertson *et al* (1981) relataram que 4 dias de ingestão regular de cafeína (750 mg) induz uma taxa de tolerância às respostas humorais e hemodinâmicas à ingestão aguda de cafeína (250 mg), incluindo pressão arterial, frequência cardíaca, atividade da renina plasmática e concentrações de catecolaminas.

Bangsbo *et al* (1992) avaliaram a resposta metabólica ao exercício após o uso agudo e crônico de cafeína. Os participantes treinados foram suplementados com doses diárias de placebo (n = 6) ou 500 mg de cafeína (n = 6) durante 6 semanas para avaliar as respostas metabólicas em exercícios submáximos e máximos. O grupo controle (placebo) realizou um ensaio agudo com o uso do placebo antes e após a realização do período de suplementação crônica de cafeína. Enquanto o grupo cafeína realizou um ensaio agudo de cafeína (500 mg) antes e após o período de suplementação crônica de cafeína (BANGSBO *et al*., 1992). Para avaliar as respostas metabólicas os sujeitos realizaram o exercício submáximo na esteira ergométrica em uma intensidade de 80% do VO_2máx no tempo de 45 min. Após 15 min de descanso os sujeitos realizaram um teste carga incremental (aumento da velocidade de 2% em estágios de 2 min.) máximo, partindo da velocidade correspondente a 80% do VO_2máx. Após 6 semanas de ingestão crônica de cafeína, a resposta da adrenalina foi atenuada. Antes dos ensaios experimentais, ambos os grupos relataram um consumo habitual de aproximadamente 5 xícaras de café por dia (BANGSBO *et al*., 1992). Se um copo médio de café contém aproximadamente 100 mg de cafeína (DESBROW & LEVERITT, 2006) no período da suplementação crônica os sujeitos ingeriram mais de 500 mg/dia de cafeína, então a ingestão diária desses indivíduos teria sido aproximadamente 14 mg/kg (nível de ingestão muito maior de cafeína do que habitualmente consumido pela população em geral) (FITT *et al*., 2013). Dados desse estudo sugerem fortemente que o nível de habituação pode influenciar os benefícios da ingestão aguda de cafeína na resposta metabólica dos hormônios envolvidos na melhora da performance.

Os achados mais recentes no objetivo de investigar qual o período de tempo que induzia efeitos de tolerância na performance, Beaumont *et al* (2017) observaram que o uso crônico de suplementação de cafeína (1,5 $mg \cdot kg^{-1} \cdot dia^{-1}$) por 28 dias seguido pela ingestão aguda (3 $mg \cdot kg^{-1}$ de massa corporal de cafeína) induziu tolerância aos efeitos ergogênicos na geração de trabalho total no cicloergômetro. Lara *et al* (2019), usaram um modelo de teste incremental no cicloergômetro e demonstraram que a suplementação diária de cafeína (3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot dia^{-1}$) por um período de 20 dias, seguido pela ingestão aguda (6 $mg \cdot kg^{-1}$ de massa corporal de cafeína) reduziu a magnitude dos efeitos ergogênicos na resposta ventilatória. Ambos os estudos os autores (BEAUMONT *et al*., 2017; LARA *et al*., 2019) usaram doses de cafeína que excederam a quantidade média de consumo usual dos indivíduos e observaram que o uso crônico seguido por uma dose aguda produziu efeitos de tolerância. Preocupados com os efeitos clínicos provocados por modelos experimentais utilizando períodos longos de ingestão de cafeína, Irwin *et al* (2011) examinaram a influência de um período curto de 4 dias ao uso de cafeína em 20 ciclistas/triatletas habituados (consumo de 240±162 mg/dia de cafeína). Usando um ensaio clínico duplo-cego, randomizado, placebo/controlado e cruzado, os indivíduos foram suplementados com placebo ou 3 mg/kg de cafeína por 4 dias, seguido

(quinto dia) de ingestão de placebo ou 3 mg/kg de cafeína 1h antes da avaliação no contrarrelógio (cicloergômetro) (IRWIN *et al*., 2011). Os resultados revelaram que a ingestão aguda de cafeína melhorou o tempo no contrarrelógio de carga fixa (utilizando 75% da potência máxima de saída) independentemente da intervenção crônica de 4 dias ao uso de cafeína. Esses achados são conflitantes, pois os autores utilizaram uma dose de 3 $mg \cdot kg^{-1}$ de massa corporal de cafeína semelhante ao consumo usual dos participantes (3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot dia^{-1}$), impossibilitando a verificação se essa dose poderia induzir efeitos de tolerância neste período de tempo.

Nesse cenário, autores como Martins *et al* (2020) e Guest *et al* (2021) sugerem que é necessário a utilização de doses de cafeína acima do consumo habitual de atletas para verificar possíveis efeitos de tolerância. Isso parece ser ainda mais importante, uma vez que achados de estudos (GONÇALVES *et al*., 2017; GRGIC & MIKULIC, 2020) apontaram que a utilização de doses acima do consumo habitual de participantes não induziu tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda de cafeína. Além disso, ressalta-se que a utilização de doses acima do consumo habitual é necessária, pois a exposição regular a cafeína induz o citocromo P450 1A2 (complexo enzimático fundamental da via de metabolização da cafeína) a aumentar a velocidade de metabolização (VAN DER PLAS *et al*., 2020), o que reduziria a manutenção das concentrações séricas de cafeína. O período de tempo dessas mudanças não é compreendido, embora os sintomas de abstinência, sugerindo habituação, possam ocorrer após 3 dias de consumo de cafeína (PICKERING & KIELY, 2019). Para os atletas, a principal consideração é se isso afetaria a performance atlética e seus parâmetros relacionados.

3. JUSTIFICATIVA

A busca pela melhora da performance de um atleta é um desafio constante, especialmente para os ciclistas, que muitas vezes frações de segundos são decisivas, ou mesmo períodos longos de manutenção do esforço prolongado em provas de longas distâncias. Os achados mais recentes demonstram que a ingestão de cafeína pode aumentar a eficiência de ciclistas em realizar o exercício no menor tempo possível em provas de contrarrelógio e promover melhorias na performance retardando o componente de fadiga. Levando em consideração que se trata de um esporte com investimentos vultosos, principalmente na Europa, mas já não é mais restrito a este continente, a melhoria de performance por menor que seja significa muito. Neste cenário, a utilização de estratégias de administração de cafeína vem sendo comumente utilizadas antes das sessões de treinos ou competições por ciclistas envolvidos em atividades de *endurance*. Por outro lado, por meio de evidências na literatura foi demonstrado que a suplementação de cafeína acima do consumo habitual dos atletas por um período longo (≥ 20 dias) podem não responder aos efeitos ergogênicos promovidos pela estratégia de administração de cafeína de forma aguda. Assim, a continuidade das pesquisas nesse âmbito é fundamental para dar conta se a ingestão de cafeína acima do consumo habitual por um período curto (4 dias) poderia causar a mesma intensidade de tolerância já mostrada por períodos longos (≥ 20 dias). A real necessidade de utilização dessa estratégia pode ajudar atletas e nutricionistas a manipularem o uso de cafeína durante o período curto de competições, curto de competição (no decorrer das provas os atletas recebem gradativamente maiores cargas fisiológicas), sem que o uso de cafeína por 4 dias possa lhe causar tolerância aos seus efeitos agudos ergogênicos.

4. HIPÓTESES

Manuscrito 2:

H0- A suplementação de cafeína por 4 dias em triatletas não impacta nos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda no parâmetro de performance após realizarem o exercício de intensidade submáxima.

H1- A suplementação de cafeína por 4 dias em triatletas impacta nos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda no parâmetro de performance após realizarem o exercício de intensidade submáxima.

Manuscrito 3:

H0- A suplementação de cafeína por 4 dias em ciclistas não induz tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda em parâmetros fisiológicos, metabólicos e de performance.

H1- A suplementação de cafeína por 4 dias em ciclistas induz tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda em parâmetros fisiológicos, metabólicos e de performance.

5. OBJETIVOS:

Geral

- Verificar se a suplementação de cafeína induz tolerância aos efeitos ergogênicos em parâmetros fisiológicos, metabólicos relacionados à performance de ciclistas.

Específicos

Os objetivos específicos foram divididos de acordo com os respectivos manuscritos apresentados na seção de resultados da presente tese.

Manuscrito 1:

- Investigar por meio da realização de uma revisão sistemática e meta-análise de estudos de ensaios clínicos que a ingestão aguda de cafeína induz melhorias no desempenho atlético, considerando os mesmos tipos de testes conduzidos em atletas.

Manuscrito 2:

- Verificar se a suplementação de cafeína por 4 dias induz efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda nas respostas da frequência cardíaca, volume de O_2, volume de CO_2, volume minuto, fração expirada de O_2, fração expirada de CO_2 e na taxa de percepção subjetiva de esforço em triatletas durante a realização do exercício de intensidade submáxima.
- Verificar se a suplementação de cafeína por 4 dias induz efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda na concentração de lactato de triatletas.
- Verificar se a suplementação de cafeína por 4 dias induz efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda na potência de saída de triatletas após realizaram exercício de intensidade submáxima.

Manuscrito 3:

- Investigar se a suplementação de cafeína por 4 dias induz tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda nas respostas da frequência cardíaca, volume de O_2, volume de CO_2, volume minuto, fração expirada de O_2, fração expirada de CO_2 e na taxa de percepção subjetiva de esforço durante a realização do contrarrelógio.

- Investigar se a suplementação de cafeína por 4 dias promove tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda nas respostas da concentração sanguínea de glicose, lactato e cortisol.
- Verificar se a suplementação de cafeína foi capaz de promover tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda na potência de saída e no tempo de execução do contrarrelógio.

6. MÉTODO

6.1. AMOSTRAGENS

Uma análise estatística (G*Power 3.1) foi realizada para estimar o tamanho da amostra baseado no simulado de contrarrelógio (CR) (16 km), por meio de um estudo piloto (n = 8 ciclistas). O tamanho da amostra projetada foi de 12 indivíduos com um tamanho de efeito f de 0,41, alfa de 0,05 e poder de 0,80. Usando uma abordagem mais conservadora (a priori) e levando em consideração possíveis desistências, o tamanho do efeito f foi ajustado para 0,36 (tamanho do efeito médio), e o tamanho da amostra projetada foi de quatorze ciclistas do sexo masculino. Os participantes tinham uma (média ± desvio padrão) idade de 34,1 ± 4,4 anos, estatura de 178 ± 9 cm, massa corporal de 79,1 ± 11,8 kg, índice de massa corporal (IMC) de 24,6 ± 2,1 kg·m2, consumo máximo de oxigênio (VO_2max) de 51,5 ± 6,3 mL·kg-1·min-1 (classificados como ciclistas recreativos) e potência máxima (Wmáx) de 398,9 ± 35,1 W. O volume de treinamento dos ciclistas foi de 202 ± 83 km por semana. Além disso, um questionário validado de consumo de cafeína foi administrado aos participantes, mostrando que todos eram consumidores moderados/altos de cafeína (285,9 ± 108,0 mg/dia) (GONÇALVES *et al*., 2017). Os participantes deram seu consentimento informado por escrito antes da inclusão no experimento (APÊNDICE 1). O protocolo (2.540.958 / 2018) foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) (ANEXO 1) e foi registrado em uma plataforma virtual de acesso público (Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos) (http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-5745nv/).

6.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO:

Critérios de inclusão: todos tinham pelo menos 4 anos de experiência no ciclismo; ter participado de pelo menos 20 competições entre os anos de 2018 e 2019; não ter histórico de distúrbios cardiorrespiratórios, gastrointestinais e musculoesqueléticos nos últimos 3 meses.

Critérios de exclusão: Foram excluídos atletas hipertensos ou com qualquer doença vascular. Durante a realização do experimento foram excluídos os que apresentarem náuseas e cefaléia.

Na figura 13 é mostrada a disposição dos participantes no estudo.

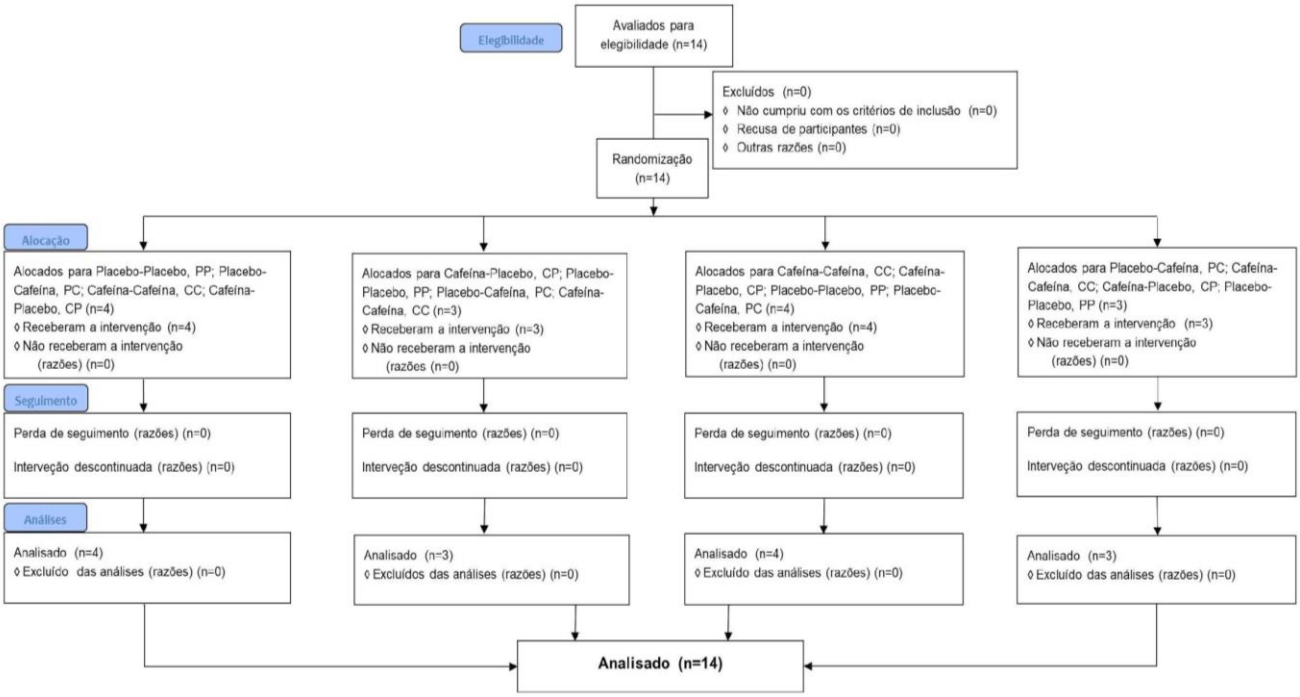


Figura 13 - Fluxograma do estudo de ensaio clínico

6.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Um desenho randomizado, duplo-cego, cruzado e controlado por placebo foi empregado na presente investigação. Na primeira visita ao laboratório, os participantes foram submetidos à avaliação dietética e a realização de um teste incremental de carga no cicloergômetro até a exaustão. Números aleatórios colocados em envelopes lacrados sorteados apenas pelo segundo pesquisador constituíram o processo de randomização do estudo (APÊNDICE 2). Na segunda visita, os ciclistas familiarizaram-se com o simulado de CR. Após a familiarização, os ciclistas receberam quatro visitas dos pesquisadores em suas casas, uma por dia, para entrega e verificação do consumo das cápsulas (conforme a randomização). No dia seguinte, eles ingeriram a cápsula de forma aguda no laboratório, 60 minutos antes de realizar o simulado de CR na distância de 16 km. O estudo preconizou um intervalo (washout) de sete dias (IRWIN et al., 2011; LARA et al., 2019) entre as diferentes estratégias de intervenções caracterizadas das seguintes formas: Placebo - Placebo (PP), os participantes receberam Placebo (suplementação de 4 dias) e Placebo (ingestão aguda, 60 minutos antes de iniciar o simulado de CR). Placebo - Cafeína (PC), os participantes receberam Placebo (suplementação de 4 dias) e Cafeína (ingestão aguda, 60 minutos antes de iniciar o simulado de CR). Cafeína - Cafeína (CC), os participantes receberam Cafeína (suplementação de 4 dias) e Cafeína (ingestão aguda, 60 minutos antes de iniciar o simulado de CR). Cafeína - Placebo (CP), os participantes receberam cafeína (suplementação de 4 dias) e Placebo (ingestão aguda, 60 minutos antes de iniciar o simulado de CR). As cápsulas de placebo continham 250 mg de silicato

de magnésio e as de cafeína a dose de 6 $mg \cdot kg^{-1}$ de massa corporal. Números aleatórios colocados em envelopes lacrados sorteados apenas pelo segundo pesquisador constituíram o processo de randomização do estudo. Na primeira visita ao laboratório, os pesquisadores verificaram a ingestão rotineira de energia e de cafeína dos alimentos, o VO2máx e a capacidade de carga de trabalho máximo no cicloergômetro também foram avaliados. Os atletas foram instruídos a suspender todo o consumo de cafeína (ou seja, fontes alimentares de cafeína) durante o experimento e foram monitorados por contato telefônico, e-mail e pessoalmente. No dia do teste, os ciclistas chegaram de jejum ao laboratório, e logo uma cânula intravenosa (20G Jelco; B. Braun Medical Inc., Bethlehem, PA, EUA) foi inserida no antebraço e, em seguida, quatro amostras de sangue (10 mL) foram obtidas: antes da ingestão das cápsulas (baseline), 60 min após a ingestão das cápsulas (T1), imediatamente após a realização do teste CR (T2) e após 10 min de recuperação (recuperação). Os ciclistas foram instruídos a não se exercitarem 24 horas antes dos ensaios experimentais. Os atletas foram orientados a manter a rotina de treinamento diário. Os ensaios experimentais foram realizados no mesmo horário do dia (7:00 AM) (figura 13).

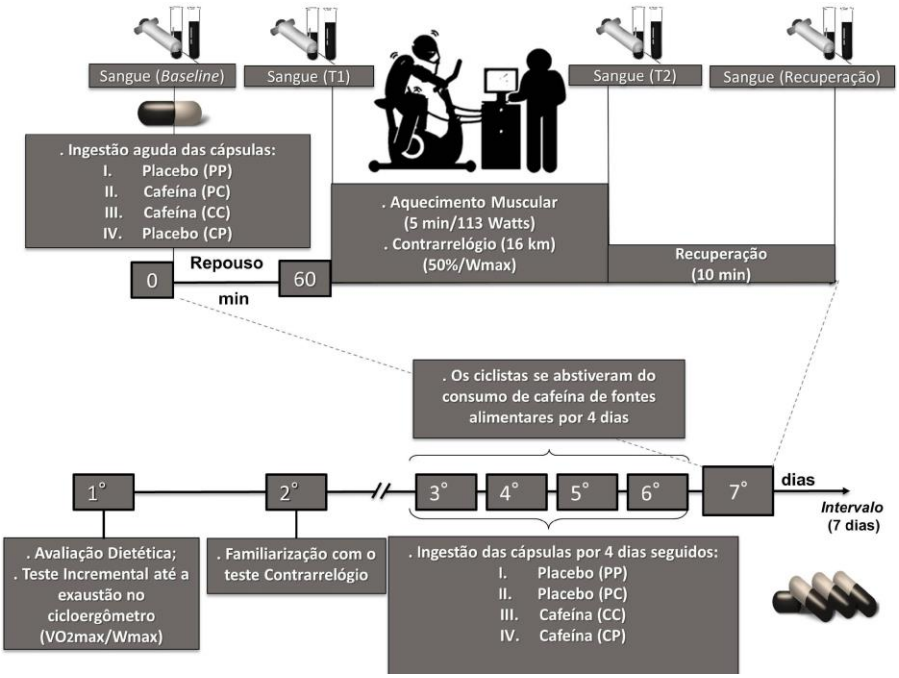


Figura 14 - Desenho Experimental

6.4. AVALIAÇÃO DIETÉTICA: ENERGIA, MACRONUTRIENTES E CAFEÍNA

Cada atleta completou o registro alimentar de 24 horas do primeiro ao quarto ensaio experimental no laboratório. De acordo com o registro alimentar de 24 horas do primeiro ensaio, ele foi fotocopiado e devolvido aos atletas para que a mesma dieta pudesse ser repetida nos ensaios subsequentes. O consumo de energia, carboidratos totais, proteínas totais e lipídios totais foram determinados. O banco de dados TACO® foi utilizado para quantificar a ingestão de

macronutrientes e o software Dietpro® 5i (Dietpro, Viçosa, MG, Brasil) para o cálculo dos nutrientes. Para avaliar a ingestão habitual de cafeína, foi utilizado um questionário adaptado de Landrum (1992) (APÊNDICE 4). O questionário foi aplicado individualmente com a supervisão de uma nutricionista habilitada. Esse questionário foi validado pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando a saliva ($r = 0.68$; $p<0.001$) (ADDICOT *et al*., 2008). O questionário é constituído por uma lista de alimentos e medicamentos fontes de cafeína e por quatro colunas informando o período do dia e o horário (manhã 6h-12h; tarde 12h-18h; noite 18h-2h; madrugada 2h-6h). Foi identificado os tipos de alimentos e suplementos alimentares presentes na dieta dos atletas que continham cafeína. O consumo de cafeína foi estimado em mg/dia e uma análise de consumo foi estratificada em fontes alimentares (café, chá, refrigerantes, bebidas prontas, bebidas energéticas, chocolates e suplementos) e não alimentares (medicamentos). Para o cálculo da quantidade diária total de cafeína ingerida foi avaliado segundo a tabela do IBGE de composição química dos alimentos (IBGE, 2011), quando pertinente, essa conversão se deu pela análise das informações contidas nos rótulos dos produtos consumidos, pelos valores de referência disponíveis pelo *United States Department of Agriculture* no USDA *Food Composition Databases* e pelos bulários de medicamentos. A fim de realizar a classificação de consumidor habitual de cafeína foi utilizada uma escala proposta por Gonçalves *et al* (2017). Essa classificação foi utilizada com ciclistas brasileiros (consumidor baixo ≤142, consumidor moderado ≥143 ou ≤ 350 mg/dia e consumidor alto ≥351 mg/dia).

6.5. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

A massa corporal foi obtida por meio de uma balança eletrônica e portátil. A estatura foi obtida por meio de antropômetro adequado. As medidas foram aferidas 3 vezes, tirando-se a média (APÊNDICE 5). Baseado na massa corporal e na estatura foi calculado o Índice de Massa Corporal (IMC) (WHO, 2007).

6.6. AVALIAÇÃO CARDIOVENTILATÓRIA MÁXIMA (ACM)

Os participantes realizaram um teste de exercício incremental de carga até a exaustão em um cicloergômetro de frenagem mecânica (Biotec 2100, Cefise®, São Paulo, Brasil) para determinação do VO_2máx. Os participantes começaram a pedalar a uma potência de saída de 113 W, com incrementos de 45 W a cada 2 min e a taxa de pedalada de 88 rpm foi mantida constante até a exaustão (JEUKENDRUP *et al*., 2008) (APÊNDICE 6). A capacidade máxima de carga de trabalho (Wmax) foi determinada pelo seguinte equação: Wmax = Potência de saída (*Woutput*) + ((t / 113) × 45), *Woutput* é a carga de trabalho no último estágio concluído, e t é o tempo gasto no estágio final não concluído (GONÇALVES *et al*., 2017). A frequência cardíaca foi monitorada continuamente

(Polar Electro Oy®, Kempele, Finlândia). A troca gasosa pulmonar foi determinada (*breath by breath*), pelo uso de um sistema de análise de gases VO2000 (MedGraphics®, St. Paul, MN, EUA). O equipamento foi calibrado automaticamente de acordo com as especificações do fabricante antes de cada teste. O presente estudo determinou o VO_2máx adotando os seguintes critérios: (I) aumento do VO_2 menor que 2,1 $ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$; (II) exaustão do indivíduo; (III) uma troca respiratória maior que 1,10 (RER). O platô no VO_2 foi determinado pela diferença do consumo de O_2 ($\leq$ 2,1 $mL \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$) nos 30 segundos finais.

6.7. SUPLEMENTAÇÃO DIÁRIA, INGESTÃO AGUDA E CEGAMENTO

Os participantes receberam uma dose de cafeína anidra (6 $mg \cdot kg^{-1}$ de massa corporal) ou placebo (250 mg de silicato de magnésio), fornecida em cápsulas de gelatina, idênticas em cor, tamanho e aparência (FIGURA 15). Como os participantes consumiam habitualmente quantidades médias diárias de cafeína, em torno de 285,92 ± 108,04 $mg \cdot dia^{-1}$ (verificado por meio de questionário), os investigadores do presente estudo optaram por oferecer uma dose maior do que a habitual. Essa dose (6 $mg \cdot kg^{-1}$ de peso corporal) representou uma dosagem de 474,78 ± 70,80 mg, representando uma quantidade média superior ao do consumo médio habitual dos atletas, o que permitiu verificar os efeitos da tolerância. Na presença do pesquisador, todos os atletas foram orientados a ingerir uma única cápsula ao dia, no mesmo horário (9h), durante os 4 dias de suplementação. Na ingestão aguda, a cápsula foi administrada com 250 ml de água 60 min antes da realização do simulado de CR. Nesse período os participantes ficaram em repouso por 60 min antes de iniciar o simulado de CR. Os suplementos para cada participante foram preparados e separados por um pesquisador não afiliado para garantir o cegamento. Foi usada a cafeína anidra encapsulada com laudo da sua composição fornecida pela farmácia de manipulação (ANEXO 2).

Figura 15 - Recipientes com as cápsulas (cafeína e placebo) utilizadas nos 4 dias e as dos ensaios experimentais no laboratório

6.8. PROTOCOLO DE FAMILIARIZAÇÃO

Após 48h da realização da avaliação cardioventilatória máxima, os atletas foram familiarizados com os procedimentos do protocolo de contrarrelógio no cicloergômetro (OLIVEIRA *et al*., 2017). O selim foi ajustado (verticalmente e horizontalmente) pelo ciclista e as sapatilhas (ciclismo) foram usadas para fixar os pés aos pedais. A posição do selim foi anotada e replicada durante todas as sessões experimentais subsequentes. Após os ajustes, os atletas foram instruídos a realizar o contrarrelógio de 16 km no menor tempo possível utilizando uma carga de 50% do Wmáx sem intervenção experimental.

6.9. CONTRARRELÓGIO E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E DE PERFORMANCE

Os participantes se reportaram ao laboratório em horários padronizados individualmente após um período de jejum de 8 horas. Antes do exercício principal, os participantes foram submetidos a um aquecimento muscular de 5 minutos a 113 W (88 rpm), seguido imediatamente pela realização do simulado de CR. O protocolo consistiu em um teste contínuo, com cada sujeito pedalando com uma rotação superior a 88 rpm o mais rápido possível a uma distância de 16 km (figura 15). Foi utilizada uma carga de trabalho constante representando 50% da capacidade máxima (acima de 199,67 ± 17,90 W, equivalente uma carga de trabalho superior a ~407 kJ, determinado pela seguinte equação: trabalho (J) = 50% Wmax × t) no cicloergômetro de frenagem mecânica. O cicloergômetro foi conectado a um laptop por meio do software "*Ergometric*" (versão 7.0, Cefise®, São Paulo, Brasil) para coleta e armazenamento de dados, como potência (W) e cadência (rpm). Os participantes foram cegados para informações relacionadas às variáveis de performance (tempo de exercício e cadência) durante os testes. As únicas informações que os participantes receberam durante o teste foram as distâncias (2 km, 4 km, 6 km, 8 km, 10 km, 12 km, 14 km e 16 km). Nestes intervalos definidos, os participantes foram questionados sobre a sua classificação de PSE, usando a escala de *Borg* de 0 a 10 pontos (BORG, 1982). As variáveis ventilatórias (volume minuto V_E, consumo de oxigênio VO_2, produção de dióxido de carbono VCO_2, fração expiratória de O_2 FeO_2 e fração expiratória de CO_2 $FeCO_2$), a frequência cardíaca (FC) utilizando um equipamento cardiofrequencímetro (Polar modelo RS800®, *Kempele*, Finlândia) e parâmetros de potência de saída foram avaliadas continuamente durante a realização do simulado de CR. Os parâmetros listados foram analisados e expressos em dez momentos (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%) da curva do tempo total concluído do simulado de CR. Além disso, foi utilizado a média desses valores finais nas condições PP, PC, CC e CP. Todos os ensaios foram realizados no laboratório com o ambiente climatizado (21° C a 24° C, 41% a 52% de umidade relativa).

Figura 16 - Protocolo do contrarrelógio de 16 km

6.10. AMOSTRAS DE SANGUE

Amostras de sangue venoso (10 ml) foram coletadas por um enfermeiro nos seguintes momentos: *baseline,* T1, T2 e recuperação (figura 16). Um cateter IV., Radiopaco, Apirogênico 20G X 1¼ (Introcan Safety™, B Braun) foi inserido na veia antecubital e acoplado a ele um perfusor de duas vias (VitalGold). Após a primeira coleta, foi injetado em via 2 ml de solução salina heparinizada (1 ml de heparina Eurofarma Heparina Sódica para 10 ml de soro fisiológico) para evitar a coagulação do sangue. Antes de cada coleta de sangue foi retirado e desprezado 2 ml da solução salina heparinizada e 1 ml de sangue para limpeza do circuito. Da amostra de sangue foram transferidos 2.8ml para 2 tubos contendo EDTA (BD Vacutainer-K_3EDTA 15% 0.057 mL, 0.34M), 2.8 ml para 1 tubo contendo heparina (BD Vacutainer – Heparina Sódica 72 um. U.S.P.) e 1.6 ml para 1 tubo contendo Fluoreto de Sódio EDTA Dissódico (BD Vacutainer- NaF 7.5mg Na_2EDTA 15 mg).

Figura 17 - Coleta das amostras de sangue

6.11. ANÁLISES DE CAFEÍNA, LACTATO, GLICOSE E CORTISOL

As análises dos níveis sanguíneos de cafeína, cortisol, lactato e glicose foram realizadas nos momentos *baseline*, T1, T2 e recuperação. O plasma e o soro foram obtidos por centrifugação a 2.500 rpm a 4° C por 20 min. O plasma e o soro resultantes foram armazenados a -20° C até que as análises pudessem ser realizadas. Os níveis sanguíneos de cafeína foram determinados pelo método HPLC, adaptado de Ribeiro *et al*. (2016). As análises por HPLC foram realizadas utilizando um cromatógrafo *Shimadzu* (Shimadzu® Corp., Kyoto, Japão), equipado com uma unidade de bomba de dissolvente quaternário LC-20AT, um detector de matriz de diodos SPD-M20A funcionando a 274 nm. As análises de cafeína foram realizadas a 35° graus utilizando um modelo de coluna CTO-20A, a desgaseificação de solvente foi realizada por um desgaseificador DGU-20A5. O software AnLCsolution, versão 1.25 SP1, foi utilizado para o controle do sistema e aquisição de dados. A cafeína foi extraída de soro humano utilizando um procedimento de precipitação de proteínas. Alíquotas de 200 µl de soro humano foram adicionadas com 25 µl de soluções de trabalho obtidas dos ciclistas e foram transferidas para tubos de vidro cônicos de 10 ml. Em seguida, foi adicionado 25 µl de solução de pentoxifilina de 60 µg.ml utilizada como padrão interno e foi adicionado 300 µl de metanol. A mistura foi agitada no vórtex durante 1 minuto e depois centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, 250 µl do sobrenadante foram retirados e 50 µl foram analisados no HPLC. A quantificação dos níveis séricos da cafeína foi realizada por meio de uma curva de calibração obtida por adição de soros com soluções de cafeína em concentrações de 1.2, 3.6, 8, 40, 120 e 240 µg.ml, resultando nas concentrações de 0.15, 0.45, 1.0, 5, 15 e 30 µg.ml no soro. No apêndice 8 é mostrado o perfil cromatográfico da concentração de cafeína sanguínea de um atleta. Para a realização das análises de lactato e glicose, foram utilizados kits comerciais (Labtest, Lagoa

Santa, Brasil) e o analisador BIO200 (Bioplus®, São Paulo, Brasil), respectivamente. O cortisol foi analisado pela técnica de quimioluminescência utilizando kits de reagentes (Abbott Diagnostics Division, Santa Clara, CA, EUA) e o analisador de imunoensaio automático Architect i2000SR (Abbott®, Abbott Park, IL, EUA).

6.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são expressos em média ± DP ou mediana (desvio interquartil), seguindo a normalidade do teste de *Shapiro Wilk*. Todas as variáveis foram analisadas (SPSS, versão 16.0) com *ANOVA* de uma via ou de duas vias de acordo com os dados. O teste de esfericidade de *Mauchly* foi realizado para todas as variáveis, e a correção *Greenhouse-Geisser* para efeitos foi usada nos casos em que a suposição de esfericidade foi violada. As interações significativas foram acompanhadas por comparações pareadas por meio de análise de efeito principal simples, com correção de *Tukey* para comparações múltiplas (recordatório de ingestão alimentar, percepção subjetiva de esforço, parâmetros cardiorrespiratórios, tempo, potência de saída, concentrações sanguíneas de cortisol e lactato). Foram utilizados os testes de *Friedman* e *Kruskal-Wallis* para as concentrações sanguíneas de glicose e cafeína. O tamanho de efeito (ES) (*Cohen's d*: efeito pequeno ≥ 0,20, efeito médio ≥ 0,50, efeito grande ≥ 0,80, efeito muito grande ≥ 1,30), intervalo de confiança (IC95%) e Delta (Δ) da suplementação de cafeína foram calculados como a diferença entre as médias correspondentes aos ensaios com cafeína (PC, CC, CP) e placebo (PP). Para todas as análises estatísticas, um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

7. RESULTADOS

A seção de resultados é composta por três manuscritos que foram elaborados no período desta tese. Os manuscritos estão escritos em língua inglesa e apresentados conforme as normas dos respectivos periódicos que foram submetidos e publicados.

Manuscrito 1 Título: *Acute effects of caffeine intake on athletic performance: A systematic review and meta-analysis.*

Publicado na *Revista Chilena de Nutrición* (http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182017000300283) (APÊNDICE 9).

Manuscrito 2 Título: *Caffeine supplementation for 4-day, followed by acute ingestion, did not impact triathlete output power after submaximal intensity exercise.*

Publicado na Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício (https://doi.org/10.33233/rbfe.v18i3.3230) (APÊNDICE 10).

Manuscrito 3 (principal) Título: *Caffeine supplementation for 4 days does not induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters of cyclists: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled study*.

Publicado no periódico *Nutrients* (10.3390/nu12072101) (APÊNDICE 11).

7.1. MANUSCRITO 1

Acute effects of caffeine intake on athletic performance: A systematic review and meta-analysis

Abstract

Our objective was to perform a systematic review and meta-analysis of the research literature assessing the effect of caffeine on athletic performance. A total of 13 studies published between 2010 and 2015 were included in the meta-analysis of the effects of caffeine on maximum running distance (2 studies), time trial performance (7 studies), and muscle power (4 studies). The effect sizes were calculated as standardized differences in means (std in means). Meta-analysis was completed using a random effects model. Caffeine supplementation did not increase maximum running distance (effect size= 0.37, p= 0.14) and muscle power (effect size= 0.17, p= 0.36). However, improvements were observed in the time trial performance (effect size= -0.40, p< 0.01). Subgroup analyses revealed that the improvement in time trial results may be related to the use of the 6 mg/kg of body weight of caffeine dose (effect size= -0.45, p= 0.01). Our meta-analysis showed that caffeine intake does not improve performance in maximum running distance and muscle power, but it seems to improve time trial performance. The effect of caffeine on time trial performance related to dose.

Key Words: caffeine; running; exercise test; cycling; muscle power

Introduction

Athletes are always looking for legal ergogenic aids to increase their performance. Ergogenic aids are substances, techniques, or sports equipment that improve sports performance[1]. Among legal nutritional ergogenic resources, we highlight caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), which is one of the most used ergogenic aids by athletes[1–3]. Del Coso et al.[1] evaluated 20,686 urine samples from athletes of different sports (i.e., handball, triathlon, cycling, rowing, athletics (track and fiels), volleyball, soccer, and swimming) between 2004 and 2008. They found that 26.2% of the athletes presented blood caffeine levels below 0.1 μg.ml-1 (limit of detection), 67.3% had below 5 μg.ml-1, and only 0.6% exceeded the threshold of 12 μg.ml-1 (i.e., value considered as doping between 1985 and 2004). Following its 2004 removal from the World Anti-Doping Agency (WADA) Prohibited List, caffeine can be considered safe, effective, and legal when used according to established and practiced protocols.

The prevalence of caffeine intake by athletes before and during competition is high, with the substance obtained from various sources, such as energy drinks, energy gels, and tablets, carbonated sodas, and coffee[2]. In previous studies, caffeine doses commonly range from 3 (low)[4], 6 (moderate)[5], and 10 (high)[26] mg/kg of body weight when the substance is ingested 30-60 minutes before exercise to allow the caffeine levels in the bloodstream to reach peak values[4,5].

Caffeine may affect performance through both peripheral and central mechanisms. The mechanism for improved endurance, sprint, and power performance has been related to a simple biologic mechanism, such as glycogen sparing, increased intracellular Ca^{++} concentration, or altered excitation-contraction coupling[6–9]. However, a caffeine paradigm for improved athletic performance is complex, including biologic mechanisms, and cognitive perception[5]. Davis et al.[10] proposed a mechanism by which caffeine delays fatigue through its effects on the central nervous system (CNS). Recently, this mechanism has gained popularity because of previously known effects of caffeine as a CNS stimulant, through its action as an adenosine receptor antagonist, and its analgesic effects on the CNS.

Although the physiological basis of caffeine intake is well described, its clinical effect of improving athletic performance remains controversial. Caffeine intake has been reported to be safe to the cardiovascular system that does not cause changes in heart rate, blood pressure and heart rate variability[11]. However, the results are mixed in the context of "strength"[12] and "resistance" tests[13,14], using different tests to evaluate the strength (i.e., 1-RM test and maximal voluntary contraction - MVC) and endurance (i.e., repetitions until fatigue). This division does not describe the complexity of different tests, and it is difficult to classify tests into only two groups.

A pertinent question is whether the effects of caffeine supplementation are similar in all tests considered “endurance” or “strength” and if these effects could be limited to a subset of these two larger groups. From this perspective, this systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials aims to verify whether acute caffeine supplementation improves athletic performance regardless of whether the tests involve “endurance” or “strength”, but considering the same types of tests conducted by performance athletic.

Materials and Methods

Systematic Review

A systematic review of the literature was carried out to analyze the acute effects of caffeine intake on athletic performance, which was defined as: 1) the maximum total running distance during the test, 2) the time trial performance in exercise, and 3) the muscle power generated during exercise. The search included articles published between January 2010 and December 2015 and was carried out using the PubMed and Bireme databases. The terms used in the search were “caffeine” or “exercise” or “performance” or “drink” or “capsule.” Only studies with humans were included.

Inclusion criteria

The criteria for inclusion in the analysis were: 1) studies with physically active humans (i.e., individuals involved in physical activities of medium slow/medium-intensity physical activities); 2) studies with at least two trials (or separate groups of subjects), in which the subjects consumed caffeine in one trial (or group) and placebo in the other, and 3) studies that showed results in absolute values of the studied variables (i.e., maximum running distance, time trial performance and muscle power).

The exclusion criteria were: 1) use of co-ingested caffeine with other known or potential ergogenic compounds (i.e., creatinine, ginseng, and taurine), used sweetened beverages containing caffeine or no sugar; 2) trials that included women, children, adolescents, and sedentary men; 3) studies that did not have full texts (in such cases, an attempt was made to retrieve the necessary data by e-mailing the author; and 4) duplicity in the two search criteria.

Selection of studies

Two reviewers (BGR and FSJ) separately carried out a full-text analysis of all eligible articles to independently check if all the inclusion and exclusion criteria were in agreement. Any

disagreement between reviewers was discussed. If no agreement was reached, a third reviewer (APM) was consulted.

Data collection

Two reviewers (BGR and FSJ) independently extracted data from all eligible studies. Any disagreement was resolved as mentioned above. Continuous outcomes, means, and standard deviations were used. For data analysis, the studies were classified under maximum running distance, time trial performance and muscle power. For meta-analysis, the data were generally extracted using means, standard deviations, and sample sizes (n) for both caffeine and placebo conditions. For both treatments in all studies, the mean differences and 95% confidence intervals (CI) were calculated for comparison of continuous outcomes by using a random effects model.

Assessment of bias risk and study quality

The systematic error of the 13 studies was assessed using the Cochrane risk of bias tool. The following dimensions were considered: random sequence generation, allocation concealment, blinding of participants, blinding of personnel, blinding of outcome, incomplete outcome data, selective outcome reporting, and other sources of bias. The risk judgement was assessed by using prespecified criteria about the adequacy of the study and was expressed as “low risk of bias,” “high risk of bias,” or “unclear risk of bias”[15].

Meta-analysis

The meta-analysis was completed using the Comprehensive Meta-analysis software (version 2.2; Biostat Inc., Englewood, NJ). The data were extracted and converted into a standard format by calculating the standardized mean difference (SMD), referred to as “effect size” in the Results and Discussion.

Results Description of the Included Studies

Figure 1 illustrates the selection of studies included in the analysis. A total of 13 studies published between 2010 and 2015 were included in the meta-analysis of the effects of caffeine on maximum running distance (n= 2), time trial performance (n= 7) and muscle power (n= 4). The total sample consisted of 174 individuals. The mean age of individuals of the studies varied between 20.8 and 36.2 years. One study, however, did not report the age of the subjects. The dosage of caffeine varied between ~2.5 and 10 mg/kg of body weight; one study used a fixed dosage for the

whole sample. In this case, to categorize the amount of caffeine consumed, the quantity of consumed caffeine was divided by the mean body mass of the sample. All articles used caffeine in capsules. General characteristic of the studies included on systematic review and meta-analysis are shown in Table 1.

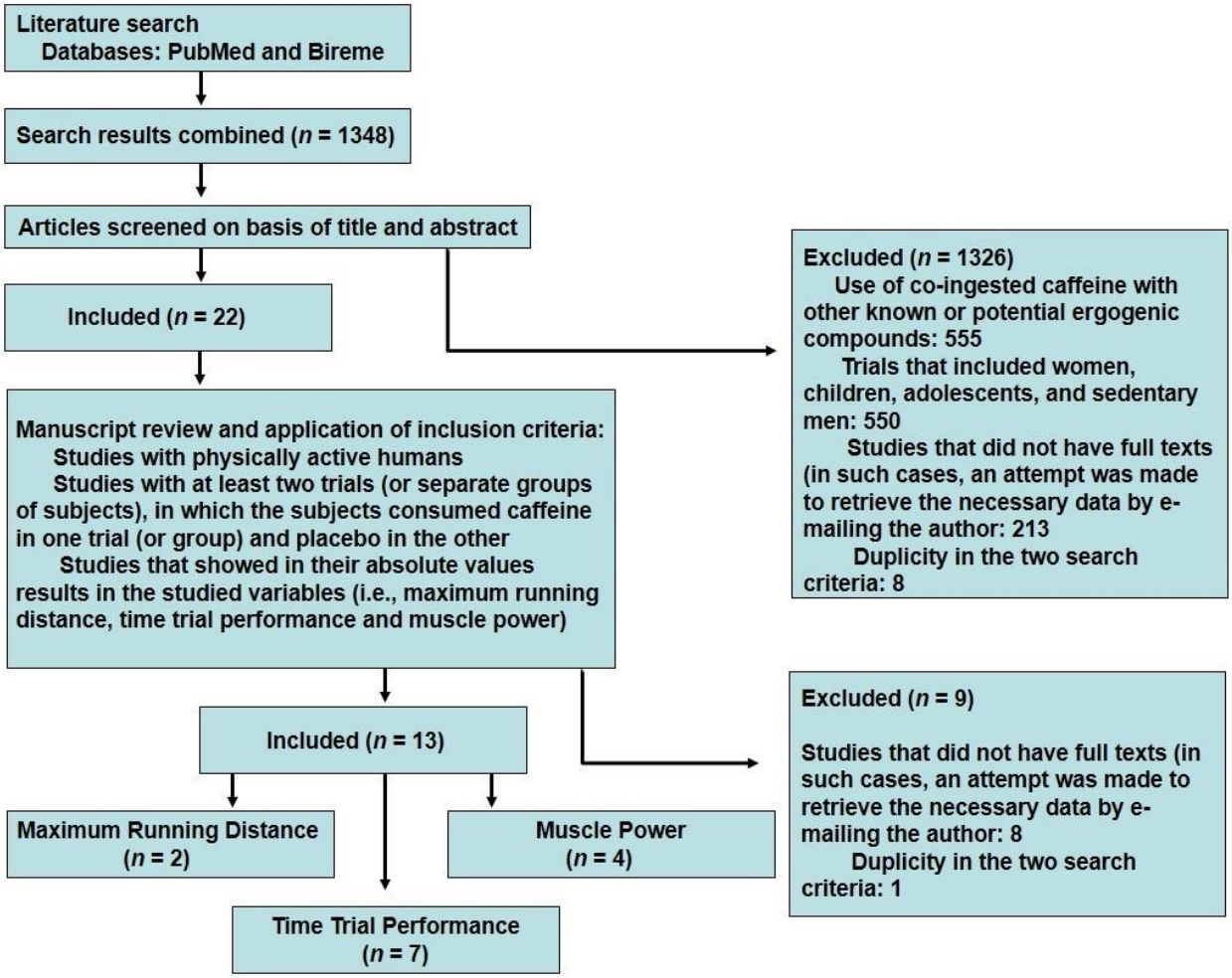


Figure 1. Flow chart of articles reviewed

Analysis of the subgroup of quantitative data (Dosage)

Table 2 illustrates the effect sizes of trials related to dosage (maximum running distance, time trial performance and muscle power). The dosage of 6 mg/kg on the time trial performance was significant with the effect size of -0.45 (-0.81 to -0.08; p= 0.01). No significant results were identified for the effects for <6 mg/kg dosage in the time trial performance (p= 0.18). Comparisons with maximum running distance and muscle power were not possible, since few articles were included for analysis in subgroup.

Table 1 - General characteristic of the studies included on systematic review and meta-analysis

Reference	Form of ingestion	Subjects info	Caffeine dosage	Time of consumption pre-exercise (min)	Measurement Test	Measurement Unit	Mean ± DP Caffeine	Mean ± DP Placebo
Acker-hewitt et al. (21)	Capsule	10 male cyclists; 28 ± 9 years; 178 ± 6 cm; 73 ± 6 kg	3 (mg.kg-1)	60	Time Trial Performance	Seconds	2616 ± 294	2652 ± 270
Bassini et al. (16)	Capsule	19 soccer players	5 (mg.kg-1)	60	Maximum Running Distance	Meters	1540 ± 330	1449 ± 378
Bortolotti et al. (5)	Capsule	13 male cyclists; 26 ± 10 years;176 ± 6 cm; 71 ± 9 kg	6 (mg.kg-1)	60	Time Trial Performance	Seconds	2181±194	2191±158
Desbrow et al. (18)	Capsule	16 male cyclists; 36.2 ± 8.3years; 180.9 + 5.5 cm; 78.5 ± 6.0 kg kg	6 (mg.kg-1)	90	Time Trial Performance	Seconds	3791 ± 281	3902 ± 340
Glaister et al. (26)	Capsule	17 well-trained males; 24 ± 6 years; 182 ± 0.06 cm; 82.2 ± 6.9 kg	10 (mg.kg-1)	60	Muscle Power	Watts	1141±195	1133 ± 186
Irwin et al. (4)	Capsule	12 male cyclists; 28.3 ± 5.8 years; 183 + 0.04 cm; 80.2 ± 6.6 kg	3 (mg.kg-1)	90	Time Trial Performance	Seconds	3443.4 ± 272.4	3571.8 ± 272.4
Marriott et al. (17)	Capsule	12 male; 20.8 ± 1.4 years; 183 ± 7	6 (mg.kg-1)	70	Maximum Running Distance	Meters	480 ± 113	413 ± 121

		cm; 78.9 ± 5.4 kg						
Silva et al. (23)	Capsule	10 male cyclists; 32.5 ± 9.8 years; 177.5 ± 6.09 cm; 78.1±13.9 kg	6 (mg.kg-1)	60	Muscle Power	Watts	1014.2 ± 178.6	982.6 ± 128
Skinner et al. (20)	Capsule	14 male cyclists; 31 ± 5 year; 75.4 ± 5.7 kg	6 (mg.kg-1)	60	Time Trial Performance	Seconds	3475.7 ± 97.2	3546.2 ± 122.8
Souissi et al. (24)	Capsule	12 male judoists; 21.08 ± 1.16 years; 1.76 ± 6.57 cm; 83.75 ± 20.2 kg	5 (mg.kg-1)	60	Muscle Power	Watts	935.85 ± 209.1	855.08 ± 221.85
Souissi et al. (25)	Capsule	13 active male; 21.1 ± 1.1 years; 177 ± 0.06 cm; 77.1±7.2 kg	5 (mg.kg-1)	60	Muscle Power	Watts	871.23 ± 69.39	863.5 ± 7.71
Spence et al. (22)	Capsule	10 male cyclists; 30 ± 2 years; 79.10 ± 1.65 kg	200 (mg)	60	Time Trial Performance	Seconds	4439 ± 153	4497 ± 153
Womack et al. (19)	Capsule	16 male cyclists; 25.0 ± 7.3 years; 178.2 ± 8.8 cm;74.3 ± 8.8 kg	6 (mg.kg-1)	60	Time Trial Performance	Seconds	4344 ± 252	4566 ± 348

Table 2 Subgroup analysis for the effect of caffeine ingestion on maximum running distance, time trial performance and muscle power using a random effect model.

	Maximum Running Distance			Time Trial Performance			Muscle Power		
	n	Effect size (95% CL)	p=	n	Effect size (95% CL)	p=	n	Effect size (95% CL)	p=
Dosage									
6 mg·kg−1	1	-	-	4	-0.45 (-0.81 to -0.08)	0.01	1	-	-
>6 mg·kg−1	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<6 mg·kg−1	1	-	-	3	-0.32 (-0.80 to 0.15)	0.18	2	0.26 (-0.29 to 0.81)	0.35

Assessment of quality and publication bias

Two of the studies assessed had a clear description of the random sequence generation (low risk of bias). Only one study reported allocation concealment (low risk of bias). A complete description of blinding of participants (low risk of bias) was observed in 11 studies, and blinding of personnel (low risk of bias) in 8 studies. One article had complete information on blinding of outcome assessors (low risk of bias); one article had incomplete outcomes (high risk of bias). All 13 evaluated studies reported selective outcomes describing the results and what had been identified (low risk of bias). These 13 studies were insufficient to assess other risks of bias (unclear risk of bias) (Figure 2).

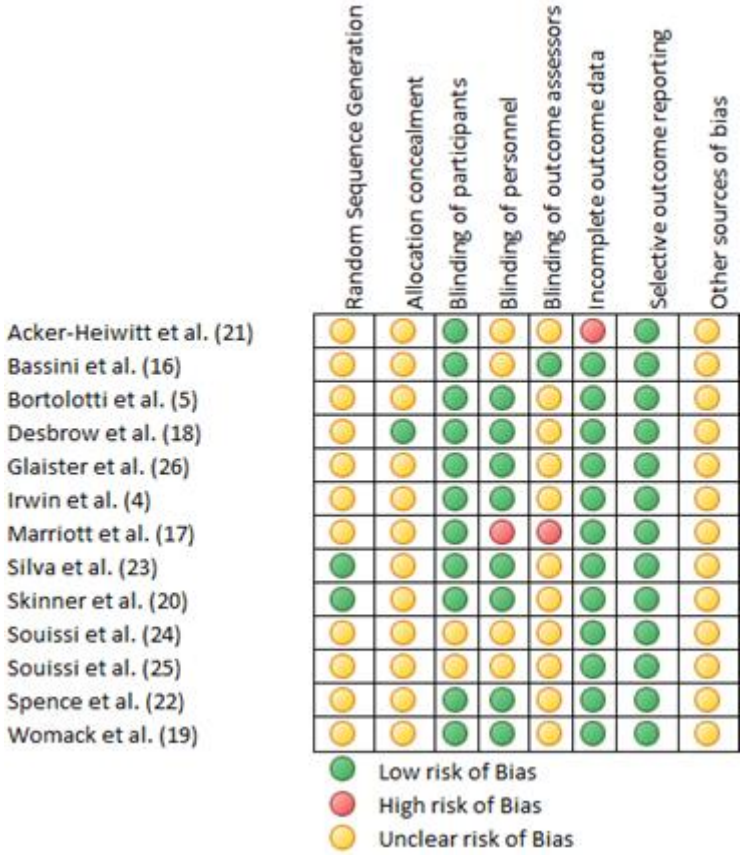


Figure 2. Summary of the quality of the 13 studies.

Effect of caffeine intake on maximum running distance

Two of the studies applied the yo-yo test (i.e., field test designed to estimate the maximum oxygen uptake - VO2max and the maximum running distance by athletes) to assess the maximum running distance of the subjects. The authors used caffeine dosage of 5 mg/kg of body weight[16] and 6 mg/kg of body weight[17] and found no improvement in the maximum running distance of the

subjects (effect size = 0.37, p= 0.14, interpretation: small; Figure 3). The I2 statistic showed minimal heterogeneity between the studies (I2= 0.00; p= 0.55).

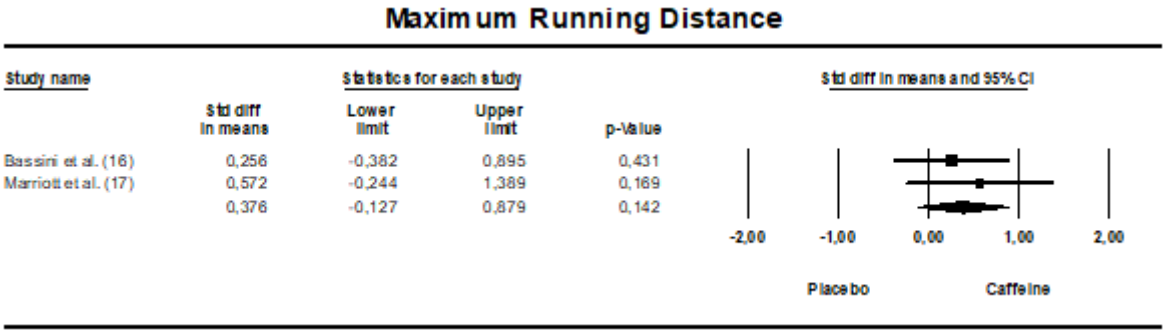


Figure 3. Forest plot of the total effect size from the two studies that assessed the effect of caffeine intake on maximum running distance.

Effect of caffeine intake on time trial performance

Seven studies were included in the evaluation of time trial performance in cycling. Four of these studies used a caffeine dosage of 6 mg/kg of body weight[5,18–20], two studies used a caffeine dosage of 3 mg/kg of body weight[21,4] and one study used an intake fixed dose of 200 mg of caffeine (~2.5 mg/kg of body weight)[22]. Desbrow et al.[18] and Irwin et al.[4] evaluated the shortest time to reach a target amount of work among cyclists. Bortolotti et al.[5] and Acker-Hewitt et al.[21] applied a distance of 20 km, whereas Spence et al.[22], Skinner et al.[20] and Womack et al.[19] used a distance of 40 km. The studies showed an improvement in time trial performance among the subjects who ingested caffeine (effect size= −0.40, p< 0.01, interpretation: small; Figure 4). The I2 statistic showed minimal heterogeneity between the studies (I2= 0.00; p= 0.87).

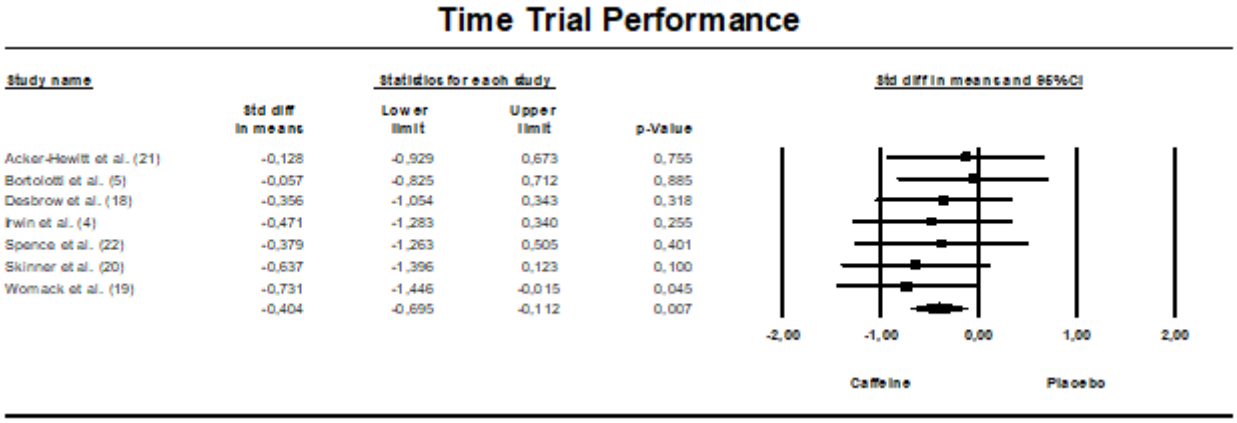


Figure 4. Forest plot of the total effect size from the seven studies that assessed the effect of caffeine ingestion on time trial performance.

Effect of caffeine intake on muscle power

Four studies evaluated muscle power generated in cycling. Three of these studies[23–25] used the Wingate test; the other study[26] used seven sprints for a maximum of 10 seconds. The average dosage of caffeine was 6.5 mg/kg of body weight. The studies did not show an improvement in the muscle power generated by the subjects who ingested caffeine (effect size = 0.17, p= 0.36, interpretation: trivial; Figure 5). The I2 statistic showed minimal heterogeneity between the studies (I2= 0.00; p= 0.94).

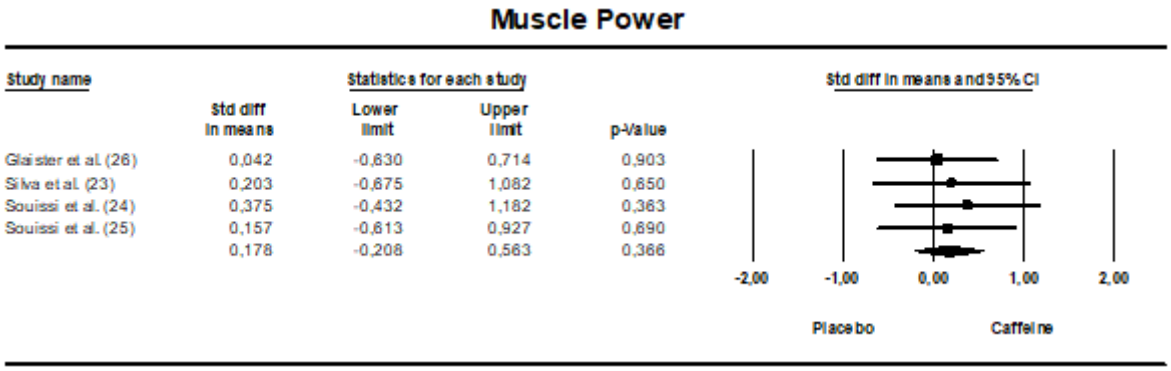


Figure 5. Forest plot of the total effect size from the four studies that assessed the effect of caffeine ingestion on muscle power in cycling.

Discussion

The aims of this systematic review and meta-analysis were to evaluate the effects of caffeine supplementation on athletic performance. The main finding of this study was that caffeine improves performance on the time trials performance, but not on maximum running distance and muscle power test. In addition, subgroup analysis revealed that the effect of caffeine in the time trials performance test may be related to 6 mg/kg of body weight dosage.

The exact mechanisms by which caffeine exerts ergogenic effects are still under debate, with suggested mechanisms including fatty acid mobilization and oxidation and endogenous glycogen content sparing, attenuating fatigue[27]. The studies included in the evaluation of the maximum running distance did not improved performance with the use of caffeine (p= 0.14). In the individual analysis of the studies there was no response of caffeine. According to the hypothesis of Bassini et al.[16], the hyperammonic state changes the function of the blood-brain barrier and is postulated to cause central fatigue during exercise. However, we observed that the maximum running distance was small to induce hyperammonemia in athletes and consequently it was also small to test the positive ergogenic effect of caffeine. Marriot et al.[17] reported high variation in maximum running

distance between assessed subjects, which they attributed to the existence of “high” and “low” responders to caffeine.

Subgroup analyses revealed that the improvement in time trial results may be related to the dose. According to Desbrow et al.[18], the use of high caffeine dosage could increase blood concentration of epinephrine and improve performance during the time trials performance test. Skinner et al.[20] explained that independent of dosage, for the ergogenic benefit of the peripheral action of caffeine to occur, greater availability of muscle is required (i.e., increased concentrations of caffeine at the site of action). Additionally, Irwin et al.[4] showed that acute caffeine supplementation positively affected exercise performance. The positive ergogenic effect of caffeine was found to be related to alteration in the rating of perceived exertion. Desbrow et al.[18] suggested that this mechanism (i.e., the central effects mediated by adenosine receptor antagonism) might explain the ergogenic effect of caffeine on exercise performance by using the time trials performance.

The null findings obtained in the studies of Acker-Hewitt et al.[21] and Bortolotti et al.[5] may relate to the nature of the performance protocol. Bortolotti et al.[5] used closed-loop protocol time trials. This allowed for the development of strategies during the test to finish in the shortest possible time, preventing the athlete from reaching exhaustion. On the other hand, although different doses of caffeine were used, there were similarities in the methodologies applied by Bortolotti et al.[5], Acker-Hewitt et al.[21], and Spence et al.[22]. In these three studies, participants ingested caffeine 60 minutes before the test and were instructed not to ingest any food or drink that might contain caffeine 48 hours before testing.

Regular consumption of caffeine has been associated with an upregulation of the number of adenosine receptors in the vascular and neural tissues of the brain[28,29]. Based on these observations, it could be speculated that habitual and non-habitual caffeine consumers would respond differently to caffeine supplementation during exercise. The minimum period of caffeine fasting in diet that is needed to obtain greater sensitivity to its action is not well established in the literature. Tavares and Sakata[30] indicated that the time required for the beginning of abstinence varies between 12 and 24 hours after cessation of consumption but could range between 48 and 216 hours. In the articles evaluated in the current study, it is possible that the subjects had low sensitivity to caffeine, which would require a longer period of abstinence and/or an increase in the dosage used. In particular, in Spence et al.[22], subjects were consumers of caffeine; thus, the dosage of 2.5 mg/kg of body weight used may be considered low. In fact, Warren et al.[31] indicated in their meta-analysis that the commonly used caffeine dosage was 4-6 mg/kg of body weight.

These results reinforce the notion that responses to caffeine may be triggered by other factors, such as genetics, rather than habitual caffeine intake per se. According to Womack et al.[19], genetic polymorphisms in genes related to caffeine metabolism (aryl-hydrocarbon receptor [AHR], cytochrome P450 1A1 and 1A2 (CYP1A1-CYP1A2, Prenyl (Decaprenyl)) are a potential explanation for the variability in the ergogenic response to caffeine supplementation in trained cyclists. These authors reported a significant main effect of supplementation with 6 mg/kg of body weight of anhydrous caffeine on the performance of cyclists. Given these prior findings, it could be hypothesized that a slower metabolism would be advantageous for maximizing the ergogenic benefit of caffeine. However, the major finding of their study was that caffeine affected the 40-km TT performance of cyclists homozygous for the AA (i.e., caffeine is metabolized at a higher rate) variant to a greater degree compared with cyclists with the C (i.e., caffeine is metabolized at a lower rate) variant. Specifically, caffeine decreased the 40-km TT time by an average of 3.8 minutes in the AA homozygotes compared with 1.3 minutes in the C-allele carriers. The authors speculate that the rapid accumulation of caffeine metabolites may have been responsible for the positive ergogenic effect in AA homozygotes. Paraxanthine and theophylline (metabolites downstream of caffeine metabolism) have higher binding affinities with adenosine receptors than caffeine[32]. Thus, it is possible that a faster caffeine metabolism in AA homozygotes created a faster production of paraxanthine and/or theophylline and thus increases the ergogenic effect.

It has been suggested that caffeine increases strength and muscle power performance through greater motor unit firing rates, increased calcium release from the sarcoplasmic reticulum, and surges in nitric oxide concentrations, working collectively to produce stronger muscle contractions[33]. However, it is possible that slow-twitch fibers are more sensitive to such action than fast-twitch fibers[34,35], which could help to explain the limited ergogenic effect upon maximal strength and muscle power. In their evaluation of the contractile properties of skeletal muscle, Souissi et al.[24], Souissi et al.[25], Silva et al.[23] and Glaister et al.[26] suggest that the positive benefit of caffeine use in cyclists may be more effective in longer time evaluations of muscle power compared to shorter tests. Thus further research is needed to elucidate the ergogenic effects of caffeine during muscle strength exercises.

Conclusion

In conclusion, this meta-analysis showed that caffeine intake does not improve performance in maximum running distance and muscle power, but seems to improve time trial performance. The potential effect of caffeine on time trial performance related to caffeine dose. The results of the

present study contribute to the knowledge of the ergogenic effects of caffeine in several tests that evaluate athletic performance.

Financial Support This work was supported by Research Support Foundation of Rio de Janeiro FAPERJ - Brazil. Edict Innovations in Sports E-26/190.298. FAPERJ had no role in the design, analysis or writing of this article.

References

1. Del Coso J. Munoz G. Munoz-Guerra J. Prevalence of caffeine use in elite athletes following its removal from the World Anti-Doping Agency list of banned substances, Appl Physiol Nutr Metab 2011; 36: 555-561.

2. Desbrow B. Leveritt M. Awareness and use of caffeine by athletes competing at the 2005 Ironman Triathlon World Championships, Int J Sport Nutr Exerc Metab 2006; 16: 545-558.

3. Desbrow B. Leveritt M. Well-trained endurance athletes' knowledge, insight, and experience of caffeine use, Int J Sports Nutr Exerc Metab 2007; 17: 328-339.

4. Irwin C. Desbrow B. Ellis Λ Rant BO. Leveritt M. Caffeine withdrawal and high-intensity endurance cycling performance, J Sports Sci 2011; 29: 509-515.

5. Bortolotti H. Altimari LR. Vitor-Costa M. Cyrino ES. Performance during a 20-km cycling time-trial after caffeine ingestion, J Int Soc Sports Nutr 2014; 11: 1-7.

6. Clausen T. Na+-K+ pump regulation and skeletal muscle contractility, Physiol Rev 2003; 83: 1269-1324.

7. Doherty M. Smith P. Hughes M. Davison R. Caffeine lowers perceptual response and increases power output during high intensity cycling. J Sports Sci 2004; 22: 637-643.

8. Roy BD. Bosman MJ. Tarnopolsky MA. An acute oral dose of caffeine does not alter glucose kinetics during prolonged dynamic exercise in trained endurance athletes, Eur J Appl Physiol 2001; 85: 280- 286.

9. Van Soeren MH. Sathasivam P. Spriet LL. Graham TE. Caffeine metabolism and epinephrine responses during exercise in users and nonusers, J Appl Physiol 1993; 75: 805-812.

10. Davis JM. Zhao Z. Stock HS. Mehl KA. Buggy J. Hand GA. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 284: 399-404.

11. An SM. Park JS. Kim SH. Effect of energy drink dose on exercise capacity, heart rate recovery and heart rate variability after high-intensity exercise, J Exerc Nutrition Biochem 2014; 18: 31-39.

12. Goldstein E. Jacobs PL. Whitehurst M. Penhollow T. Antonio J. Caffeine enhances upper body strength in resistance-trained women, J Int Soc Sports Nutr 2010; 14: 7-18.

13. Jacobs I. Pasternak H. Bell DG. Effects of ephedrine, caffeine, and their combination on muscular endurance, Med Sci Sports Exerc 2003; 35: 987-994.

14. Williams AD. Cribb PJ. Cooke MB. Hayes A. The effect of ephedra and caffeine on maximal strength and power in resistance trained athletes, J Strength Cond Res 2008; 22: 464-470.

15. Higgins JP. Altman DG. GØtzsche PC. Jüni P. Moher D. Oxman AD. Savovic J. Schulz KF. Weeks L. Sterne JA. Cochrane Bias Methods Group. Cochrane Statistical Methods Group. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials, BMJ 2011; 343: d5928.

16. Bassini A. Magalhães-neto AM. Sweet E. Bottino A. Veiga C. Marta B. Tozzi MB. Pickard MB. Cameron L. Caffeine decreases systemic urea in elite soccer players during intermittent exercise, Med Sci Sports Exerc 2013; 45: 683-690.

17. Marriott M. Krustrup P. Mohr M. Ergogenic effects of caffeine and sodium bicarbonate supplementation on intermittent exercise performance preceded by intense arm cranking exercise, J Int Soc Sports Nutr 2015; 12: 1-8.

18. Desbrow B. Biddulph C. Devlin B. Grant GD. Anoopkumar- Dukie S. Leveritt MD. The effects of different doses of caffeine on endurance cycling time trial Performance, J Sports Sci 2011; 30: 115-120.

19. Womack CJ. Saunders MJ. Bechtel MK. Bolton DJ. Martin M. Luden ND. Dunham W. Hancock M. The influence of a CYP1A2 polymorphism on the ergogenic effects of caffeine, J Int Soc Sports Nutr 2012; 9: 1-7.

20. Skinner TL. Jenkins DG. Taaffe DR. Leveritt MD. Coombesa JS. Coinciding exercise with peak serum caffeine does not improve cycling performance, J Sci Med Sport 2013; 16: 54-59.

21. Acker-Hewitt TL. Shafer BM. Saunders MJ. Goh Q. Luden ND. Independent and combined effects of carbohydrate and caffeine ingestion on aerobic cycling performance in the fed state, Appl Physiol Nutr Metab 2012; 37: 276-283.

22. Spence AL. Sim M. Landers G. Peeling P. A comparison of caffeine versus pseudoephedrine on cycling Time-Trial performance, Int J Sports Nutr Exerc Metab 2013; 23: 507512.

23. Silva CG. Cavazzotto TG. Queiroga MR. Supplementation of caffeine and anaerobic power indicators, Rev Educ Fís 2014; 25: 109-116.

24. Souissi M. Abedelmalek S. Chtourou H. Atheymen R. Hakim A. Sahnoun Z. Effects of morning caffeine ingestion on mood states, simple reaction time, and short-term maximal performance on elite judoists, Asian J Sports Med 2012; 3: 161-168.

25. Souissi M. Chtourou H. Abedelmalek S. Ghozlane IB. Sahnoun 7. The effects of caffeine ingestion on the reaction time and short-term maximal performance after 36 h of sleep deprivation, Physiol Behav 2014; 131: 1-6.

26. Glaister M. Patterson SD. Foley P. Pedlar CR. Pattison JR. McInnes G. Caffeine and sprinting performance: dose responses and efficacy, J Strength Cond Res 2012; 26: 1001-1005.

27. Magkos F. Kavouras SA. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action, Crit Rev Food Sci Nutr 2005; 45: 535-562.

28. Fredholm BB. Adenosine actions and adenosine receptors after 1 week treatment with caffeine, Acta Physiol Scand 1982; 115: 283-286.

29. Fredholm BB. Battig K. Holmen J. Nehlig A. Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use, Pharmacological reviews 1999; 51: 83-133.

30. Tavares C. Sakata RK. Caffeine in the treatment of pain, Rev Bras Anestesiol 2012; 62: 387-401.

31. Warren GL. Park ND. Maresca RD. McKibans KI. Millard- Stafford ML. Effect of caffeine ingestion on muscular strength and endurance: a meta-analysis, Med Sci Sports Exerc 2010; 42: 1375-1387.

32. Daly JW. Butts-Lamb P. Padgett W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines, Cell Mol Neurobiol 1983; 3: 69-80.

33. Kalmar JM. The influence of caffeine on voluntary muscle activation, Med Sci Sports Exerc 2005; 37: 2113-2119.

34. Mitsumoto H. DeBoer GE. Bunge G. Andrish JT. Tetzlaff JE. Cruse RP. Fiber-type specific caffeine sensitivities in normal human skinned muscle fibers, Anesthesiol 1990; 72: 50-54.

35. Pagala MK. Taylor SR. Imaging caffeine-induced Ca2+ transients in individual fast-twitch and slow-twitch rat skeletal muscle fibers, Am J Physiol 1998; 274: C623-632.

7.2. MANUSCRITO 2

Caffeine supplementation for 4-day, followed by acute ingestion, did not impact triathlete output power after submaximal intensity exercise

Abstract

The aim of this study was to test the hypothesis that caffeine supplementation (6 mg·kg-1 body mass) for 4-days, followed by acute intake, would impact five male triathletes output power after performed submaximal intensity exercise. This was a randomized, doubleblind, placebo-controlled crossover study, placebo (4-days) - placebo (acute) PP, placebo (4-day) -caffeine (acute) PC, and caffeine (4-day) - caffeine (acute) CC. Participants abstained from dietary caffeine sources for 4 days and ingested capsules containing either placebo or caffeine (6 mg.kg-1 body mass day in one absorption). The acute trials the capsules containing placebo or caffeine (6 mg.kg-1 body mass day in one absorption) were ingested 60min before completing exercise in a treadmill for 40min (80% VO2max) and to perform the Wingate test. Blood lactate was determined before, 60min after ingestion, and immediately after the exercise on the treadmill, the Wingate test, and after the recovery (10-min). CC and PC trials did not change the cardiopulmonary variables ($P>0.05$) and the anaerobic power variables (peak/mean power output and fatigue index) ($P>0.05$). The PC trial compared with PP promoted improvements in the curve power output in 2 sec by 31.19% (large effect-size $d = 1.08$; $P<0.05$) and 3 sec by 20% (large effect-size $d = 1.19$; $P<0.05$). A 10min recovery was not sufficient to reduce blood lactate concentration in the PC trial compared with PP (PC, 13.73±2.66 vs. PP, 10.26±1.60 mmol.L-1 ; $P<0.05$, respectively) ($P<0.05$). In conclusion, these results indicate that caffeine supplementation (6 mg·kg-1 body mass) for 4 days, followed by acute ingestion, did not impact the triathletes output power after performed submaximal intensity exercise. Nutritional interventions may help researchers and athletes to adapt strategies for manipulating caffeine use.

Key-words: caffeine metabolism, Wingate test, blood lactate, performance.

Introduction

Several physiological attributes contribute to the success of endurance exercises [1], including the interaction between the realization of submaximal (i.e., ≤ 99% of VO2max) and maximal exercises [2]. To date, a wide range of acute and chronic interventions have been investigated regarding performance improvement in endurance exercises [3,4]. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) has been described as an effective ergogenic aid for enhancing performance in various sports [5-10]. Many researchers [11,12] have argued that the primary focus behind the ventilatory effect (i.e., increased alveolar ventilation) of caffeine is the central stimulation of the respiratory medullary complex. The explanations proposed by Chapman and Stager [12] are that the acute use of caffeine significant increase in minute ventilation (VE) during submaximal exercise, and this result in a rise in improving arterial oxyhemoglobin saturation (SaO2) and oxygen delivery to the working musculature. Furthermore, the acute use of caffeine may improve the coupling excitation/contraction by facilitating Ca+ exchange of the sarcoplasmic reticulum and/or by increasing the myofibrillar sensitivity for this ion [9]. This would result in positive changes in the power parameters of athletes [9,10].

To determine the ideal conditions for maximizing the physiological effects of caffeine, source [13], the timing of intake [14] and habituation [15] have been investigated. Chronic habituation to caffeine impacts the concentration of A1 and A2A receptors in various brain regions [16,17] and expression of A2A/A2B receptors distributed in the sarcolemma of skeletal muscle [18].

This includes A2A expression in the striatum, a subcortical region essential for coordinating motor activity [19], and oxygen consumption [4]. Moreover, the expression of A2A/A2B receptors of skeletal muscle is involved in the regulation of contractility of type I and type II fibers [18]. On this premise, it has been speculated whether caffeine intake exceeding usual consumption for a shorter period (i.e., four days) could lead to tolerance to the ergogenic effects of caffeine already demonstrated for long periods (≥ 20 days) [4,17].

The aim of this study was to test the hypothesis that caffeine supplementation (6 mg·kg1 body mass) for 4-days, followed by acute intake would impact output power triathletes after performed submaximal intensity exercise.

Methods

Subjects

Five male triathletes federated from the state of Rio de Janeiro, all participants in national competitions in Brazil. The athletes presented (mean ± SD) were aged 33.0 ± 7.4 years, had a body mass of 75.79 ± 8.3 kg, and height of 179.4 ± 4.3 cm. All of them had at least 3.8 ± 1.2 years of

experience in the sport. No athlete had a medical history of the cardiopulmonary disease or used any medication during the study. Habitual caffeine consumption was assessed using an adapted version of the Landrum, Meliska and Loke [20] caffeine consumption questionnaire. The athletes were regular consumers of caffeine (242 ± 39 mg.day-1) with <300 mg.day-1 defined as low habitual caffeine consumption and >300 mg.day-1 as high habitual caffeine consumption [21]. In addition, a 24-hour dietary record was completed by each athlete before the first trial, it was then photocopied and handed back to the athletes so that the same diet could be repeated for subsequent trials (daily energy, 4016 ± 1119 kcal; carbohydrate, 52.39 ± 17.26%; protein, 16.51 ± 6.68%; fat, 31.08 ± 10.96%). Energy and macronutrient intake were analyzed by the software Dietpro® 5i (Dietpro, Minas Gerais, Brazil). All participants were notified of the investigation procedures, requirements, benefits, and risks before providing written consent. The protocol (2.540.958/2018) was approved by the Scientific and Ethics Committee of the Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Study design

This is a randomized, placebo-controlled, double-blind crossover study: placebo (supplementation for 4 days) - placebo (acute supplementation) (PP; n = 5); placebo (supplementation for 4 days) - caffeine (acute supplementation) (PC; n = 5); and caffeine (supplementation for 4 days) - caffeine (acute supplementation) (CC; n = 5). Each athlete visited the laboratory on four occasions. The first visit involved a preliminary confirmation of the maximum exercise capacity on the treadmill (i.e., cardiopulmonary exercise testing) to determine maximal oxygen uptake (VO2max) (Table I), assessment of daily caffeine consumption, familiarization with the protocol in the submaximal exercise at steady-state treadmill, and familiarization with the test in the cycle ergometer (Wingate test). From the first to the fourth day, the athletes were instructed to withdraw all their caffeine consumption (i.e., food sources of caffeine). The athletes were also instructed to continue the routine per week training (Table II). Experimental trials involved supplementation for four days (athletes were instructed to ingest single daily dose at a similar time: 8:00 a.m.) of placebo (250 mg magnesium silicate) or caffeine (6 mg.kg-1 body mass) capsules (first, second, third and fourth days). Acute supplementation consisted of ingestion of the capsules of placebo (250 mg magnesium silicate) or caffeine (6 mg.kg-1 body mass; the capsules were ingested with 250 ml of water) on the day of the experimental trials in the laboratory (fifth day). During supplementation for four days, the athletes were monitored by telephone contact, e-mail, and in-person [17]. On the second, third, and fourth visits (fifth day, acute supplementation), the athletes arrived at the laboratory (without performing any physical activity 24 h before) fasting (8 h) and subsequently an intravenous cannula (20G Jelco, B. Braun Medical Inc., USA) was then

inserted into a forearm, and then a blood sample (10 ml) was obtained before capsule ingestion (Rest). The amount of time to collect each sample was ~150 seconds. After ingestion of the capsules, athletes remained in the tests area for 60 min without performing any physical activity, and immediately after the second blood sample was collected (AC). The athletes then underwent a 5-min warm-up on an exercise treadmill (50% VO2max), and after performing the submaximal exercise in the treadmill for 40 min (80% VO2max), a blood sample was collected (SE). Then the athletes performed the test on the cycle ergometer, and two blood samples were collected immediately after (WT) and 10 min after (R). During the 10-min recovery, the athletes were lying on a stretcher and did not make any physical effort. Two days of intervals (i.e., washout) between experimental trials were established. The experimental trials were performed at the same time of day (7:00 a.m.). During the experimental trials (fifth day, acute supplementation), the temperature of the laboratory was regulated between 20°C and 22°C (Figure 1).

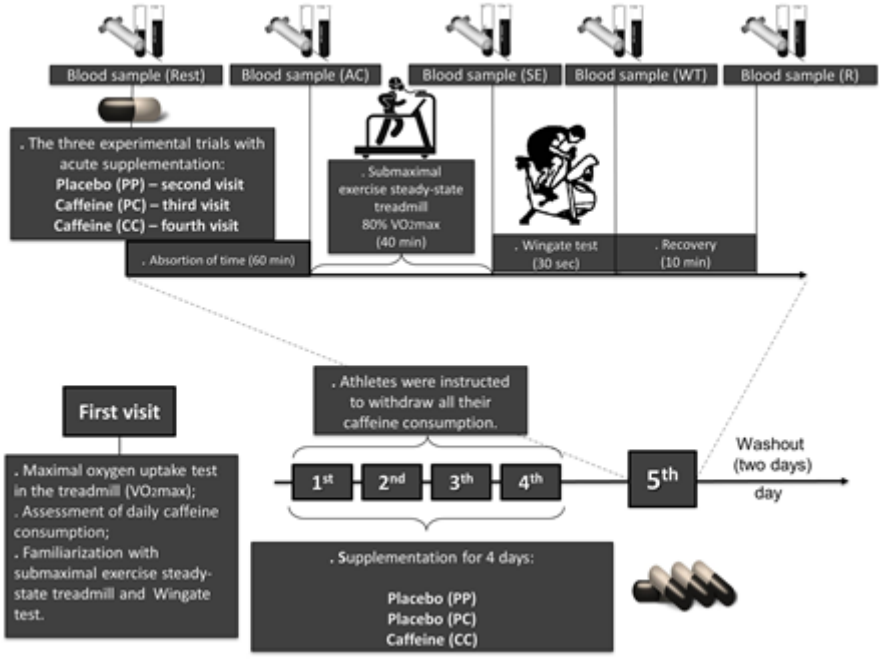


Figure 1 - Experimental design.

Maximal oxygen uptake incremental test in the treadmill

All triathletes were assessed using the same ramp protocol on a treadmill (ATL/Inbramed, Porto Alegre, Brazil) programmed to achieve the maximum duration of 8 to 14 min. After a 1-min walk at 5.5 km/h, the velocity was rapidly increased to 6 km/h and then increased by 0.14 km/h every 7.5 s (1.12 km/h every minute), maintaining treadmill inclination of 1% [22]. The heart rate was measured every 3 breaths (breath by breath) from a continuous recording on third derivations (using MC5, V2, and AVF) measured by a digital electrocardiograph ErgoMet (HeartWare, Belo

Horizonte, Brazil) with the ErgoMet software version 1.0.3.2 (HeartWare). Ventilatory expired gas was collected with a preVent® pneumotachograph (MedGraphics, St. Paul, MN) with the aid of a neoprene mask and was analyzed by VO2000 (MedGraphics), which was calibrated. The adapted criteria to ensure a maximal exercise test were (a) achievement of maximum voluntary exhaustion, despite verbal encouragement, accompanied by a rate of perceived exertion (adapted Borg scale, 0-10 points) and (b) a respiratory exchange ratio greater than 1.10 [22].

Submaximal exercise steady-state treadmill

After the 5-min warm-up on the treadmill (50% VO2max), the athletes performed the exercise on a steady-state treadmill with a submaximal protocol of 40 min (80% VO2max). Athletes were monitored every 5min with the following cardiopulmonary variables: heart rate (HR), maximal oxygen uptake (VO2), carbon dioxide production (VCO2), minute volume (VE), O2 expiration fraction (FeO2), and rate of perceived exertion (RPE) (adapted Borg scale, 0-10 points).

Inertial Wingate test

After performing the submaximal exercise steady-state treadmill, the triathletes performed the Wingate test. Before the test, the following instructions were given by the investigators: (i) in the first seconds of the test, they should pedal from 0 rpm to the greatest pedaling velocity possible (rpm) for 30 sec; and (ii) maintain this high-power level during the longest possible time until the test end [23]. Two of the authors motivated the subjects during the test duration. The Wingate test was performed in a cycle ergometer of mechanical resistance (Biotec 2100, Cefise®, São Paulo, Brazil) with double sensors and weights of basket. The resistance was established with each athlete's body mass (0.075 kg·kg-1). The cycle ergometer was connected to a laptop using “Ergometric” software (version 7.0, Cefise®) for the collection and storage of data, such as peak power output (Watts), mean power output (Watts), fatigue index (peak power output - minimum power output) / peak power output × 100) (%) and curve power output (Watts).

Blood caffeine and lactate analysis

The measurement of blood levels of caffeine and lactate was performed in Rest, AC, SE, WT, and R. Liquid chromatography was adapted from Ribeiro et al. [5]. The liquid chromatographic analyses were carried out using a Shimadzu chromatograph (Shimadzu® Corp., Kyoto, Japan), equipped with an LC-20AT quaternary solvent pump unit, an SPD-M20A diode array detector operating at 274 nm. The caffeine analyses were performed at 35°C using a column oven model CTO-20A, and solvent degassing was performed by a DGU-20A5 degasser. An LCsolution™ software, version 1.25 SP1, was used for system control and data acquisition. The

caffeine was extracted from human serum by a protein precipitation procedure. Aliquots of 200 µL of drug-free human serum were spiked with 25 µL of caffeine working solutions or samples obtained from the athletes and were transferred to 10-mL conical glass tubes. Then, 25 µL of pentoxifylline solution (60 µg/mL) was used as internal standard and 300 µL of methanol was added. This mixture was vortex agitated for 1 min and then centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Finally, 250 µL of the supernatant was collected, and 50 µL was analyzed by HPLC. The quantification of caffeine in serum was carried out using a calibration curve obtained by spiking aliquots of drug-free serum with working solutions of caffeine at concentrations of 1.2, 3.6, 8, 40, 120, and 240 µg/mL resulting in concentrations of 0.15, 0.45, 1.0, 5, 15, and 30 µg/mL in a drugfree serum. Plotting was performed by the ratio of caffeine and internal standard peak areas (y) versus theoretical caffeine concentrations (x). Measurement of blood levels of lactate was performed to evaluate possible changes induced by the interventions. After collection, the blood samples were deposited in tubes with the presence of sodium fluoride. Plasma was obtained by centrifugation at 2.500 rpm at 4oC for 20 min. The resultant plasma was stored at -20oC until the analyses could be performed. We used commercial kits (Labtest, Brazil) and the BIO200 analyzer (Bioplus®, São Paulo, Brazil) [4]. All analyses were made in triplicate.

Statistical analysis

All values are expressed as mean ± SD and coefficient of variation (CV). The ShapiroWilk test was used to verify the normality of the data. Two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey post hoc test was used to compare the differences between the PP, PC, and CC in routine per week training, in blood measurements (caffeine and lactate), in cardiopulmonary variables (HR, VO2, VCO2, VE, FeO2 and RPE), and in anaerobic power (peak power output, mean power output, fatigue index and curve power output). A Cohen's d effect size was calculated to quantify the differences between the PP, PC, and CC trials anaerobic power (peak power output, mean power output, fatigue index and curve power output) and concentration lactate. A P value of <0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using SPSS 16.0 software for statistical analyses (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Table I - The values obtained in the maximum incremental test are shown in Table I.

Variables	Mean ± SD	CV (%)
$HR_{max}(bpm^{-1})$	181 ± 8.86	4.90
$VO_{2max}(ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1})$	55.12 ± 2.90	5.27
$VCO_{2max}(ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1})$	67.43 ± 2.85	4.23
$VE_{max}(1 \cdot min^{-1})$	110.73 ± 6.94	6.27
RER_{max}	1.36 ± 0.05	4.34
Borg	10 ± 0.00	0.00
Maximum speed on treadmill (Km/h_{max})	19.64 ± 0.53	4.27

HRmax = maximum heart rate; VO2max = maximum oxygen uptake; VCO2max = maximum output of carbon dioxide; VEmax = maximum minute ventilation; RERmax = respiratory exchange ratio; Km/hmax = maximum speed reached. Adapted Borg rate of perceived exertion RPE (0-10 points).

In Table II, values obtained in routine per week training prior to acute experimental trials. There were no significant differences found (P>0.05).

Table II - Training routine per week (hours). Mean ± SD (n = 5).

	n = 5	n = 5	n = 5	
Sports Modality	PP	PC	CC	*P*=
Swimming	2.2 ± 0.83	1.8 ± 0.83	1.8 ± 0.83	0.69
Cycling	4.1 ± 1.34	3.2 ± 1.64	3.4 ± 2.30	0.72
Running	3.0 ± 1.00	2.2 ± 1.30	2.8 ± 1.64	0.63

PP, placebo-placebo; PC, placebo-caffeine; CC, caffeine-caffeine.

Figures 2 A, B, C, D, E and F show that between both experimental conditions (PP, PC, and CC), there were no significant differences in cardiopulmonary responses (group x time interaction: HRP=0.33; VO2P=0.07; VCO2P=0.08; VE P=0.08; FeO2P=0.17) and the rate of perceived exertion (RPE P=0.51) over time for 40 min.

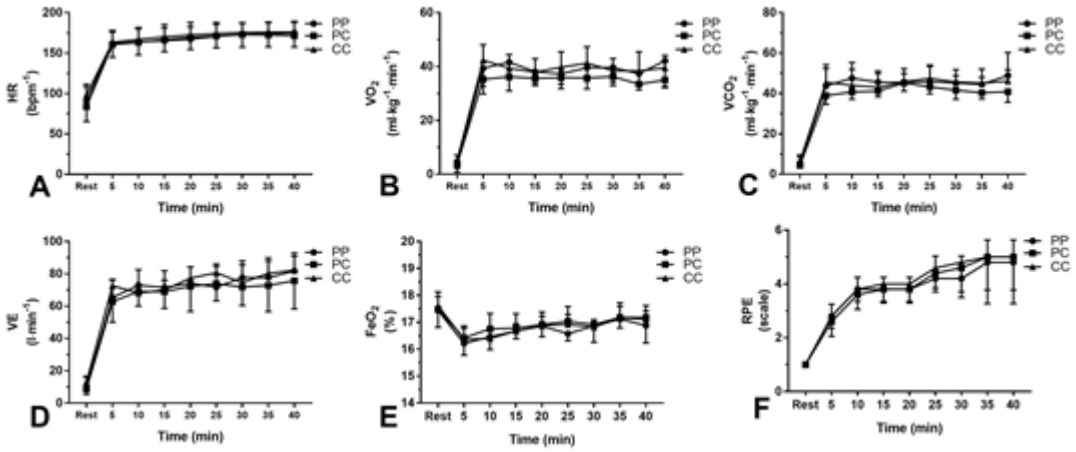


Figure 2 - Cardiopulmonary responses of the following variables: (A) heart rate, (B) oxygen uptake, (C) output of carbon dioxide, (D) minute ventilation, (E) expired oxygen fraction, and (F) rate of perceived exertion. Error bars represent the standard deviation of the mean.
(PP, placebo-placebo [n = 5]; PC, placebo-caffeine [n = 5]; CC, caffeine-caffeine [n = 5]).

Figures 3 A, B, and C shows that between both experimental conditions, there were no significant differences in peak power output (PC, 826.99 ± 109.57 vs. PP, 779.76 ± 72.44 watts; p=0.70; CC, 822.84 ± 88.92 vs. PP,779.76 ± 72.44 watts; PC, 826.99 ± 109.57 vs. CC, 822.84 ± 88.92 watts; P=0.99), mean power output (PC,645.08 ± 74.91 vs. PP,625.89 ± 47.67 watts; P=0.98; CC,637.49 ± 67.99 vs. PP,625.89 ± 47.67 watts; P=0.97; PC, 645.08 ± 74.91 vs.CC, 637.49 ± 67.99watts; P=0.97) and fatigue index (PC, 68.61 ± 12.85 vs. PP, 75.54 ± 12.88 %; P=0.57; CC, 79.32 ± 2.98 vs. PP, 75.54 ± 12.88 %; p=0.84; PC, 68.61 ± 12.85 vs.CC, 79.32 ± 2.98%: large effect-size d = -1.14; P=0.28). In Figure 3D, significant differences between the experimental condition in power curve in time of the 2 sec (PC, 657.05 ± 138.36 vs. PP, 497.54 ± 155.58 watts: large effect-size d = 1.08; P<0.05) and 3 sec (PC, 792.48 ± 102.31 vs. PP, 660.00 ± 119.45 watts: large effect-size d = 1.19; P<0.05) were observed.

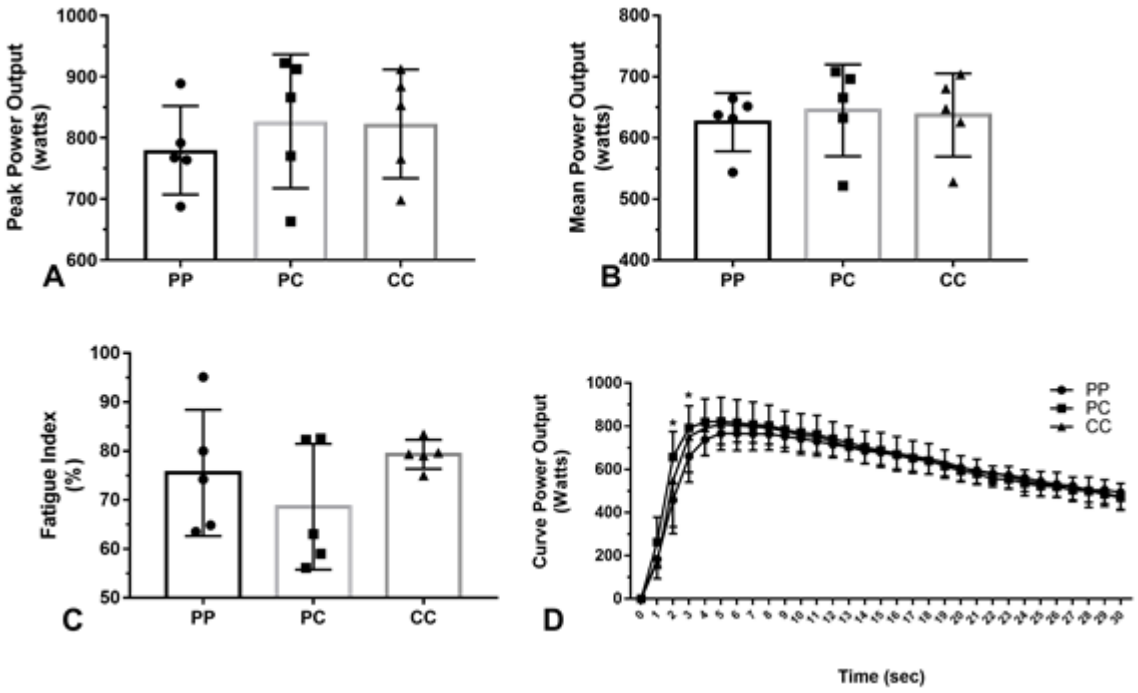


Figure 3 - Power variables in the figures (A) peak power output, (B) mean power output, (C) fatigue index, and (D) curve power output recorded in the Wingate test of the athletes according to the experimental conditions (PP, placebo-placebo [n = 5]; PC, placebo-caffeine [n = 5]; CC, caffeine-caffeine [n = 5]). Error bars represent the standard deviation of the mean. (*) Significant difference between the PC vs. PP trials (P<0.05).

In Figure 4, serum concentration of caffeine was not observed in the PP trial (Rest, AC, SE, WT, and R). We found significant differences (P<0.05) in serum caffeine levels in the PC trial (AC, 6.75±0.81 µg/mL-1; SE, 7.29±0.67 µg/mL-1; WT, 7.13±0.57 µg/mL-1; and R, 7.46±1.16 µg/mL-1) and CC trial (AC, 7.19±0.83 µg/mL-1; SE, 7.37±0.674 µg/mL-1; WT, 7.47±0.72 µg/mL1; and R, 7.56±0.85 µg/mL-1) compared to PP trial. In figure 4 B, significant differences between the experimental condition PC 13.73±2.66 vs. PP 10.26±1.60 mmol.L-1 trials (large effect-size d = 1.58; P<0.05) in lactate blood concentration after 10-min recovery (R) were observed. There were significant differences in the concentration of lactate in PC trial (Rest 1.11±0.27 vs. ES 5.48±2.71 mmol.L-1 ; large effect-size: d = 2.26; P<0.05) and in CC trial (Rest 1.35±0.55 vs. ES 5.59±3.79 mmol.L-1 ; large effect-size: d = 1.56; P<0.05). There were significant differences in the concentration of lactate in PP (Rest 1.35±0.55 vs. WT 13.52±2.49 mmol.L-1 ; large effect-size: d = 6.74; P<0.05), PC (Rest 1.11±0.27 vs. WT 14.49±2.34 mmol.L-1 ; large effect-size: d = 8.03; P<0.05), and CC (Rest 1.35±0.55 vs. WT 14.33±3.31 mmol.L-1 ; large effect-size: d = 5.47; P<0.05) trials.

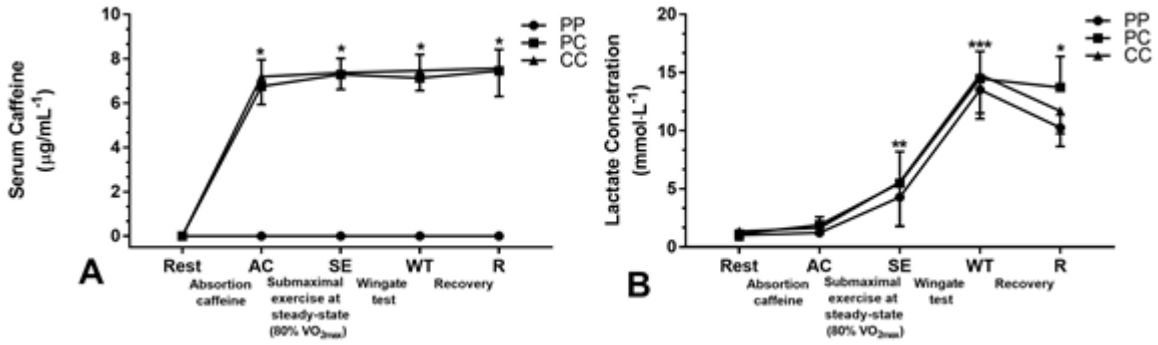


Figure 4 - Analysis of blood samples: (A) serum caffeine, (B) lactate concentration (PP, placebo-placebo [n = 5]; PC, placebo-caffeine [n = 5]; CC, caffeine-caffeine [n = 5]). Error bars represent the standard deviation of the mean. Figure 4A: (*) Significant difference between the PC, CC vs. PP (P<0.001). Figure 4B: (*) Significant difference between the PC vs. PP in R (p<0.05). (**) Significant difference of PC and CC trials compared to Rest (P<0.01). (***) Significant difference of PP, PC, and CC trials compared with Rest (P<0.001).

Discussion

The aim of this study was to test the hypothesis that caffeine supplementation (6 mg·kg1 body mass) for 4 days, followed by acute intake would impact output power after performed submaximal intensity exercise. The present data observed that caffeine supplementation for 4 days, followed by acute intake did not show changes in cardiopulmonary variables (HR, VO2, VCO2, VE and FeO2), in RPE and the following anaerobic power variables: peak/mean power output and fatigue index (P>0.05). However, only the PC trial compared with PP trial promoted improvements in the curve power output in 2 sec by 31.19% (P<0.05) and 3 sec by 20% (P<0.05). Additionally, a 10-min recovery was not enough to reduce blood lactate concentration in PC trials compared with PP trials (P<0.05).

Different methodologies have been used by several researchers to explain the positive ergogenic effects in the use of chronic [15] and acute caffeine [11]. The influence of a subjects' caffeine habituation is the determining factor in the verification of an ergogenic response, which is often neglected in many studies [24,13,14], although evidence shows that this interferes with physical performance after acute supplementation [15]. To minimize this conflict, all triathletes were classified as low caffeine users (242 ± 39 mg·day-1) [18].

A recent positron emission tomography (PET) study Elmenhorst et al. [25] showed that almost half of the brain A1 receptors were occupied by caffeine use when participants received an intravenous dose of 4.3 mg·kg-1 body mass, which corresponded to a plasma concentration of ~8 µg/mL-1. We used a dosage of 6 mg.kg-1 caffeine body mass and observed a peak serum concentration of (PC) 7.46±1.16 and (CC) 7.56±0.85 µg/mL-1 (Figure 4A), similar to the study (6.59±4.44 µg/mL-1) conducted by our research group, resulting in increased athletic performance [5]. This dose represents a posology of 450 mg of caffeine for 75 kg body mass (equivalent of 5

expresso cup), exceeding the usual consumption of the triathletes studied (242 ± 39 mg·day-1). There is evidence that this dosage (6 mg·kg-1 body mass) may be capable of promoting reduction in the rate of perceived exertion [10]. However, we did not observe changes in RPE in PC and CC trials (Figure 2 F, $P>0.05$) even under a high blood lactate concentration observed after submaximal exercise in relation to Rest (Figure 4 B, $P<0.01$).

It is known that the rate of absorption may vary among athletes [5], and the hypothesis that 4 days habituation to caffeine could influence the increase in absorption rate was questioned [17]. However, we did not observe differences between PC and CC trials (Figure 4 A, $P>0.05$). The explanations are that this could facilitate the metabolization and increase the concentrations of paraxanthine, theobromine, and theophylline (caffeine metabolites not verified in the present study) [26-28]. In view of these arguments, we believe that chronic use of caffeine in the plasma is an important step in not inducing a positive ergogenic effect. Therefore, it was expected that only the acute use of caffeine (PC) could promote improvements in performance in endurance during the submaximal exercise on the treadmill [3]. However, we did not verify these changes by cardiopulmonary responses (Figures 2 A, B, C and D, $P>0.05$). The findings of several studies show that the main mechanism that undergoes the influence of caffeine use is the respiratory medullary complex [27,10,11]. It is known that elevated VE may increase the partial pressure of alveolar/muscular oxygen and consequently induce improvements in performance in endurance [11]. In certain investigations, they failed to observe these findings, because the acute use of caffeine during the performance of a submaximal exercise at steady state (i.e., above 75% the VO2max) revealed increases in diaphragm muscle fatigue [29,11]. Therefore, it does not seem prudent that fatigue of the diaphragm muscle could be associated to the findings observed in our study, because the fatigue installed in this muscle can promote significant reductions in the VE [11], and this was not observed (Figure 2 D, $P>0.05$). We believe that the intensity (80% VO2max) of the submaximal exercise protocol in the present study was high about the cardiopulmonary condition of the athletes studied (Table I) to observe changes in cardiopulmonary parameters with caffeine use.

It is postulated that as a result of a resensitization of adenosine receptors (A2A/A2B) in skeletal muscle induced by the withdrawal to the chronic use of caffeine, may have induced an improvement in performance [28,17]. However, Irwin et al. [15] showed similar improvements in time-trial exercise with caffeine in habitual consumers regardless of a 4-day withdrawal period. Similarly, Van Soeren & Graham [24] showed equal improvements in time of exhaustion with acute caffeine supplementation in habituated consumers following no, 2-days and 4-days of caffeine withdrawal. Although our findings indicate that the acute use of caffeine (PC) improved the performance (Figure 3 D, $P<0.05$) and exhibition high values of lactate in recovery (PC 13.73±2.66 vs. PP 10.26±1.60 mmol·L-1 $P<0.05$ Figure 4 B), the 4 days period use of caffeine (CC) did not

impact the mean/peak power output and fatigue index compared to placebo (PP) (Figure 3 A, B, and C P>0.05). However, the results observed individually of the 5 triathletes, PC; 4 and PC/CC; 3 triathletes responded to the use of caffeine (peak/mean power output) (Figure 3 A-B).

These results should be interpreted with caution considering inter-individual variability observed in the metabolism of caffeine. According to Ribeiro et al. [8], genetic polymorphisms in related genes to caffeine metabolism (aryl-hydrocarbon receptor [AHR], cytochrome P450 1A1 and 1A2 (CYP1A1-CYP1A2, Prenyl (Decaprenyl)) are a potential explanation for the variability in the ergogenic response to caffeine supplementation in trained athletes. Given these prior findings, it could be hypothesized that a slower metabolism would be advantageous for maximizing the ergogenic benefit of caffeine [28]. The limitation of this study is that we were unable to evaluate the polymorphisms in related genes to caffeine metabolism. This could minimize the impact on interindividual variability of a small sample of athletes and favor an improvement in statistical testing power.

Other studies [4,15,17] questioned that changes in athletes' training routines could induce doubtful findings regarding the effects of caffeine use. However, we did not observe significant changes in training routine per week (Table II, P>0.05). This suggests that triathletes have maintained similar physical capacity over the study period. Therefore, any influence on performance during the performance of the Wingate test in any experimental trial (PP, PC, and CC) is due to the 4 days period and acute supplementation.

Conclusion

In conclusion, these results indicate that caffeine supplementation (6 mg·kg-1 body mass) for 4-day, followed by acute ingestion, did not impact the triathletes output power after performed submaximal intensity exercise. The intensity (80% VO2max) of the submaximal exercise protocol in the present study was high about the cardiopulmonary condition of the triathletes studied to observe changes in cardiopulmonary and output power parameters using the recommended caffeine dose. Thus, nutritional interventions may help athletes to adapt strategies for manipulating caffeine use. Sports and activities that alternate aerobic and anaerobic power would be applicable to the results of this study.

References

1.Bentley DJ, Millet GP, Vleck VE, McNaughton LR. Specific aspects of contemporary triathlon: implications for physiological analysis and performance. Sports Medicine 2002;32(6), 345-349. doi: 10.2165/00007256-200232060-00001

2. Bonsignore MR, Morici G, Abate P, Romano S, Bonsignore G. (1998). Ventilation and entrainment of breathing during cycling and running in triathletes. Medicine & Science in Sports & Exercise1998;30(2), 239-235. doi: 10.1097/00005768-199802000-00011

3. Barnes KR, Kilding AE.Strategies to improve running economy.Sports Medicine 2015; 45(1), 37-56.doi: 10.1007/s40279-014-0246-y

4. Ribeiro BG, Morales AP, Sampaio-Jorge F, Barth T, de Oliveira MB, Coelho GM et al. Caffeine attenuates decreases in leg power without increased muscle damage. Journal of Strength & Conditioning Research 2016; 30(8), 2354-2360. doi: 10.1519/JSC.0000000000001332.

5. Powers SK, Dodd S,Woodyard J, Magnum M.Caffeine alters ventilator and gas exchange kinetics during exercise. Medicine & Science in Sports & Exercise 1986;18(1), 101-106.

6. Assi HN, Bottoms L.The effects of caffeine on rugby passing accuracy while performing the Reactive Agility Test. Science & Sports 2014; 29(5), 275-281. doi: https://doi.org/10.1016/j.scispo.2014.07.012

7. Ribeiro BG, Morales AP, Sampaio-Jorge F, Tinoco FS, Matos AA, Leite TC. Acute effects of caffeine intake on athletic performance: A systematic review and meta-analysis. Revista Chilena de Nutrición 2017;44(3), 283-291. http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182017000300283.

8. Wilk M, Krzysztofik M, Maszczyk A, Chycki J, Zając A. The acute effects of caffeine intake on time under tension and power generated during the bench press movement. International Society of Sports Nutrition 2019;16(1), 8. doi: 10.1186/s12970-019-0275-x.

9. Grgic J, Mikulic P, Schoenfeld BJ, Bishop DJ, Pedisic Z. The influence of caffeine supplementation on resistance exercise: A review. Sports Medicine 2019;49(1), 17-30. doi: 10.1007/s40279-018-0997-y

10. Chapman RF, Mickleborough TD. The effects of caffeine on ventilation and pulmonary function during exercise: an often-overlooked response. Physician and Sports medicine 2009;37(4), 97-103.doi: 10.3810/psm.2009.12.1747

11. Chapman RF, Stager JM. Caffeine stimulates ventilation in athletes with exercise-induced hypoxemia. Medicine & Science in Sports & Exercise 2008;40(6):1080-1086. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181667421

12. Hodgson AB, Randell RK, Jeukendrup AE. The metabolic and performance effects of caffeine compared to coffee during endurance exercise. PLoS One 2013;8(4), e59561. doi: 10.1371/journal.pone.0059561

13. Skinner TL, Jenkins DG, Taaffe DR, Leveritt MD, Coombes JS. Coinciding exercise with peak serum caffeine does not improve cycling performance. Journal of Science and Medicine in Sport 2013; 16(1), 54-59. doi: 10.1016/j.jsams.2012.04.004

14. Irwin C, Desbrow B, Ellis A, Rant BO, Leveritt M.Caffeine withdrawal and high-intensity endurance cycling performance. Journal of Sports Sciences 2011;29(5), 509-515. doi: 10.1080/02640414.2010.541480

15. Johansson B, Ahlberg S, van der Ploeg I, Brené S, Lindefors N, Persson H. et al. Effect of long term caffeine treatment on A1 and A2 adenosine receptor binding and on mRNA levels in rat brain. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 1993;347(4):407-414. doi: 10.1007/bf00165391

16. Beaumont R,Cordery P, Funnell M, Mears S, James L, Watson P. Chronic ingestion of a low dose of caffeine induces tolerance to the performance benefits of caffeine. Journal of Sports Sciences 2017; 35(19),1920-1927. doi: 10.1080/02640414.2016.1241421

17. Lynge J, Hellsten Y. Distribution of adenosine A1, A2A and A2B receptors in human skeletal muscle. Acta Physiologica Scandinavica 2000; 169(4), 283-290. doi: 10.1046/j.1365-201x.2000.00742.x

18. Yang JN, Chen JF, Fredholm BB. Physiological roles of A1 and A2A adenosine receptors in regulating heart rate, body temperature, and locomotion as revealed using knockout mice and caffeine.American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 2009; 296(4), H1141-1149. doi: 10.1152/ajpheart.00754.2008

19. Lara B, Ruiz-Moreno C,Salinero JJ, Del Coso J. Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. PLoS One 2019; 14:e0210275. doi: 10.1371/journal.pone.0210275

20. Landrum RE, Meliska CJ, Loke WH. Effects of caffeine and task experience on task performance. *Psychologia:* An International Journal of Psychology in the Orient 1988; 31(2):91-97.

21. Westerterp-Plantenga MS, Lejeune MP, Kovacs EM. Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation.Obesity Research 2005; 13(7), 1195-1204. doi: 10.1038/oby.2005.142

22. Morales AP, Sampaio-Jorge F, da Cruz Rangel LF, de Souza Menezes J, Leite TC, Ribeiro BG.Cardiopulmonary performance during maximal exercise in soccer players with alterations in renal function.Journal of Human Kinetics 2017; 57(1), 107-115.doi: 10.1515/hukin-2017-0052

23. Bar-Or O. The Wingate anaerobic test.An update on methodology, reliability and validity.Sports Medicine 1987;4(6), 381-394. doi:10.2165/00007256-198704060-00001

24. Van Soeren MH, Graham TE. Effect of caffeine on metabolism, exercise endurance, and catecholamine responses after withdrawal.Journal of Applied Physiology (1985) 1998;85(4), 1493-1501. doi: 10.1152/jappl.1998.85.4.1493

25. Elmenhorst D, Meyer PT, Matusch A,Winz OH, Bauer A.Caffeine occupancy of human cerebral A1 adenosine receptors: in vivo quantification with 18F-CPFPX and PET. Journal of Nuclear Medicine 2012; 53(11), 1723-1729. doi: 10.2967/jnumed.112.105114

26. Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB.The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. Journal of Neuroscience 1999; 19(10), 4011-4022.

27. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. Pharmacological Reviews 1999;51(1), 83-133.

28. Gonçalves LS, Painelli VS,Yamaguchi G, Oliveira LF, Saunders B, da Silva, RP. et al. Dispelling the myth that habitual caffeine consumption influences the performance response to acute caffeine supplementation. Journal of Applied Physiology (1985) 2017;123(1), 213-220. doi: 10.1152/japplphysiol.00260.2017

29. Mayock DE,Standaert TA,Woodrum DE. Effect of methylxanthines on diaphragmatic fatigue in the piglet. Pediatric Research 1992;32(5), 580-584. doi: 10.1203/00006450-199211000-00019

7.3. MANUSCRITO 3

Caffeine supplementation for 4 days does not induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters of cyclists: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled study

Abstract

The present study investigated whether the caffeine supplementation for four days would induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters of cyclists. A double-blind placebo-controlled cross-over design was employed, involving four experimental trials; placebo (4-day)-placebo (acute)/PP, placebo (4-day)-caffeine (acute)/PC, caffeine (4-day)-caffeine (acute)/CC and caffeine (4-day)-placebo (acute)/CP. Fourteen male recreationally-trained cyclists ingested capsules containing either placebo or caffeine (6 mg·kg−1) for 4 days. On day 5 (acute), capsules containing placebo or caffeine (6 mg·kg−1) were ingested 60 min before completing a 16 km time-trial (TT). CC and PC showed improvements in time (3.54%, ES = 0.72; 2.53%, ES = 0.51) and in output power (2.85%, ES = 0.25; 2.53%, ES = 0.20) ($p < 0.05$) compared to CP and PP conditions, respectively. These effects were accompanied by increased heart rate (2.63%, ES = 0.47; 1.99%, ES = 0.34), minute volume (13.11%, ES = 0.61; 16.32%, ES = 0.75), expired O2 fraction (3.29%, ES = 0.96; 2.87, ES = 0.72), lactate blood concentration (immediately after, 29.51% ES = 0.78; 28.21% ES = 0.73 recovery (10 min), 36.01% ES = 0.84; 31.22% ES = 0.81), and reduction in expired CO2 fraction (7.64%, ES = 0.64; 7.75%, ES = 0.56). In conclusion, these results indicate that caffeine, when ingested by cyclists in a dose of 6 mg·kg−1 for 4 days, does not induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters.

Keywords: caffeine, endurance, exercise, fatigue

Introduction

The search for licit ergogenic resources is growing by cyclists in an attempt to minimize muscle fatigue generated in training sessions/competitions. In cyclists, muscle fatigue is manifested by the inability to repeatedly produce muscle strength or power over some time [1]. The ergogenic aid can be characterized as a supplement that delays fatigue, thus maintaining the output power and contributing to the improvement of sports performance [1,2]. In this scenario, caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) has been described as a licit ergogenic resource that is effective in increasing performance in various sports (i.e., triathlon, and cycling) [1,3], in particular, sports that mainly involve muscle strength/power and aerobic endurance [1,2].

The primary mechanism of action described for caffeine is its role as a central nervous system (CNS) stimulant acting as a non-selective antagonist of the central and peripheral adenosine receptors (A1, A2A, A2B, and A3) [4]. Adenosine is a neurotransmitter that acts by modulating various physiological (i.e., perceptual and cardiorespiratory) and metabolic (i.e., cortisol and lactate blood levels) parameters.

In an attempt to establish the proper protocol to induce ergogenicity, researchers have examined different strategies, including the source of caffeine to be used [5], the dose used [2,3], and the acute time of ingestion [6]. Among these strategies, acute caffeine intake before exercise has been studied more closely by researchers [7,8,9,10,11].

The use of caffeine 1 h before exercise (acute intake) was suggested as an ergogenic strategy by the recommendation of current sports nutrition guidelines [12], using doses ranging from 3 to 6 mg·kg−1 body mass. However, these recommendations do not address the impact of athletes' usual caffeine consumption or chronic supplementation on their possible acute ergogenic effect [9,10]. For example, Beaumont et al. [9] observed that chronic use of caffeine supplementation (1.5 mg·kg−1·day−1) followed by acute intake (3 mg·kg−1 body mass of caffeine) induced tolerance to ergogenic effects on performance. Lara et al. [10], using an incremental cycle ergometer model, demonstrated that daily caffeine supplementation (3 mg·kg−1·day−1) for 20 days, followed by acute intake (6 mg·kg−1 body mass of caffeine) caused a reduction in the magnitude of ergogenicity on the ventilatory response. Both studies [9,10] used caffeine doses that exceeded the average amount of the subjects' usual caffeine consumption and show that chronic use followed by an acute dose produced tolerance effects.

Irwin et al. [7] did not observe tolerance to ergogenic effects on time trial performance in low to moderate caffeine users. They received a dose (3 mg·kg−1·body weight) of caffeine similar to the usual consumption (3 mg·kg−1·day−1) in a short period (4 days), followed by an acute dose (6 mg·kg−1 body weight of caffeine). This investigation [7] is comparable to the present study, but,

differently, a higher dose of caffeine above the usual consumption will be tested in moderate to high consumers.

Thus, the present study investigated whether the caffeine supplementation for four days would induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters of cyclists.

Materials and Methods

Subjects

A statistical power analysis (G*Power 3.1) was performed to estimate the sample size based on the simulated cycling time trial (TT) (16 km) of a pilot study (n = 8 cyclists). The projected sample size was 12 with an effect size f of 0.41, alpha of 0.05, and power of 0.80. Using a more conservative approach (a priori) and taking into account possible dropouts, the effect size f was 0.36 (medium effect size), and the projected sample size was fourteen male cyclists. Participation was voluntary, and the following inclusion criteria were established: (a) all had at least 4 years of cycling experience; (b) participated in at least 20 competitions between 2018 and 2019; (c) have not had a history of cardiorespiratory, gastrointestinal, and musculoskeletal disorders in the last 3 months (Supplementary File—CONSORT Flow Diagram). They had a mean ± standard deviation (SD) age of 34.1 ± 4.4 years, a height of 178 ± 9 cm, body mass of 79.1 ± 11.8 kg, body mass index of 24.6 ± 2.1 kg·m2, maximal oxygen uptake (VO2max) of 51.5 ± 6.3 mL·kg−1·min−1, and power output max (Wmax) of 398.9 ± 35.1 W. The training volume of the cyclists was 202 ± 83 km per week. In addition, a validated caffeine consumption questionnaire was administered to the participants, showing that all participants were moderate to high caffeine consumers (285.9 ± 108.0 mg·day−1) [8]. Participants gave their written informed consent before inclusion. The protocol (2.540.958/2018) was approved by the Ethics Committee of Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) and was registered on a publicly accessible virtual platform (Brazilian Clinical Trials Registry) (http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-5745nv/).

Study Design

A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled design was used in this study. On the first visit to the laboratory, participants underwent dietary assessment and cycling test to exhaustion. On the second visit, cyclists became familiar with the time trial test. So they received four visits from the researchers at home, one per day, for delivery and verification of capsule consumption (according to randomization). The other day they consumed the capsule acutely 60 min before the 16 km time trial test. The study preconized a seven-day washout [7,10] between the different intervention strategies characterized below. We tested the following strategies: Placebo–

Placebo (PP), participants received Placebo (4-day supplementation), and Placebo (acute ingestion, 60 min before simulated cycling TT completed). Placebo capsules were 250 mg of magnesium silicate single daily dose. Placebo–Caffeine (PC), participants received Placebo (4-day supplementation), and Caffeine (acute ingestion, 60 min before simulated cycling TT completed). Caffeine capsules were 6 mg·kg−1 body mass. Caffeine–Caffeine (CC), participants received Caffeine (4-day supplementation), and Caffeine (acute ingestion, 60 min before simulated cycling TT completed). Caffeine–Placebo (CP), participants received Caffeine (4-day supplementation), and Placebo (acute ingestion, 60 min before simulated cycling TT completed). Random numbers placed in sealed envelopes drawn only by the second researcher constituted the randomization process of the study. At the first visit to the laboratory, the researchers verified the routine energy and caffeine intake of food, VO2max, and workload capacity in the graded test until exhaustion in the cycle ergometer. The athletes were instructed to withdraw all their caffeine consumption (i.e., food sources of caffeine) during the experiment and were monitored by telephone contact, e-mail, and in-person. On the test day, cyclists arrived fasting in the laboratory, and soon an intravenous cannula (20G Jelco; B. Braun Medical Inc., Bethlehem, PA, USA) was inserted into the forearm, and then four blood samples (10 mL) were obtained: before ingestion of capsules (baseline), 60 min after intake of capsules (T1), immediately after TT (T2) and after 10 min of recovery (recovery). Cyclists did not exercise 24 h before the experimental trials in the laboratory. The athletes were instructed to continue the routine of daily training. The experimental trials were performed at the same time of day (7:00 AM) (Figure 1).

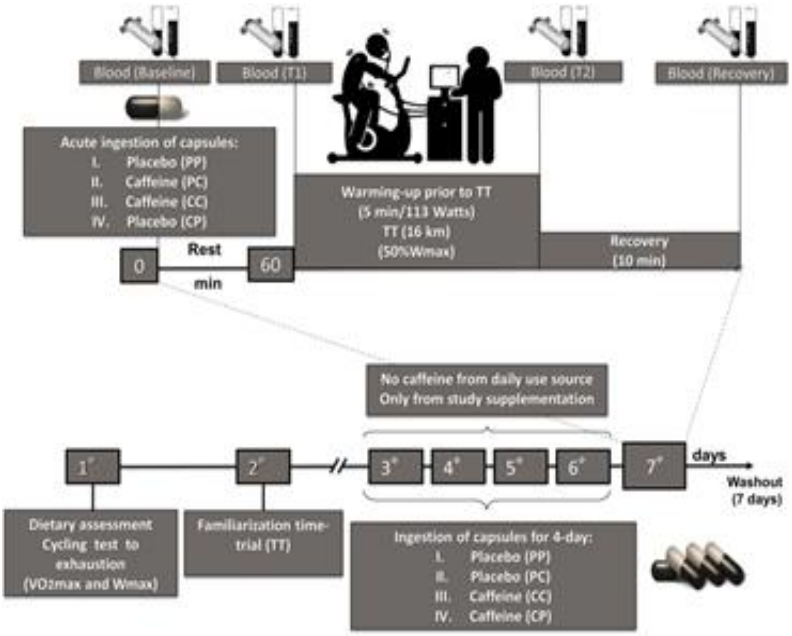


Figure 1 - Experimental design.

Habitual food intake recording and caffeine-containing foods

Each athlete completed the 24-hour food record from the first to the fourth trial. According to the 24-hour food record of the first trial, it was photocopied and returned to athletes so that the same diet could be repeated for subsequent trials. Energy consumption, total carbohydrates, total proteins, and total lipids were determined. The TACO® database was used to quantify macronutrient intake and Dietpro® 5i (Dietpro, Minas Gerais, Brazil) software for nutrient calculation. To assess habitual caffeine intake, we used a questionnaire adapted from Landrum et al. [13]. The questionnaire was applied individually with the supervision of a qualified nutritionist. The questionnaire consists of a list of food sources of caffeine (coffee, tea, cocoa, chocolate, soft drinks, medicine, and dietary supplements) and the period of the day (morning, 6:00 AM to 12 noon; afternoon, 12 noon to 6:00 PM; evening, 6:00 AM to 2:00 AM; night, 2:00 AM to 6:00 AM) consumed. The types of food, dietary supplements in the diet, and medicaments of athletes who contained caffeine were identified. Caffeine content was obtained from the USDA Food Composition Databases, from food labels and medication package inserts.

VO_2max and workload capacity

Participants performed a graded exercise test until exhaustion on a mechanically braked cycle ergometer (Biotec 2100, Cefise®, São Paulo, Brazil) to determine VO_2max. Participants began pedaling at a power output of 113 W, with 45-W increments every 2 min and pedaling rate 88 rpm was kept constant until exhaustion. Maximal workload capacity (Wmax) was determined by the following equation: Wmax = Output Power (Woutput)+((t/113)*45), Woutput is the workload in the last completed stage, and t is the time spent in the final stage not completed [8]. Heart rate was monitored continuously (Polar Electro Oy®, Kempele, Finland). Pulmonary gas exchange was determined breath by breath, by use of a gas analysis system VO2000 (MedGraphics®, St. Paul, MN). The equipment was calibrated automatically according to the manufacturer's specifications before each test. The present study determined and valitated the VO_2max following these criteria: increase in VO_2 less than 2.1 $ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ by increasing the intensity; exhaustion of the individual; the respiratory exchange ratio bigger than 1.10. The plateau in VO_2 was determined when the difference in oxygen consumption in the final 30s of the last two stages (ΔVO_2) was $\leq$ 2.1 $ml.kg^{-1}.min^{-1}$.

Simulated cycling TT performance

Participants reported to the laboratory at individually standardized times after an 8-hour fasting period. Before the main exercise, participants underwent a 5-min warm-up at 113 W (88 rpm), immediately followed by the simulated cycling TT. The protocol consisted of a continuous

test each subject cycling with a rotation higher than 88 rpm as quickly as possible at a distance of 16 km at work intensity. It was used a constant workload representing 50% of the maximum capacity (above 199.67 ± 17.90 W equivalent to work higher than ~ 407 kJ, determined by the following equation: work (J) = 50%Wmax*t) on the mechanized cycle ergometer brake. The cycle ergometer was connected to a laptop using "Ergometric" software (version 7.0, Cefise®, São Paulo, Brazil) for the collection and storage of data, such as power output (W) and cadence (rpm). The participants were blinded to performance-related information (exercise time and cadence) during the tests. The only information that the participants received during the test was the distances (2 km, 4 km, 6 km, 8 km, 10 km, 12 km, 14 km, and 16 km). At these set intervals during the trial, participants were asked their rating of perceived exertion (RPE) using the 0-to-10-point Borg Scale [14]. Ventilation (volume minute V_E, oxygen uptake VO_2, carbon dioxide output VCO_2, O_2 expiration fraction FeO_2, and CO_2 expiration fraction $FeCO_2$), heart rate (HR), and power output parameters were measured continuously during the TT. The parameters listed are expressed in ten points (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, 90%, and 100%), the curve of the total time completed during the TT and average in PP, PC, CC and CP conditions. All the trials were performed in a climate-controlled laboratory (21°C to 24°C, 41% to 52% relative humidity).

Nutritional Intervention

The participants were administered a dose of anhydrous caffeine (6 $mg \cdot kg^{-1}$ body mass) or placebo (250 mg magnesium silicate), provided in gelatin capsules, identical in color, size, and appearance. Because the participants are used to consuming average amounts of caffeine daily, around 285.92 ± 108.04 $mg \cdot day^{-1}$ (verified through a questionnaire), the present study chose to offer a higher dose than usual. This dose (6 $mg \cdot kg^{-1}$ of body weight) represented a dosage of 474.78 ± 70.80 mg, exceeding the average amount of usual consumption, which made it possible to verify the effects of tolerance. In the presence of a researcher, all athletes were instructed to take a single capsule daily at the same time (9:00 AM) during the 4-day supplementation. In acute ingestion, the capsule was administered with 250 ml of water 60 min before TT. Participants rested quietly for 60 min before starting the test in all the sessions. Supplements for each participant were prepared and separated by a non-affiliated researcher to ensure double-blinding.

Blood caffeine, cortisol, lactate, and glucose concentrations analysis

The measurement of blood levels of caffeine, cortisol, lactate, and glucose were performed at baseline, T1, T2, and recovery. Plasma and serum were obtained by centrifugation at 2.500 rpm at 4°C for 20 min. The resultant plasma and serum were stored at −20°C until the analyses could be performed. The caffeine blood levels were determined using an HPLC method, adapted from

Ribeiro et al. [2]. The HPLC analyses were carried out using a Shimadzu chromatograph (Shimadzu® Corp., Kyoto, Japan). To perform the lactate and glucose analyses, commercial kits from (Labtest, Brazil) and the BIO200 analyzer (Bioplus®, São Paulo, Brazil), respectively, were used. Cortisol was analyzed by the chemiluminescent technique using the reagent kit (Abbott Diagnostics Division, USA) and the Architect i2000SR automatic immunoassay analyzer (Abbott®, Illinois, USA).

Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± SD or as median (interquartile deviation), following the normality of Shapiro Wilk test. All variables were analyzed (SPSS, version 16.0) with one way or two way ANOVA according to the data. Mauchly's test of sphericity was performed for all test variables, and Greenhouse-Geisser correction for within-subject effects was used in cases where the assumption of sphericity was violated. Significant interactions were followed up by pairwise comparisons through simple main effect analysis with Tukey correction for multiple comparisons (habitual food intake recording, perception of effort responses and cardiorespiratory parameters, cycling TT and power output, cortisol and lactate concentrations). We used the Friedman and Kruskal-Wallis test for the glucose and caffeine concentrations. Effect Sizes (ES) (Cohen's *d*: small effect ≥ 0.20, medium effect ≥ 0.50, large effect ≥ 0.80, very large effect ≥ 1.30) and Delta (Δ) of caffeine supplementation were calculated as the difference between means corresponding to caffeine (PC, CC, CP) and placebo (PP). For all statistical analyses, a P value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Habitual food intake recording

Food intake, which did not exhibit significant main effects in treatment 24 hours before the trials is shown in Table 1: energy [$F(2.320, 30.16) = 0.8352$, $P = 0.4590$], carbohydrates [$F(1.901, 24.71) = 1.117$, $P = 0.3406$], protein [$F(1.933, 25.13) = 2.097$, $P = 0.1450$], and lipidis [$F(1.809, 23.52) = 1.912$, $P = 0.1729$].

Table 1 - Food intake of cyclists 24-h before the trials.

	PP (n = 14)	**PC (n = 14)**	**CC (n = 14)**	**CP (n = 14)**
Energy (kcal)	2132.93±743.67	2056.90±389.76	2181.42±452.35	2261.41±525.69
Carbohydrates ($g \cdot day^{-1}$)	250.92±67.58	242.06±67.23	276.70±80.51	291.61±67.58
Protein ($g \cdot day^{-1}$)	121.62±45.38	114.38±42.55	126.62±47.25	131.63±45.38

Lipidis ($g \cdot day^{-1}$)	78.50±45.69	69.23±25.28	62.01±27.92	76.35±27.62

PP, Placebo-Placebo; PC, Placebo-Caffeine; CC, Caffeine-Caffeine; CP, Caffeine-Placebo.

RPE and cardiorespiratory parameters

RPE only exhibited significance of distance traveled in TT (Table 2) [$F(7, 91) = 150.1$, $P = 0.0001$] for the main effect. There were no differences between treatments and interaction between treatment and distance traveled in TT ($P > 0.05$) (Table 2).

Table 2 - Mean (± SD) RPE for every 2 km of distance traveled in cycling TT.

	Distance							
Treatment	2 km	4 km	6 km	8 km	10 km	12 km	14 km	16 km
PP	3.56±1.01	4.67±1.22[a]	5.67±1.32[a]	6.44±1.13[a]	6.89±1.05[a]	8.11±0.93[a]	9.00±1.00[a]	9.11±0.78[a]
PC	3.44±1.51	4.67±1.32[a]	5.78±1.48[a]	6.56±1.42[a]	7.11±1.05[a]	8.00±1.12[a]	8.78±0.97[a]	9.00±1.0[a]
CC	4.00±1.32	4.67±1.12[a]	5.56±1.42[a]	6.67±1.22[a]	7.22±0.83[a]	8.00±1.00[a]	8.67±1.32[a]	8.78±1.30[a]
CP	4.11±1.54	5.22±1.72[a]	6.22±1.64[a]	7.00±1.41[a]	7.44±1.13[a]	8.67±1.12[a]	9.00±1.00[a]	9.11±0.93[a]

PP, Placebo-Placebo; PC, Placebo-Caffeine; CC, Caffeine-Caffeine; CP, Caffeine-Placebo. [a]Significant difference from 2 km ($P < 0.05$).

HR (Figure 2A) showed significant treatment [$F(3, 39) = 9.134$, $P = 0.000$] and percentage of time curve [$F(9, 117) = 109.0$, $P = 0.000$] in the main effect. However, there was no significance observed in the interaction between treatment and percentage of time curve [$F(27, 351) = 1.345$, $P = 0.120$]. HR was higher with caffeine in the PC condition (174.01 ± 9.94 vs. 170.6 ± 9.51 bpm) (Δ= 3.41 bpm; $p = 0.02$; ES=0.34 [95% CI 0.36, 6.46]) than that with PP and CC condition (176.01 ± 9.59 vs. 171.49 ± 9.47 bpm^{-1}) (Δ= 4.52 bpm; $P = 0.00$; ES=0.47 [95% CI 1.32, 7.42]) than that with CP. No differences were observed between CC and PC ($P > 0.05$).

There was no significant difference ($P = 0.7947$) main effects on VO_2 (Figure 2B). However, a significant percentage of time curve [$F(9, 117) = 14.37$, $P = 0.0001$] and interaction between treatment and percentage of time curve ($P = 0.0005$) effects were seen.

VCO2 (Figure 2C) exhibited significant treatment [$F(3, 39) = 5.065$, $P = 0.0047$] and percentage of time curve [$F(9, 117) = 38.33$, $P = 0.001$] main effects. However, there were no

significance observed in the interaction between treatment and percentage of time curve (P = 0.7184). VCO2 was higher with caffeine in the PC condition (45.06 ± 5.32 vs. 42.04 ± 5.15 ml·kg−1·min−1) (Δ= 3.02 ml·kg−1·min−1; P = 0.02; ES=0.57 [95% CI 0.24, 5.79]) than that with PP. No differences were observed between CC and PC (P > 0.05).

V_E (Figure 2D) exhibited significant treatment [F(3, 39 = 14.49, P = 0.000] and percentage of time curve [F(9, 117) = 76.07, P = 0.000] main effects. However, a significant interaction between treatment and percentage of time curve (P = 0.070) was not observed. VE was higher with caffeine in the PC condition (86.38 ± 16.50 vs. 74.26 ± 15.62 $l \cdot min^{-1}$) (Δ= 12.12 $l \cdot min^{-1}$; P = 0.00; ES=0.75 [95% CI 5.76, 18.47]) than that with PP and CC (84.62 ± 16.44 $l \cdot min^{-1}$ vs. 74.81 ± 15.44 $l \cdot min^{-1}$) (Δ= 9.81 $l \cdot min^{-1}$; P = 0.00; ES=0.61 [95% CI 3.44, 16.16]) than that with CP. No differences were observed between CC and PC (P > 0.05).

FeO_2 (Figure 2E) exhibited significant treatment [F(3, 39) = 10.93, P = 0.0001] and percentage of time curve [F(9, 117) = 91.09, P = 0.0001] main effects. However, there was no significant interaction between treatment and percentage of time curve (P = 0.9996) observed. FeO2 was higher with caffeine in the PC condition (17.17 ± 0.65% vs. 16.69 ± 0.68%) (Δ= 0.48%; P = 0.00; ES=0.72 [95% CI 0.07, 0.88]) than that with PP and CC (17.22 ± 0.65% vs. 16.67 ± 0.24%) (Δ= 0.55%; P = 0.00; ES=0.96 [95% CI 0.20, 0.88]) than that with CP. No differences were observed between CC and PC (P > 0.05).

$FeCO_2$ (Figure 2F) exhibited significant treatment [F(3, 39) = 8.006, P = 0.0003] and percentage of time curve [F(9, 117) = 60.46, P = 0.0001] main effects. However, there was no significant interaction between treatment and percentage of time curve (P = 0.9996) observed. FeCO2 was lower with caffeine in the PC condition (4.28 ± 0.64% vs. 4.64 ± 0.63%) (Δ= -0.36%; P = 0.00; ES=0.56 [95% CI -0.64, -0.07]) than that with PP and CC (4.23 ± 0.63% vs. 4.58 ± 0.28%) (Δ= -0.35%; P = 0.00; ES=0.64 [95% CI -0.63, -0.07]) than with CP. No differences were observed between CC and PC (P > 0.05).

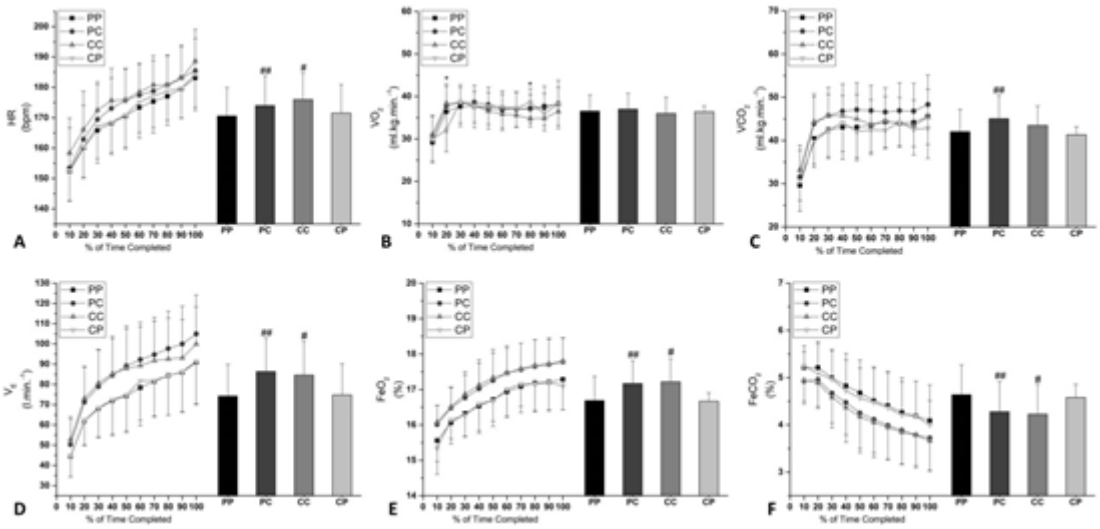


Figure 2 - Mean (±SD). Mean (±SD). Curve values and the average of cardiorespiratory parameters during TT performance: (A) HR, (B) VO_2, (C) VCO_2, (D) V_E, (E) FeO_2, and (F) $FeCO_2$. *Significant difference to CC from CP (P <0.05). #Significant difference from CP (P < 0.05). ##Significant difference from PP (P < 0.05).

Power output and cycling TT performance

Power output (Figure 3A) exhibited significant treatment [F(3, 39) = 8.957, P = 0.0001] and percentage of time curve [F(9, 117) = 9.409, P = 0.0001], and an interaction between treatment and percentage of time curve [F(27, 351) = 2.383, P = 0.0002] main effects. Power output was higher with caffeine in the PC condition (250.3 ± 30.24 W vs. 244.1 ± 29.33 W) (Δ= 6.20 W; P = 0.00; ES=0.20 [95% CI 1.25, 11.10]) than that with PP and CC (249.7 ± 27.23 W vs. 242.5 ± 29.51 W) (Δ= 7.12 W; P = 0.00; ES=0.25 [95% CI 0.55, 10.53]) than that with CP. No differences were observed between CC and PC (P > 0.05).

There was a main effect of treatment on TT performance (Figure 3B) [F(2.488, 3234) = 11.66, P = 0.0001]. TT test completion time was lower with caffeine in both PC (1631 ± 90.45 sec vs. 1674 ± 72.88 sec) (Δ= -43 sec; P = 0.04; ES=0.51 [95% CI -85.00, -1.71]) than that with PP and CC (1634 ± 61.29 sec vs. 1692 ± 90.47 sec) (Δ= -58 sec; P = 0.00; ES=0.72 [95% CI -97.38, -18.34]) than that with CP. No differences were observed between CC and PC (P > 0.05).

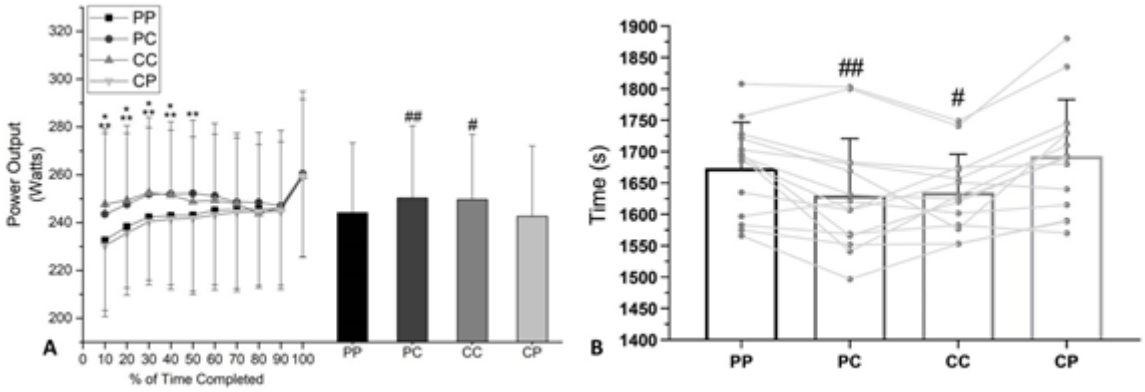


Figure 3 - Mean (±SD). Curve values and the average of performance parameters during TT performance: (A) Power output and (B) time of simulated cycling TT performance. *Significant difference to CC from CP ($P < 0.05$). **Significant difference to PC from PP ($P < 0.05$). #Significant difference from CP ($P < 0.05$). ##Significant difference from PP ($P < 0.05$).

Blood caffeine, cortisol, lactate and glucose concentrations

Caffeine concentration exhibited significant time ($P = 0.0001$) and treatment ($P = 0.0001$) main effects. Cortisol concentration only exhibited significant time [$F(3, 39) = 163.4$, $P = 0.000$] main effect. Lactate concentration exhibited significant treatment [$F(3, 39) = 18.32$, $P = 0.000$] and time [$F(3, 39) = 239.6$, $P = 0.000$], and an interaction between treatment and time [$F(9, 117) = 11.61$, $P = 0.000$] main effects. Glucose concentration exhibited significant time ($P = 0.0001$) main effect (Table 3).

Table 3 -Analysis of blood samples (n = 14). Mean ± SD and median (interquartile deviation).

	Baseline	**T1**	**T2**	**Recovery**
Caffeine ($\mu g \cdot mL^{-1}$)				
PP	0.34 (0.14)	0.37 (0.22)	0.36 (0.16)	0.37 (0.11)
PC	0.00 (0.32)	7.60 (1.32)[a,b]	7.61 (1.33)[a,b]	7.80 (0.56)[a,b]
CC	0.45 (0.41)	8.19 (0.76)[a,c]	8.35 (0.76)[a,c]	8.18 (1.11)[a,c]
CP	0.33 (0.36)	0.30 (0.38)	0.21 (0.31)	0.27 (0.44)
Cortisol ($\mu g \cdot mL^{-1}$)				
PP	10.74±3.45	10.98±3.34	14.90±4.2[a]	15.33±4.20[a]
PC	9.64±3.66	9.70±3.67	16.60±5.2[a]	16.84±5.06[a]
CC	10.73±3.58	10.90±3.39	16.02±4.28[a]	16.44±4.23[a]
CP	11.49±2.14	11.62±2.26	15.76±2.61[a]	16.17±2.80[a]
Lactate ($mmol \cdot L^{-1}$)				

PP	1.09±0.42	1.02±0.50	12.58±4.59[a]	9.16±3.31[a]
PC	1.04±0.60	1.38±0.54	16.13±5.06[a,b]	12.02±3.68[a,b]
CC	1.11±0.48	1.30±0.53	15.14±4.34[a,c]	12.01±4.07[a,c]
CP	1.14±0.77	1.01±0.64	11.69±4.43[a]	8.83±3.35[a]
Glucose (mmol·L^{-1})				
PP	5.84 (1.62)	5.67 (1.35)	9.80 (4.25)[a]	9.87 (3.31)[a]
PC	5.41 (1.79)	5.72 (1.33)	12.10 (6.05)[a]	12.55 (6.07)[a]
CC	5.97 (1.37)	5.97 (1.46)	10.82 (2.45)[a]	10.80 (4.33)[a]
CP	6.44 (1.76)	5.94 (1.33)	9.54 (4.34)[a]	9.66 (3.31)[a]

PP, Placebo-Placebo; PC, Placebo-Caffeine; CC, Caffeine-Caffeine; CP, Caffeine-Placebo. T1 - 60 min after capsule ingestion. T2 - immediately after TT performance. [a]Significant difference from baseline or/and T1 ($P < 0.05$). [b]Significant difference from PP ($P < 0.05$). [c]Significant difference from CP ($P < 0.05$).

Discussion

The results of the present study indicate that caffeine, when ingested by cyclists in a dose of 6 mg·kg−1 for 4 days, does not induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters. Furthermore, CC and PC showed improvements in time and in output power compared to CP and PP conditions, respectively. The physiological and metabolic responses such as an increase in heart rate, minute volume, expired O2 fraction, blood lactate concentration (T2 and Recovery), and reduction in expired CO2 fraction were similar in both withdrawal and 4-day supplementation conditions.

The cyclists in the present study who consumed caffeine acutely (CC and PC) had more output power in the first half of the TT test (Figure 3A). It can be explained by the effect of caffeine to pre-dispose the subject to perform tasks [4,12,32]. With this, the individuals achieved a significant improvement in the time of the TT test, indicating a potential ergogenic effect corroborating with previous studies [1,8,32]. The present findings are in agreement with the results of Irwin et al. [7]. They reported that acute caffeine intake (6 mg·kg−1 body mass of caffeine) significantly improves exercise performance, regardless of whether a period of withdrawal or consumption (3 mg·kg−1 body mass of caffeine) for 4 days is imposed on regular users of caffeine.

According to the authors [7], an explanation for the inability to influence the ergogenic potential of caffeine in their study would be the participants' usual consumption (3 mg·kg−1·day-1). In another study [8] the authors observed similar improvements in performance using a cross-sectional protocol, comparing low (58 ± 29 mg·day-1 or 0.80 mg·kg−1·day-1), moderate (143 ± 25 mg·day-1 or 1.90 mg·kg−1·day-1) and high (351 ± 139 mg·day-1 or 4.91 mg·kg−1·day-1) consumers, when administered in cyclists an acute dose of 6 mg·kg−1 body mass of caffeine. The plausible explanation for this finding indicates that the dose used for acute intake exceeded the average amount of caffeine about the usual consumption of low, moderate, and high consumers [8]. In our study, cyclists were moderate to high consumers, and the dose of 6 mg·kg−1 body mass of caffeine exceeded the average amount of usual caffeine consumption. Thus, in the present study, it was suggested that the improvement in performance is related to acute intake, regardless of habitual consumption and caffeine supplementation for 4 days.

A previous study by Graham & Spriet [16] concluded that an acute intake of 6 mg·kg−1 body mass of caffeine could cause saturation in hepatic metabolism and, consequently, the maintenance of caffeine blood concentration for a prolonged time. Therefore, we believe that the improvement in time (Figure 3B) observed in 85.71% (CC and PC) of cyclists (12 cyclists) may be associated with the maintenance of the blood caffeine concentration over time (~1h 37min) (Table 3). These results reinforce the notion that the use of this dose (6 mg·kg−1 body mass) may reduce interindividual metabolic responses [8].

Furthermore, evidence shows that an increase in primary caffeine metabolites (paraxanthine, theobromine, and theophylline) is due to caffeine metabolism, which may promote tolerance effects [15,17,18]. Because they have a higher affinity for adenosine receptors than caffeine [19], this could result in the higher development of tolerance to caffeine's ergogenic effects [9,10]. To reverse the effects of tolerance, the use of the caffeine withdrawal strategy, followed by the use of an acute dose, may result in the resensitization of adenosine receptors (A2A/A2B) [7,15]. However, in the present study, cyclists' blood caffeine concentrations (verified in acute intake) remained similar between trials (CC and PC) (Table 3), suggesting that the ergogenic effects observed in the CC and PC conditions were due to acute intake (use before the test). Previous evidence [7,15] suggested that withdrawal caffeine intake strategy a few days before the competition is needed to elicit an ergogenic effect of caffeine. However, the present data propose otherwise. It seems that athletes may (at least over the short-term) continue using caffeine before the competition.

The effects of acute caffeine intake appear to regulate blood cortisol and glucose concentrations during exercise [20,21]. From this perspective, elevated blood cortisol concentrations may stimulate gluconeogenesis in the liver and induce substantial increases in blood glucose levels. There is evidence that caffeine acts by increasing cortisol secretion by increasing adrenocorticotropic hormone (ACTH) production in the pituitary [21], although the precise mechanisms still need to be characterized. The findings of the present study indicated that caffeine intake did not alter blood cortisol and glucose concentrations between experimental trials (Table 3). However, the increase in cortisol and glucose concentration observed at T2 and recovery (Table 3), regardless of caffeine intake, may be associated with exercise using intensities ≥ 40% of VO2max [22], as shown in our results where cyclists reached an average intensity of approximately 70.61% of VO2max.

Distribution of adenosine receptors throughout the peripheral tissues and the central nervous system suggests that caffeine may act directly or indirectly through multiple mechanisms. The findings of previous studies [23,24] showed higher HR responses during exercise, which is due to the ergogenic effects promoted by acute caffeine intake. These findings suggest that caffeine ingestion attenuates the brainstem response of the baroreflex due to metaborreflex activation caused by the accumulation of muscle metabolites (lactate, H+, and Pi) as a result of increased muscle metabolism during exercise. Thus, we attributed the increase in HR to the high blood lactate concentrations observed after TT (T2 and recovery) (Table 3). It was expected then due to changes in CNS responses and peripheral metabolism (metabolic muscle accumulation), that acute caffeine intake may reduce RPE [3]. In the present study, however, probably due to the exercise protocol used (TT) [25], this assumption was not observed (Table 2). According to the findings of the study

[26] that investigated the effects of caffeine intake on neuromuscular fatigue, the reduction in RPE is strongly associated with the use of exercise protocols until exhaustion.

Adopting a high pacing strategy at the beginning of TT is the most commonly used form by cyclists expecting to increase fatigue tolerance [27]. However, success in using this strategy is reduced when many highly trained cyclists exhibit induced arterial hypoxemia (at sea level) at the beginning of exercise [28]. This phenomenon is explained by the delayed physiological response of integrated neural control, because the reduction in the ventilatory mechanism may negatively impact the release of O2 to the muscles. Interestingly, Jones et al. [27] observed in cyclists that the reduction in the percentage of the mean response time of the ventilatory mechanism was significantly correlated ($r = 0.85$, $P < 0.05$) with the improvement in time to TT. Investigators [27,28] argue that the primary focus on reducing the effects of hypoxemia is associated with increased respiratory medullary complex stimulation. This evidence suggests that acute caffeine intake may increase the sensitivity of peripheral chemoreceptors to potentiate hyperventilation (minute ventilation) during exercise [28,29]. Thus, our findings indicate that the improvement in the partial pressure of alveolar oxygen (Figure 2 D, E, and F) induced by acute caffeine intake may be associated with an increase in the output power curve at the beginning of TT (Figure 3A).

In future studies, it should be encouraged to test if the blinding procedure was effective. Ask participants to identify the supplement ingested, to test the efficacy of the blinding method, should be a great way to avoid bias in the analysis of the results [29]. The experimental design used in the present investigation presented some limitations that should be discussed for the correct application of the results. In the present study, the cycle ergometer was used to determine the ergogenic effects of caffeine under laboratory conditions. However, these results should be confirmed in additional research protocols, which use field tests (i.e., cycling competition or simulations) or assessments utilizing the athlete's bike, to transfer the findings of this investigation to coaches accurately. Other limitations of the present study are related to the interindividual variability observed in caffeine metabolism [17] and to the analysis of the expression of adenosine receptors in skeletal muscle tissue, given its up-regulation during chronic treatment with the use of caffeine [31]. According to Ribeiro et al. [1], genetic polymorphisms in related genes to caffeine metabolism (aryl-hydrocarbon receptor [AHR], cytochrome P450 1A1 and 1A2 (CYP1A1-CYP1A2, Prenyl (Decaprenyl)) are a potential explanation for the variability in the ergogenic response to caffeine supplementation in trained athletes. Given these prior findings, it could be hypothesized that a higher metabolism would be advantageous for maximizing the ergogenic benefit of caffeine [18,32]. However, we were not able to evaluate the polymorphisms in genes related to caffeine metabolism, which could minimize the impact on the interindividual variability of cyclists.

Conclusions

In conclusion, these results indicate that caffeine, when ingested by cyclists (moderate to high caffeine consumers) in a dose of 6 $mg \cdot kg^{-1}$ for 4 days, does not induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters. Furthermore, the ergogenic effects observed in the supplementation and withdrawal conditions for 4 days were due to acute intake, verified by a similar blood concentration of caffeine.

Author Contributions: Conceptualization, A.P.M. and F.SJ.; Data curation, A.P.M. and F.SJ.; Formal analysis, A.P.M. and F.SJ.; Investigation, A.P.M. and F.SJ.; Methodology, A.P.M. and B.G.R.; Project administration, B.G.R.; Resources, A.P.M. and T.B.; Software, F.SJ.; Supervision, A.P.M. and B.G.R.; Validation, A.P.T.R.P.; Visualization, A.P.M., F.SJ. and B.G.R.; Writing – original draft, A.P.M. and B.G. R.; Writing – review & editing, A.P.M., F.SJ., T.B., A.P.T.R.P. and B.G.R.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Acknowledgments: The authors thank the cyclists from Macaé-RJ and Campos dos Goytacazes-RJ, cities. We also thanks, the teacher Thiago Costa Leite, nutritionist Alessandra Alegre and students of nutrition from our laboratory.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ribeiro, B.G.; Morales, A.P.; Sampaio-Jorge, F.; Tinoco, F.S.; Matos, A.A.; Leite, T.C. Acute effects of caffeine intake on athletic performance: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Chil. Nutr*. **2017**, 44, 283-291.

2. Ribeiro, B.G.; Morales, A.P.; Sampaio-Jorge, F.; Barth, T.; De Oliveira, M.B.; Coelho, G.M.; Leite, T.C. Caffeine attenuates decreases in leg power without increased muscle damage. *J. Strength Cond. Res.* **2016**, 30, 2354-2360.

3. Potgieter, S.; Wright, H.H.; Smith, C. Caffeine improves triathlon performance: a field study in males and females. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab*. **2018**, 28, 228-237.

4. Lopes, J.P.; Pliássova, A.; Cunha, R.A. The physiological effects of caffeine on synaptic transmission and plasticity in the mouse hippocampus selectively depend on adenosine A1 and A2A receptors. *Biochem. Pharmacol*. **2019**, 166, 313-321.

5. Cox, G.R.; Desbrow, B.; Montgomery, P.G.; Anderson, M.E.; Bruce, C.R.; Macrides, T.A.; Martin, D.T.; Moquin, A.; Roberts, A.; Hawley, J.A.; Burke, L.M. Effect of different protocols of caffeine intake on metabolism and endurance performance. *J. Appl. Physiol (1985)*. **2002**, 93, 990-999.

6. Bell, D.G.; McLellan, T.M. Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. *J. Appl. Physiol (1985)*. **2002**, 93, 1227-1234.

7. Irwin, C.; Desbrow, B.; Ellis, A.; O'Keeffe, B.; Grant, G.; Leveritt, M. Caffeine withdrawal and high-intensity endurance cycling performance. *J. Sports Sci*. **2011**, 29, 509-515.

8. Gonçalves, L.S.; Painelli, V.S.; Yamaguchi, G.; Oliveira, L.F.; Saunders, B.; Da Silva, R.P.; Maciel, E.; Artioli, G.G.; Roschel, H.; Gualano, B. Dispelling the myth that habitual caffeine consumption influences the performance response to acute caffeine supplementation. *J. Appl. Physiol (1985)*. **2017**, 123, 213-220.

9. Beaumont, R.; Cordery, P.; Funnell, M.; Mears, S.; James, L.; Watson, P. Chronic ingestion of a low dose of caffeine induces tolerance to the performance benefits of caffeine. *J. Sports Sci.* **2017**, 35, 1920-1927.

10. Lara, B.; Ruiz-Moreno, C.; Salinero, J.J.; Del Coso, J. Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. *PLoS ONE* **2019**, 14, e0210275.

11. Wilk, M.; Krzysztofik, M.; Maszczyk, A.; Chycki, J.; Zając, A. The acute effects of caffeine intake on time under tension and power generated during the bench press movement. *J. Int. Soc. Sports Nutr*. **2019**, 16, 8.

12. Maughan, R.J.; Burke, L.M.; Dvorak, J.; Larson-Meyer, D.E.; Peeling, P.; Phillips, S.M.; Rawson, E.S.; Walsh, N.P.; Garthe, I.; Geyer, H.; Meeusen, R.; van Loon, L.J.C.; Shirreffs, S.M.; Spriet, L.L.; Stuart, M.; Vernec, A.; Currell, K.; Ali, V.M.; Budgett, R.G.; Ljungqvist, A.;

Mountjoy, M.; Pitsiladis, Y.P.; Soligard, T.; Erdener, U.; Engebretsen, L. IOC consensus statement: dietary supplements and the high-performance athlete. *Br. J. Sports Med*. **2018**, 52, 439-455.

13. Landrum, R.E. College students use of caffeine and its relationship to personality. *Coll. Stud. J.* **1992**, 26, 151-155.

14. Borg, G. Borg's perceived exertion and pain scales. Champaign, Illinois, USA: Human Kinetics, **1998**.

15. Van Soeren, M.H.; Graham, T.E. Effect of caffeine on metabolism, exercise endurance, and catecholamine responses after withdrawal. *J. Appl. Physiol (1985)*. **1998**, 85, 1493-1501.

16. Graham, T.E.; Spriet, L.L. Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine. *J. Appl. Physiol (1985)*. **1995**, 78, 867-874.

17. Guest, N.; Corey, P.; Vescovi, J.; El-Sohemy, A. Caffeine, CYP1A2 genotype, and endurance performance in athletes. *Med. Sci. Sports Exerc*. **2018**, 50, 1570-1578.

18. Pickering, C.; Kiely, J. Are the current guidelines on caffeine use in sport optimal for everyone? Inter-individual variation in caffeine ergogenicity, and a move towards personalised sports nutrition. *Sports Med*. **2018**, 48, 7-16.

19. Svenningsson, P.; Nomikos, G.G.; Fredholm, BB. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *J. Neurosci*. **1999**, 19, 4011-4022.

20. Hearris, M.A.; Hammond, K.M.; Fell, J.M.; Morton, J.P. Regulation of muscle glycogen metabolism during exercise: implications for endurance performance and training adaptations. *Nutrients* **2018**, 10, pii: E298.

21. Lovallo, W.R.; al'Absi, M.; Blick, K.; Whitsett, T.L.; Wilson, M.F. Stress-like adrenocorticotropin responses to caffeine in young healthy men. *Pharmacol. Biochem. Behav*. **1996**, 55, 365-369.

22. Hill, E.E.; Zacki, E.; Battaglini, C.; Viru, M.; Viru, A.; Hackney, A.C. Exercise and circulating cortisol levels: the intensity threshold effect. *J. Endocrinol. Invest*. **2008**, 31, 587-591.

23. Jammes, Y.; Joulia, F.; Steinberg, J.G.; Ravailhe, S.; Delpierre, S.; Condo, J.; Guieu, R.; Delliaux, S. Endogenous adenosine release is involved in the control of heart rate in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. **2015**, 675, 667-675.

24. Amann, M. Significance of group III and IV muscle afferents for the endurance exercising human. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. **2012**, 39, 831-835.

25. Passfield, L.; Coakley, S. Comparing time-trial and time to exhaustion performance. *J. Sci. Cycling* **2014**, 3, 39.

26. Smirmaul, B.P.; de Moraes, A.C.; Angius, L.; Marcora, S.M. Effects of caffeine on neuromuscular fatigue and performance during high-intensity cycling exercise in moderate hypoxia. *Eur. J. Appl. Physiol*. **2017**, 117, 27-38.

27. Jones, A.M.; Wilkerson, D.P.; Vanhatalo, A.; Burnley, M. Influence of pacing strategy on O_2 uptake and exercise tolerance. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **2008**, 18, 615-626.

28. Chapman, R.F.; Mickleborough, T.D. The effects of caffeine on ventilation and pulmonary function during exercise: an often-overlooked response. *Physician Sportsmed*. **2009**, 37, 97-103.

29. Grgic, J.; Diaz-Lara, F.J.; Del Coso, J.; Duncan, M.J.; Tallis, J.; Pickering, C.; Schoenfeld, B.J.; Mikulic, P. The effects of caffeine ingestion on measures of rowing performance: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* **2020**, 12, 434.

30. Saunders, B.; de Oliveira, L.F.; da Silva, R.P.; de Salles Painelli, V.; Gonçalves, L.S.; Yamaguchi, G.; Gualano, B. Placebo in sports nutrition: a proof-of-principle study involving caffeine supplementation. *Scand. J. Med. Sci. Spor.* **2016,** *27, 1240–1247.*

31. Ribeiro, J.A.; Sebastião, A.M. Caffeine and adenosine. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, 20 Suppl 1, S3-S15.

32. Grgic, J.; Grgic, I.; Pickering, C.; Schoenfeld, B.J.; Bishop, D.J.; Pedisic, Z. Wake up and smell the coffee: caffeine supplementation and exercise performance-an umbrella review of 21 published meta-analyses. *Br. J. Sports Med.* **2020**, 54, 681-688.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

De acordo com os achados observados no estudo de revisão sistemática e metanálise, a ingestão de cafeína não induziu melhorias na performance atlética em testes que avaliam a distância máxima percorrida (*yo-yo test*) e potência muscular gerada em cicloergômetro, mas parece melhorar a performance de ciclistas que utilizam o contrarrelógio. Acredita-se que esse modelo de exercício (contrarrelógio) apresenta maior validade ecológica pela liberdade de regulação da intensidade, onde apresenta semelhanças das competições dos ciclistas. Além disso, o efeito potencial ergogênico da cafeína na performance nesse modelo de exercício está relacionado à dose de 6 mg.kg-1 de cafeína, que supostamente poderia causar saturação no metabolismo hepático e, consequentemente, a manutenção da concentração sanguínea de cafeína por um período prolongado. Esses achados foram confirmados em nossas investigações utilizando modelos experimentais com os triatletas e ciclistas.

Os resultados observados em triatletas indicaram que a suplementação ou retirada de cafeína (6 mg · kg-1 de massa corporal) por 4 dias, seguida de ingestão aguda, não impactou na potência de saída gerada no cicloergômetro após realizarem o exercício de intensidade submáxima na esteira ergométrica. Esses achados são explicados pela elevada intensidade do protocolo de exercício submáximo submetido aos triatletas em relação à condição cardiopulmonar. Dessa forma, deve-se atentar pelo grau de treinamento dos indivíduos para testar possíveis efeitos ergogênicos da ingestão aguda de cafeína em protocolos que associam exercícios de *endurance* e potência.

Os achados observados em ciclistas indicam que a cafeína, quando ingerida (consumidores moderados/altos de cafeína) na dose de 6 $mg \cdot kg^{-1}$ por 4 dias, não induz tolerância aos efeitos ergogênicos promovidos pela ingestão aguda em parâmetros fisiológicas, metabólicas e de performance. Além disso, os ciclistas que receberam a dose aguda de cafeína independente da suplementação ou retirada de 4 dias, mostraram melhorias no tempo e na potência de saída, acompanhado do aumento dos parâmetros de frequência cardíaca, volume minuto, fração expirada de O_2, concentração de lactato sanguíneo e redução da fração expirada de CO_2. Acredita-se que esses efeitos ergogênicos observados foram decorrentes da manutenção da concentração sanguínea de cafeína ao longo do tempo, promovida pela ingestão aguda. Assim, esses achados podem contribuir na utilização dessa estratégia no período curto (4 dias) de competições (período que exijam maiores cargas de trabalho), pois possibilitaria aos atletas suportarem uma sobrecarga fisiológica elevada no decorrer da realização das provas de ciclismo.

9. REFERÊNCIAS

ABBISS, C. R.; LAURSEN, P. B. Models to explain fatigue during prolonged endurance cycling. **Sports Medicine**, v. 35, n. 10, p. 865-898, 2005.

ABIC. **Indicadores da indústria de café no Brasil**. Associação Brasileira de Indústria de Café, Brasil, 2011.

ABOODARDA S. J.; IANNETTA, D.; EMAMI, N.; VARESCO, G.; MURIAS, J. M.; MILLET, G. Y. Effects of pre-induced fatigue vs. concurrent pain on exercise tolerance, neuromuscular performance and corticospinal responses of locomotor muscles. **Journal of Physiology**, v. 598, n. 2, p. 285-302, 2020.

ADDICOT, M. A.; YANG, L. L.; PEIFFER, A. M.; LAURIENTI, P. J. Methodological considerations for the quantification of self-reported caffeine use. **Psychopharmacology**, v. 203, n. 3, p. 571-578, 2008.

AGOSTONI, P.; PELLEGRINO, R.; CONCA, C.; RODARTE, J.; BRUSASCO, V. Exercise hyperpnea in chronic heart failure: relation to lung stiffness and exercise flow limitation. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 4, p. 1409-1416, 2002.

AHLIJANIAN, M. K.; TAKEMORI, A. E. Cross-tolerance studies between caffeine and (-)-N6-(phenylisopropyl)-adenosine (PIA) in mice. **Life Sciences**, v. 38, n. 7, p. 577-588, 1986.

ALGRAIN, H. A.; THOMAS, R. M.; CARRILLO, A. E.; RYAN, E. J.; KIM, C-H.; LETTAN, R. B.; RYAN, E. J. The effects of a polymorphism in the cytochrome P450 CYP1A2 gene on performance enhancement with caffeine in recreational cyclists. **Journal of Caffeine Research**, v. 6, n. 1, p. 34-39, 2016.

ALLEN, D. G.; LAMB, G. D.; WESTERBLAD, H. Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 1, p. 287-332, 2008.

ALLEN, D.; WESTERBLAD, H. Lactic acid-the latest performance-enhancing drug. **Science**, v. 305, n. 5687, p. 1112-1113, 2004.

ALTIMARI, L. R.; MORAES, A. C.; TIRAPEGUI, J.; MOREAU, R. L. M. Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 17-27, 2006.

ALVES, J.; TORO, V.; BARRIENTOS, G.; BARTOLOMÉ, I.; MUÑOZ, D.; MAYNAR, M. Hormonal changes in high-level aerobic male athletes during a sports season. **International Journal of Environmental Research** and **Public Health,** v. 17, n. 16, p. 5833, 2020.

AMANN, M. Central and peripheral fatigue: interaction during cycling exercise in humans. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 11, p. 2039-2045, 2011.

AMANN, M. Significance of group III and IV muscle afferents for the endurance exercising human. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 9, p. 831-835, 2012.

AMANN, M.; BLAIN, G. M.; PROCTOR, L. T.; SEBRANEK, J. J.; PEGELOW, D. F.; DEMPSEY, J. A. Group III and IV muscle afferents contribute to ventilatory and cardiovascular

response to rhythmic exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 109, n.4, p. 966-976, 2010.

AMANN, M.; HOPKINS, W. G.; MARCORA, S. M. Similar sensitivity of time to exhaustion and time-trial time to changes in endurance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 40, n.3, p. 574-578, 2008.

AMANN, M.; PROCTOR, L. T.; SEBRANEK, J. J.; PEGELOW, D. F.; DEMPSEY, J. A. Opioid-mediated muscle afferents inhibit central motor drive and limit peripheral muscle fatigue development in humans. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 1, p. 271-283, 2009.

AMANN, M.; ROMER, L.M.; SUBUDHI, A.W; PEGELOW, D.F.; DEMPSEY, J.A. Severity of arterial hypoxaemia affects the relative contributions of peripheral muscle fatigue to exercise performance in healthy humans. **Journal of Physiology**, v. 581, n . Pt 1, p. 389-403, 2007.

ANVISA. **Resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010**. Ministério da Saúde -MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_18_2010_COMP.pdf/1f6e1baf-fd83-4408-8e97-07578fe3db18. Acesso em: 17 abril 2018.

ARANDA, J. V.; GORMAN, W.; BERGSTEINSSON, H.; GUNN, T. Efficacy of caffeine in treatment of apnea in the low-birth-weight infant. **Jornal de Pediatria**, v. 90, n. 3, p. 467-472, 1977.

ARANGO, H. G. **Bioestatística Teórica e Computacional com bancos de dados reais em disco**. Editora Guanabara Koogan, 3ª edição, 2009.

ARMSTRONG, R. B.; DELP, M. D.; GOLJAN, E. F.; LAUGHLIN, M. H. Distribution of blood flow in muscles of miniature swine during exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 62, n. 3, p. 1285-1298, 1987.

ARNAUD, M. J. The pharmacology of caffeine. **Progress in Drug Research**, v. 31, p. 273-313, 1987.

ASTORINO, T. A; ROBERSON, D. W. Efficacy of acute caffeine ingestion for short-term high intensity exercise performance: a systematic review. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 24, n. 1, p. 257-265, 2010.

BAINBRIDGE, F. A. **The physiology of muscular exercise**. London: Longmans, 1919.

BANGSBO, J.; AAGAARD, T.; OLSEN, M.; KIENS, B.; TURCOTTE, L. P.; RICHTER, E. A. Lactate and H+ uptake in inactive muscles during intense exercise in man. **Journal of Physiology,** v. 488, n. Pt 1, p. 219-229, 1995.

BANGSBO, J.; HOSTRUP, M. [Lactate production contributes to development of fatigue during intense exercise in humans]. **Ugeskr Laeger**, v. 181, n. 8, p. V10180669, 2019.

BANGSBO, J.; JACOBSEN, K.; NORDBERG, N.; CHRISTENSEN, N. J.; GRAHAM, T. Acute and habitual caffeine ingestion and metabolic responses to steady-state exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 4, p. 1297-1303, 1992.

BARKER, A. T; JALINOUA, F. R; FREESTON, I. L. Non-invasive magnetic stimulation of the human motor cortex. **Lancet**, v. 1, n. 8437, p. 1106-1107, 1985.

BARNES, K. R.; KILDING, A. E. Running economy: measurement, norms, and determining factors. **Sports Medicine - Open**, v. 1, n. 1, p. 8, 2015.

BARONE, J. J.; ROBERTS, H. R. Caffeine consumption. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 119-129, 1996.

BARROS, R. C., BRANCO, L. G. Role of central adenosine in the respiratory and thermoregulatory responses to hypoxia. **NeuroReport,** v. 11, n. 1, p. 193-197, 2000.

BEAUMONT, R. **The performance and physiological effects of caffeine and octopamine supplementation during endurance cycle exercise**. Doctoral Thesis (Doctor of Philosophy) - Loughborough University, Loughborough, 2017.

BEAUMONT, R.; CORDERY, P.; FUNNELL, M.; MEARS, S.; JAMES, L.; WATSON, P. Chronic ingestion of a low dose of caffeine induces tolerance to the performance benefits of caffeine. **Journal of Sports Science**, v. 35, n. 19, p. 1920-19278, 2017.

BELL, C.; KOWALCHUK, J. M.; PATERSON, D. H.; SCHEUERMANN, B. W.; CUNNINGHAM, D. A. The effects of caffeine on the kinetics of O_2 uptake, CO_2 production and expiratory ventilation in humans during the on-transient of moderate and heavy intensity exercise. **Experimental Physiology**, v. 84, n. 4, p. 761-774, 1999.

BELL, D. G.; MCLELLAN, T. M. Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 4, p. 1227-1234, 2002.

BENARROCH, E. E. Adenosine and its receptors: multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. **Neurology**, v. 70, n. 3, p. 231-236, 2008.

BISSONNETTE, J. M.; HOHIMER, A. R.; CHAO, C. R.; KNOPP, S. J.; NOTOROBERTO, N. F. Theophylline stimulates fetal breathing movements during hypoxia. **Pediatric Research**, v. 28, n. 2, p. 83-86, 1990.

BLACKWOOD, S. J.; HANYA, E.; KATZ, A. Heating after intense repeated contractions inhibits glycogen accumulation in mouse EDL muscle: role of phosphorylase in post-exercise glycogen metabolism. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 315, n. 5, p. C706-C713, 2018.

BLANCHARD, J.; SAWERS, S. J. Comparative pharmacokinetics of caffeine in young and elderly men. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 11, n. 2, p. 109-26., 1983.

BONATI, M.; LATINI, R.; GALLETTI, F.; YOUNG, J. F.; TOGNONI, G.; GARATTINI, S. Caffeine disposition after oral doses. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 32, n. 1, p. 98-106, 1982.

BONATI, M.; LATINI, R.; TOGNONI, G.; YOUNG, J. F.; GARATTINI, S. Interspecies comparison of in vivo caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit, rat and mouse. **Drug Metabolism Reviews**, v. 15, n. 7, p. 1355-1383, 1985.

BONSIGNORE, M. R.; MORICI, G.; ABATE, P.; ROMANO, S.; BONSIGNORE, G. Ventilation and entrainment of breathing during cycling and running in triathletes. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 2, p. 239-245, 1998.

BORG, G. A. Psychophysical bases of perceived exertion. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 14, n . 5, p. 377-381, 1982.

BOUSHEL, R. Muscle metaboreflex control of the circulation during exercise. **Acta Physiologica**, v. 199, n. 4, p. 367-383, 2010.

BRASIL. **Acompanhamento da safra brasileira: Café**. CONAB, Brasília, 2018.

BURGOMASTER, K. A.; HUGHES, S. C.; HEIGENHAUSER, G. J. F.; BRADWELL, S. N.; GIBALA, M. J. Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 6, p. 1985-1990, 2005.

BROOKS, G. A. "Lactate as a Fulcrum of Metabolism." **Redox Biology**, v. 35, p. 101454, 2020.

BROOKS, J. H. W. K.; CHRISMAS, B. C. R. Acute effects of caffeine on strength performance in trained and untrained individuals. J**ournal of Athletic Enhancement**, v. 4, n. 6, 2015.

CADEGIANI, F. A.; da SILVA, P. H. L.; ABRAO, T. C. P.; KATER, C. E. Diagnosis of overtraining syndrome: results of the endocrine and metabolic responses on overtraining syndrome study: EROS-DIAGNOSIS. **Journal of Sports Medicine (Hindawi Publ Corp)**, v. 2020, p. 3937819, 2020.

CAIRNS, S. P. Lactic Acid and Exercise Performance Culprit or Friend? **Sports Medicine**, v. 36, n. 4, p. 279-291, 2006.

CAMARGO, M. C.; TOLEDO, M. C.; FARAH, H. G. Caffeine daily intake from dietary sources in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, n. 2, p. 79-87, 1999.

CASS, C. E.; YOUNG, J. D.; BALDWIN, S. A. Recent advances in the molecular biology of nucleoside transports of mammalian cells. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 76, n. 5, p. 761-770, 1998.

CBC. Confederação Brasileira de Ciclismo. **Agenda de eventos esportivos 2020**. Londrina, PR: 2020.

CHAPMAN, R. F.; MICKLEBOROUGH, T. D. The effects of caffeine on ventilation and pulmonary function during exercise: an often-overlooked response. **Physician and Sportsmedicine**, v. 37, n. 4, p. 97-103, 2009.

CHAPMAN, R. F; STAGER, J. M. Caffeine stimulates ventilation in athletes with exercise-induced hypoxemia. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 40, n. 6, p. 1080-1086, 2008.

CHEETHAM, M. E.; BOOBIS, L. H.; BROOKS, S.; WILLIAMS, C. Human muscle metabolism during sprint running. **Journal of Applied Physiology**, v. 61, n. 1, p. 54-60, 1986.

CHERN, Y.; LAI, H. L.; FONG, J. C.; LIANG, Y. Multiple mechanisms for desensitization of A2a adenosine receptor-mediated cAMP elevation in rat pheochromocytoma PC12 cells. **Molecular Pharmacology,** v. 44, n. 5, p. 950-958, 1993.

CLAUSEN, T. Na^+-K^+ pump regulation and skeletal muscle contractility. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1269-1324, 2003.

CONWAY, K. J; ORR, R.; STANNARD, S. R. Effect of a divided caffeine dose on endurance cycling performance, postexercise urinary caffeine concentration, and plasma paraxanthine. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 4, p. 1557-1562, 2003.

COOPER, R.; NACLERIO, F.; ALLGROVE, J.; LARUMBE-ZABALA, E. Effects of a carbohydrate and caffeine gel on intermittent sprint performance in recreationally trained males. **European Journal of Sport Science**, v. 14, n. 4, p. 353-161, 2014.

CORMIE, P.; MCGUIGAN, M. R.; NEWTON, R. U. Adaptations in athletic performance following ballistic power vs strength training. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 8, p. 1582-1598, 2010.

CORNELIS, M. C.; EL-SOHEMY, A.; KABAGAMBE, E. K.; CAMPOS, H. Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction. **JAMA**, v. 295, n. 10, p. 1135-1141, 2006.

COSTILL, D. L.; DALSKY, G. P.; FINK, W. J. Effects of caffeine ingestion on metabolism and exercise performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 10, n. 3, 1978.

COUTO, P. G.; TOMAZINI, F.; SILVA-CAVALCANTE, M. D.; CORREIA-OLIVEIRA, C. R.; SANTOS, R. A.; KISS, M. A. P. D. Contrarrelógio de ciclismo de média distância: determinação e reprodutibilidade de parâmetros derivados da distribuição de potência. **Revista da Educação Física/UEM**, v. 26, n. 3, p. 443-449, 2015.

COX, G. R.; DESBROW, B.; MONTGOMERY, P. G.; ANDERSON, M. E.; BRUCE, C. R.; MACRIDES, T. A.; MARTIN, D. T.; MOQUIN, A.; ROBERTS, A.; HAWLEY, J. A.; BURKE, L. M. Effect of different protocols of caffeine intake on metabolism and endurance performance. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n .3, p. 990-999, 2002.

CURRELL, K.; JEUKENDRUP, A. E. Validity, reliability and sensitivity of measures of sporting performance. **Sports Medicine**, v. 38, n. 4, p. 297-316, 2008.

DALY, J. W. Caffeine analogs: biomedical impact. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 16, p. 2153-2169, 2007.

DALY, J. W.; BUTTS-LAMB, P.; PADGETT, W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 3, n. 1, p. 69-80, 1983.

DALY, J. W.; SHI, D.; NIKODIJEVIC, O.; JACOBSON, K. A. The role of adenosine receptors in the central action of caffeine. P**harmacopsychoecologia**, v. 7, n. 2, p. 201-213, 1994.

DAVID, R. B.; EDWARD, T. H. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 32, n. 1, p. 70-84, 2000.

DAVIS, J. M.; ZHAO, Z.; STOCK, H. S.; MEHL, K. A.; BUGGY, J.; HAND, G. A. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 2, p. R399-404, 2003.

DEBOLD, E. P. Recent Insights into the molecular basis of muscular fatigue. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 44, n. 8, p. 1440-1452, 2012.

DECORTE, N.; LAFAIX, P. A.; MILLET, G. Y.; WUYAM, B.; VERGES, S. Central and peripheral fatigue kinetics during exhaustive constant-load cycling. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 22, n. 3, p. 381-391, 2012.

DEL COSO, J.; MUÑOZ, G.; MUÑOZ-GUERRA, J. Prevalence of caffeine use in elite athletes following its removal from the World Anti-Doping Agency list of banned substances. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 36, n. 4, p. 555-561, 2011.

DEMPSEY, J. A.; HANSON, P. E.; HENDERSON, K. S. Exercise-induced arterial hypoxemia in healthy persons at sea level. **Journal of Physiology**, v. 355, p. 161-175, 1984.

DE PAUW, K.; ROELANDS, B.; VAN CUTSEM, J.; MARUSIC, U.; TORBEYNS, T.; MEEUSEN, R. Electro-physiological changes in the brain induced by caffeine or glucose nasal spray. **Psychopharmacology**, v. 234, n. 1, p. 53-62, 2017.

DESBROW, B.; BIDDULPH, C.; DEVLIN, B.; GRANT, G. D.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S.; LEVERITT, M. D. The effects of different doses of caffeine on endurance cycling time trial performance. **Journal of Sports Sciences**, v. 30, n. 2, p. 115-120, 2012.

DESBROW, B.; LEVERITT, M. D. Awareness and use of caffeine by athletes competing at the 2005 Ironman Triathlon World Championships. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 16, n. 5, p. 545-558, 2006.

DJORDJEVIC, N.; GHOTBI, R.; BERTILSSON, L.; JANKOVIC, S.; AKLILLU, E. Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption in Serbs and Swedes. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 381-385, 2008.

DODD, S. L.; BROOKS, E.; POWERS, S. K,; TULLEY, R. The effects of caffeine on graded exercise performance in caffeine naive versus habituated subjects. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 62, n. 6, p. 424-429, 1991.

DUARTE, T.; MENEZES-RODRIGUES, F. S.; GODINHO, R. O. Contribution of the extracellular cAMP-adenosine pathway to dual coupling of β2-adrenoceptors to Gs and Gi proteins in mouse skeletal muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 341, n. 3, p. 820-828, 2012.

D'URZO, A. D.; JHIRAD, R.; JENNE, H.; AVENDANO, M. A.; RUBINSTEIN, I.; D'COSTA, M.; GOLDSTEIN, R. S. Effect of caffeine on ventilator responses to hypercapnia, hypoxia, and exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 68, n. 1, p. 322-328, 1990.

EDWARDS, R. H. Human muscle function and fatigue. **Ciba Found Symp**, v. 82, p. 1-18, 1981.

EICHLER, O. **Zentrale Wirkung, in Kaffee und Coffein.** (Eichler O ed) p. 65-102, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976.

EL YACOUBI, M.; LEDENT, C.; MENARD, J. F.; PARMENTIER, M.; COSTENTIN, J.; VAUGEOIS, J. M. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. **British Journal of Pharmacology**, v.129, n. 7, p. 1465-1473, 2000.

ELTZSCHIG, H. K. Adenosine: An old drug newly discovered. **Anesthesiology**, v. 111, n. 4, p. 904-915, 2009.

ESSIG, D.; COSTILL, D. L.; VAN HANDEL, P. J. Effects of caffeine ingestion on utilisation of muscle glycogen and lipid during ergometer exercise. **Journal of Sports Medicine**, v. 01, n. 2, p.86-90, 1980.

ESTON, R. Use of ratings of perceived exertion in sports. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v. 7, n. 2, p. 175-182, 2012.

FAIN, J. N.; POINTER, R. H.; WARD, W. F. Effects of adenosine nucleosides on adenylate cyclase, phosphodiesterase, cyclic adenosine monophosphate accumulation, and lipolysis in fat cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 21, p. 6866-6872, 1972.

FARIA, E. W.; PARKER, D. L.; FARIA, I. E. The science of cycling: physiology and training - part 1. **Sports Medicine**, v. 35, n. 4, p. 285-312, 2005.

FARIA, V. C.; LIMA, L. M.; PEREIRA, J. C; MARINS, J. C. B. Variáveis psicofisiológicas durante exercício físico frente a diferentes condutas de alimentação e hidratação. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 38, n. 4, p. 334-341, 2016.

FARAH, A.; MONTEIRO, M. C.; CALADO, V.; FRANCA, A.; TRUGO, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.

FAUL, F.; ERDFELDER, E.; LANG, A. G.; BUCHNER, A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, v. 39, n. 2, p. 175-191, 2007.

FERRÉ, S. Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. Suppl 1, p. S35-49, 2010.

FERRÉ, S.; FUXE, K.; VON EULER, G.; JOHANSSON, B.; FREDHOLM, B. B. Adenosine dopamine interactions in the brain. **Neuroscience**, v. 51, n. 3, p. 501-512, 1992.

FISHER, S. M.; MCMURRAY, R. G.; BERRY, M.; MAR, M. H.; FORSYTHE, W. A. Influence of caffeine on exercise performance in habitual caffeine users. **International Journal of Sports Medicine**, v. 7, n. 5, 276-280, 1986.

FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 7-8, p. 857-872, 2004.

FITT, E.; PELL, D.; COLE, D. Assessing caffeine intake in the United Kingdom diet. **Food Chemistry**, v. 140, n. 3, p. 421-426, 2013.

FOLTZ, E. E.; IVY, A. C.; BARBORKA. C. J. The influence of amphetamine (Benzedrine) sulfate, ddesoxyephedrine hydrochloride (pervitin), and caffeine upon work output and recovery when

rapidly exhausting work is done by trained subjects. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 28, p. 603-606, 1943.

FREDHOLM, B. B. Adenosine actions and adenosine receptors after 1 week treatment with caffeine. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 115, n. 2, p. 283-286, 1982.

FREDHOLM, B. B. Are the actions of methylxanthines due to antagonism of adenosine. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.1, n. 1, p. 129-132, 1980.

FREDHOLM, B. B.; BÄTTIG, K.; HOLMÉN, J.; NEHLIG, A.; ZVARTAU, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 83-133, 1999.

FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; KLOTZ, K. N.; LINDEN, J. International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 527-552, 2001.

FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; LINDEN, J.; MÜLLER, C. E. International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors-an update. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1-34, 2011.

GANDEVIA, S. C. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 4, p. 1725-1789, 2001.

GANIO, M. S.; KLAU, J. F.; CASA, D. J.; ARMSTRONG, L. E.; MARESH, C. M. Effect of caffeine onsport-specific endurance performance: a systematic review. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 23, n. 1, p. 315-324, 2009.

GOLDSTEIN, E. R.; ZIEGENFUSS, T.; KALMAN, D.; KREIDER, R.; CAMPBELL, B.; WILBORN, C.; TAYLOR, L.; WILLOUGHBY, D.; STOUT, J.; GRAVES, B. S.; WILDMAN, R.; IVY, J. L.; SPANO, M.; SMITH, A. E.; ANTONIO, J. International society of sports nutrition position stand: caffeine and performance. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 5, 2010.

GONÇALVES, L. S.; PAINELLI, V. S.; YAMAGUCHI, G.; OLIVEIRA, L. F.; SAUNDERS, B.; DA SILVA, R. P.; MACIEL, E.; ARTIOLI, G. G.; ROSCHEL, H.; GUALANO, B. Dispelling the myth that habitual caffeine consumption influences the performance response to acute caffeine supplementation. **Journal of Applied Physiology**, v. 123, n. 1, p. 213-220, 2017.

GRAHAM, T. E. Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. **Sports Medicine**, v. 31, n. 11, p. 785-807, 2001.

GRAHAM, T. E.; BATTRAM, D. S.; DELA, F.; EL-SOHEMY, A.; THONG, F. S. Does caffeine alter muscle carbohydrate and fat metabolism during exercise? **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 33, n. 6, p. 1311-1318, 2008.

GRAHAM, T. E.; HELGE, J. W.; MACLEAN, D. A.; KIENS, B.; RICHTER, E. A. Caffeine ingestion does not later carbohydrate or fat metabolism in human skeletal muscle during exercise. **Journal of Physiology**, v. 529, n. Pt 3, p. 837-847, 2000.

GRAHAM, T. E.; SPRIET, L. L. Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine. **Journal of Applied Physiology**, v. 78, n. 3, p. 867-874, 1995.

GRAHAM, T. E.; SPRIET, L. L. Performance and metabolic responses to a high caffeine dose during prolonged exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 71, n. 6, p. 2292-2298, 1991.

GRAZZI, G.; ALFIERI, N.; BORSETTO, C.; CASONI, I.; MANFREDINI, F.; MAZZONI, G.; CONCONI, F. The power output/heart rate relationship in cycling: test standardization and repeatability. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 31, n. 10, p. 1478-1483, 1999.

GREEN, H. J. Mechanisms of muscle fatigue in intense exercise. **Journal of Sports Sciences**, v. 15, n. 3, p. 247-256, 1997.

GRGIC, J.; MIKULIC, P. Acute effects of caffeine supplementation on resistance exercise, jumping, and wingate performance: no influence of habitual caffeine intake. **European Journal of Sport Science**, v. 2, p. 1-11, 2020.

GRGIC, J.; TREXLER, E. T.; LAZINICA, B.; PEDISIC, Z. Effects of caffeine intake on muscle strength and power: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 15, p. 11, 2018.

GUEST, N.; COREY, P.; VESCOVI, J.; EL-SOHEMY, A. Caffeine, CYP1A2 genotype, and endurance performance in athletes. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 50, n. 8, p. 1570-1578, 2018.

GUEST, N. S.; VANDUSSELDORP, T. A.; NELSON, M. T.; NELSON,, M. T.; GRGIC, J.; SCHOENFELD, B. J.; JENKINS, N. D. M.; ARENT, S. M.; ANTONIO, J.; STOUT, J. R.; TREXLER, E. T.; SMITH-RYAN, A. E.; GOLDSTEIN, E. R.; KALMAN, D. S.; CAMPBELL, B. I. International society of sports nutrition position stand: caffeine and exercise performance. **Journal of the International Society of Sports Nutrition,** v. 18, n. 1, p. 2-37, 2021.

HACKNEY, A. C.; LANE, A. R. Exercise and the regulation of endocrine hormones. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 135, p. 293-311, 2015.

HALDI, J.; WYNN, W. Actions of drugs on efficiency of swimmers. **Journal Research Quarterly**, v. 17, p. 96-101, 1946.

HAMLIN, M. J.; MARSHALL, H. C.; HELLEMANS, J.; AINSLIE, P. N. Effect of intermittent hypoxia on muscle and cerebral oxygenation during a 20-km time trial in elite athletes: a preliminary report. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 35, n. 4, p. 548-559, 2010.

HARMS, C. A.; BABCOCK, M. A.; MCCLARAN, S. R.; PEGELOW, D. F.; NICKELE, G. A.; NELSON, W. B, DEMPSEY, J. A. Respiratory muscle work compromises leg blood flow during maximal exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 82, n. 5, p. 1573-1583, 1997.

HARMS, C. A.; WETTER, T. J.; MCCLARAN, S. R.; PEGELOW, D. F.; NICKELE, G. A.; NELSON, W. B.; HANSON, P.; DEMPSEY, J. A. Effects of respiratory muscle work on cardiac output and its distribution during maximal exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 85, n .2, p. 609-618, 1998.

HERMAN, J. P.; FIGUEIREDO, H.; MUELLER, N. K.; ULRICH-LAI, Y.; OSTRANDER, M. M.; CHOI, D. C.; CULLINAN, W. E. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypoyhalamopituitary-adrenocortical responsiveness. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 24, n. 3, p. 101-123, 2006.

HETZLER, R. K.; WARHAFTIGGLYNN, N.; THOMPSON, D. L.; DOWLING, E.; WELTMAN, A. Effects of acute caffeine withdrawal on habituated male runners. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, n. 3, p. 1043-1048, 1994.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 2, p. 101-23, 2006.

HIGGINS, J. P.; BABU, K. M. Caffeine reduces myocardial blood flow during exercise. **American Journal of Medicine**, v. 126, n. 8, p. 730 e 1-8, 2013.

HIGGINS, S.; STRAIGHT, C. R.; LEWIS, R. D. The effects of preexercise caffeinated coffee ingestion on endurance performance: an evidence-based review. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 26, n. 3, p. 221-239, 2016.

HODGSON, A. B.; RANDELL, R. K.; JEUKENDRUP, A. E. The metabolic and performance effects of caffeine compared to coffee during endurance exercise. **PLos One**, v. 8, n. 4, p. e59561, 2013.

HOLTZMAN, S. G.; FINN, I. B. Tolerance to behavioral effects of caffeine in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 29, n. 2, p. 411-418, 1988.

HOPKINS, W. G.; SCHABORT. E. J.; HAWLEY, J. A. Reliability of power in physical performance tests. **Sports Medicine**, v. 31, n. 3, p. 211-234, 2001.

HSU, M. J.; CHAN, H. L.; HUANG, Y. Z.; LIN, J. H.; HSU, H. H.; CHANG, Y. J. Mechanism of fatigue induced by different cycling paradigms with equivalent dosage. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 545, 2020.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística **- Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008/2009 – Tabelas de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil**. 1ª ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

IRWIN, C.; DESBROW, B.; ELLIS, A.; O'KEEFFE, B.; GRANT, G.; LEVERITT, M. Caffeine withdrawal and high-intensity endurance cycling performance. **Journal of Sports Sciences**, v. 29, n. 5, p. 509-15, 2011.

IVY, J. L.; COSTILL, D. L.; FINK, W. J.; LOWER, R. W. Influence of caffeine and carbohydrate feedings on endurance performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise,** v.11, n. 1, p. 6-11, 1979.

JACOBSON, K. A. Adenosine A_3 receptors: novel ligands and paradoxical effects. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 5, p. 184-191, 1998.

JAMES, R. S.; WILSON, R. S.; ASKEW, G. N. Effects of caffeine on mouse skeletal muscle power during recovery from fatigue. **Journal of Applied Physiology**, v.96, n. 2, p. 545-552, 2004.

JEUKENDRUP, A. E.; HOPKINS, S.; VARGAS, L. F. A.; HULSTON, C. No effect of carbohydrate feeding on 16 km cycling time trial performance. **European Journal of Applied Physiology,** v. 104, n. 5, p. 831-837, 2008.

JEUKENDRUP, A.; SARIS, W. H.; BROUNS, F.; KESTER, A. D. A new validated endurance performance test. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 28, n. 2, p. 266-270, 1996.

JODRA, P.; LAGO-RODRÍGUEZ, A.; SÁNCHEZ-OLIVER, A. J.; LÓPEZ-SAMANES, A.; PÉREZ-LÓPEZ, A.; VEIGA-HERREROS, P.; SAN JUAN FERRER, A.; DOMÍNGUEZ, R. Effects of caffeine supplementation on physical performance and mood dimensions in elite and trained-recreational athletes. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 17, n. 2, p. 2, 2020.

JUEL, C. Regulation of pH in human skeletal muscle: adaptations to physical activity. **Acta Physiologica**, v. 193, n. 1, p. 17-24, 2008.

JULIANO, L. M.; GRIFFITHS, R. R. A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. **Psychopharmacology**, v. 176, n. 1, p. 1-29, 2004.

KAMIMORI, G. H.; KARYEKAR, C. S,; OTTERSTETTER, R.; COX, D. S.; BALKIN, T. J.; BELENKY, G. L.; EDDINGTON, N. D. The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 234, n. 1-2, p. 159-167, 2002.

KARSTEN, B.; BAKER, J.; NACLERIO, F.; KLOSE, A.; BIANCO, A.; NIMMERICHTER, A. Time trials versus time-to-exhaustion tests: Effects on critical power, W', and oxygen-uptake kinetics. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v. 13, n. 2, p. 183-188, 2018.

KATAYAMA, K.; GOTO, K.; SHIMIZU, K.; SAITO, M.; ISHIDA, K.; ZHANG, L.; SHIOZAWA, K.; SHEEL, A. W. Effect of increased inspiratory muscle work on blood flow to inactive and active limbs during submaximal dynamic exercise. **Experimental Physiology**, v. 104, n. 2, p. 180-188, 2019.

KHANNA, N. N.; BADA, H. S.; SOMANI, S. M. Use of salivary concentrations in the prediction of serum caffeine and theophylline concentrations in premature infants. **Jornal de Pediatria,** v. 96, n. 3 Pt , p. 494-499, 1980.

KIRSCHBAUM, C.; HELLHAMMER, D. H. Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 4, p. 313-333, 1994.

KUO, I. Y.; EHRLICH, B. E. Signaling in muscle contraction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.7, n. 2, p. a006023, 2015.

LAIZURE, S. C.; MEIBOHM, B.; NELSON, K.; CHEN, F.; HU, Z. Y.; PARKER, R. B. Comparison of caffeine disposition following administration by oral solution (energy drink) and inspired powder (AeroShot) in human subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 83, n. 12, p. 2687-2694, 2017.

LANDRUM, R. E. College students use of caffeine and its relationship to personality. **College Student Journal**, v. 26, n. 2, p. 151-155, 1992.

LARA, B.; RUIZ-MORENO, C.; SALINERO, J. J.; DEL COSO, J. Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. **PLoS ONE**, v. 14, p. e0210275, 2019.

LAUGHLIN, M. H.; KLABUNDE, R. E.; DELP, M. D.; ARMSTRONG, R. B. Effects of dipyridamole on muscle blood flow in exercising miniature swine. **American Journal of Physiology**, v. 257, n. 5 Pt 2, p. H1507-H1515, 1989.

LELO, A.; MINERS, J. O.; ROBSON, R. A.; BIRKETT, D. J. Quantitative assessment of caffeine partial clearances in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 2, p.183-86, 1986.

LIGUORI, A.; HUGHES, J. R.; GRASS, J. A. Absorption and subjective effects of caffeine from coffee, cola and capsules. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, n. 3, p. 721-726, 1997.

LINDSKOG, M.; SVENNINGSSON, P.; POZZI, L.; KIM, Y.; FIENBERG, A. A.; BIBB, J. A.; FREDHOLM, B. B.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P.; FISONE, G. Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. **Nature**, v. 418, n. 6899, p. 744-748, 2002.

LOPES, J. P.; PLIÁSSOVA, A.; CUNHA, R. A. The physiological effects of caffeine on synaptic transmission and plasticity in the mouse hippocampus selectively depend on adenosine A1 and A2A receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 166, p. 313-321, 2019.

LOY, B. D.; O'CONNOR, P. J.; LINDHEIMER, J. B.; COVERT, S. F. Caffeine is ergogenic for adenosine A2A receptor gene (ADORA2A) T allele homozygotes: a pilot study. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 5, n. 2, p. 73–81, 2015.

LUCÍA, A.; HOYOS, J.; PÉREZ, M.; SANTALLA, A.; CHICHARRO, J. L. Inverse relationship between VO_2max and economy/efficiency in world-class cyclists. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 34, n. 12, p. 2079-2084, 2002.

LUCÍA, A.; PARDO, J.; DURÁNTEZ, A.; HOYOS, J.; CHICHARRO, J. L. Physiological differences between professional and elite road cyclists. **International Journal of Sports Medicine**, v. 19, n. 5, p. 342-348, 1998.

MANDEL, H. G. Update on caffeine consumption, disposition and action. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 9, p. 1231-1234, 2002.

MANOHAR, M. Blood flow to the respiratory and limb muscles and to abdominal organs during maximal exertion in ponies. **Journal of Physiology**, v. 377, p. 25-35, 1986.

MARINO, F. E. The limitations of the constant load and self-paced exercise models of exercise physiology. **Comparative Exercise Physiology**, v. 8, n. 1, p. 3-9, 2012.

MARTINS, G. L.; GUILHERME, J. P. L. F.; FERREIRA, L. H. B.; de SOUZA-JUNIOR, T. P.; LANCHA, A. H. Jr. Caffeine and exercise performance: Possible directions for definitive findings. **Frontiers in Sports and Active Living**, v. 2, p. 574854, 2020.

MARANGOS, P. J.; BOULENGER, J. P.; PATEL, J. Effects of chronic caffeine on brain adenosine receptors: regional and ontogenetic studies. **Life Sciences**, v. 34, n. 9, p. 899-907, 1984.

MAUGHAN, R.J.; BURKE, L.M.; DVORAK, J.; LARSON-MEYER, D.E.; PEELING, P.; PHILLIPS, S.M.; RAWSON, E.S.; WALSH, N.P.; GARTHE, I.; GEYER, H. *et al*. IOC consensus statement: Dietary supplements and the high-performance athlete. **British Journal of Sports Medicine**, v. 52, n. 7, p. 439-455, 2018.

MCCALL, A. L.; MILLINGTON, W. R.; WURTMAN, R. J. Blood-brain barrier transport of caffeine: Dose-related restriction of adenine transport. **Life Science,** v. 31, n. 24, p. 2709–2715, 1982.

MIZUNO, M.; KIMURA, Y.; TOKIZAWA, K.; ISHII, K.; ODA, K.; SASAKI, T.; NAKAMURA, Y.; MURAOKA, I.; ISHIWATA, K. Greater adenosine A2A receptor densities in cardiac and skeletal muscle in endurance-trained men: a [11C] TMSX PET study. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 32, n. 8, p. 831-836, 2005.

MORELLI, M; SIMOLA, N. Methylxantines and drug dependence: a focus on interactions with substances of abuse. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 200, p. 483-507, 2011.

MORGAN, K. J.; STULTS, V. J.; ZABIK, M. E. Amount and dietary sources of caffeine and saccharin intake by individuals ages 5 to 18 years. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 296-307, 1982.

MORGAN, P. T.; BLACK, M. I.; BAILEY, S. J.; JONES, A. M.; VANHATALO, A. Road cycle TT performance: Relationship to the power-duration model and association with FTP. **Journal of Sports Sciences**, v. 37, n. 8, p. 902-910, 2019.

MUKUND, K.; SUBRAMANIAM, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. e1462, 2020.

MURPHY, T. L.; MCIVOR, C.; YAP, A.; COOKSLEY, W. G.; HALLIDAY, J. W.; POWELL, L. W. The effect of smoking on caffeine elimination: Implications for its use as a semiquantitative test of liver function. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 15, n. 1, p. 9-13, 1988.

NAMDAR, M.; SCHEPIS, T.; KOEPFLI, P.; GAEMPERLI, O.; SIEGRIST, P. T.; GRATHWOHL, R.; VALENTA, I.; DELALOYE, R.; KLAINGUTI, M.; WYSS, C. A.; LÜSCHER, T. F.; KAUFMANN, P. A. Caffeine impairs myocardial blood flow response to physical exercise in patients with coronary artery disease as well as in age-matched controls. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5665, 2009.

NEWTON, R.; BROUGHTON.; L. J.; LIND, M. J.; MORRISON, P. J.; ROGERS, H. J. BRADBROOK ID. Plasma and salivary pharmacokinetics of caffeine in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 1, p. 45-52, 1981.

NIKODIJEVIC, O.; JACOBSON, K. A.; DALY, J. W. Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 44, n. 1, p. 199-216, 1993.

NOAKES, T. D. Fatigue is a brain-derived emotion that regulates the exercise behavior to ensure the protection of whole body homeostasis. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 82, p. 1-13, 2012.

NOAKES, T. D. Linear relationship between the perception of effort and the duration of constant load exercise that remains. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 4, p. 1571-1572, 2004.

NOAKES, T. D.; ST CLAIR GIBSON, A.; LAMBERT, E. V. From catastrophe to complexity: a novel model of integrative central neural regulation of effort and fatigue during exercise in humans: summary and conclusions. **British Journal of Sports Medicine**, v. 39, n. 2, p. 120-124, 2005.

OLIVEIRA, L.; YAMAGUCHI, G.; PAINELLI, V.; SILVA, R.; GONÇALVES, L.; GUALANO, B.; SAUNDERS, B. Comprehensive reliability analysis of a 16 km simulated cycling time-trial in well-trained individuals. **Journal of Science and Cycling**, v. 6, n. 1, p. 11-17, 2017.

PALATINI. P.; BENETTI, E.; MOS, L.; GARAVELLI, G.; MAZZER, A.; COZZIO, S.; FANIA, C.; CASIGLIA, E. Association of coffee consumption and CYP1A2 polymorphism with risk of impaired fasting glucose in hypertensive patients. **European Journal of Epidemiology**, v. 30, n. 3, p. 209-217, 2015.

PASMAN, W. J.; VAN BAAK, M. A.; JEUKENDRUP, A. E.; DE HAAN, A. The effect of different dosages of caffeine on endurance performance time. **International Journal of Sports Medicine**, v. 16, n. 4, p. 225-230, 1995.

PASSFIELD, L.; COAKLEY, S. Comparing time-trial and time to exhaustion performance. **Journal of Science and Cycling**, v. 3, n. 2, p. 39, 2014.

PATAKY, M. W.; WOMACK, C. J.; SAUNDERS, M. J.; GOFFE, J. L.; D'LUGOS, A. C.; EL-SOHEMYA, LUDEN, N. D. Caffeine and 3-km cycling performance: effects of mouth rinsing, genotype, and time of day. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 26, n. 6, p. 613-619, 2016.

PATON, C. D.; HOPKINS, W. G. Tests of cycling performance. **Sports Medicine**, v. 31, n. 7, p. 489-496, 2001.

PATWARDHAN, R. V.; DESMOND, P. V.; JOHNSON, R. F.; SCHENKER, S. Impaired elimination of caffeine by oral contraceptive steroids. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine,** v. 95, n. 4, p. 603-608, 1980.

PERIM, R. R.; SIGNORELLI, G. R.; MYERS, J.; ARENA, R.; DE ARAÚJO, C. G. The slope of the oxygen pulse curve does not depend on the maximal heart rate in elite soccer players. **Clinics**, v. 66, n. 5, p. 829-835, 2011.

PHUKAN, K.; NANDY, M.; SHARMA, R. B.; SHARMA, H. K. Nanosized drug delivery systems for direct nose to brain targeting: a review. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 10, n. 2, p. 156-164, 2016.

PIANOSI, P.; GRONDIN, D.; DESMOND, K.; COATES, A. L.; ARANDA, J. V. Effect of caffeine on the ventilatory response to inhaled carbon dioxide. **Respiration Physiology**, v. 95, n. 3, p. 311-320, 1994.

PICKERING, C.; KIELY, J. Are the current guidelines on caffeine use in sport optimal for everyone? Inter-individual variation in caffeine ergogenicity, and a move towards personalised sports nutrition. **Sports Medicine**, v. 48, n. 1, p. 7-16, 2018.

PICKERING, C.; KIELY, J. What should we do about habitual caffeine use in athletes? **Sports Medicine**, v. 49, n. 6, p. 833-842, 2019.

PLASKETT, C. J.; CAFARELLI, E. Caffeine increases endurance and attenuates force sensation during submaximal isometric concentrations. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 4, p. 1535-1544, 2011.

POTGIETER, S.; WRIGHT, H. H.; SMITH, C. Caffeine improves triathlon performance: A field study in males and females. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 228-237, 2018.

POWERS, S. K.; DODD, S.; LAWLER, J.; LANDRY, G.; KIRTLEY, M.; MCKNIGHT, T.; GRINTON, S. Incidence of exercise induced hypoxemia in elite endurance athletes at sea level. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 58, n. 3, p. 298-302, 1988.

POWERS, S. K.; DODD, S.; WOODYARD, J.; MAGNUM, M. Caffeine alters ventilator and gas exchange kinetics during exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 18, n. 1, p. 101-106, 1986.

REYES, C. M.; CORNELIS, M. C. Caffeine in the Diet: Country-Level consumption and guidelines. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. pii: E1772, 2018.

RIBEIRO, B. G.; MORALES, A. P.; SAMPAIO-JORGE, F.; BARTH, T.; DE OLIVEIRA, M. B.; COELHO, G. M.; LEITE, T. C. Caffeine attenuates decreases in leg power without increased muscle damage. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 30, n. 8, p. 2354-2360, 2016.

RIBEIRO, B. G.; MORALES, A. P.; SAMPAIO-JORGE, F.; TINOCO, F. S.; MATOS, A. A.; LEITE, T. C. Acute effects of caffeine intake on athletic performance: A systematic review and meta-analysis. **Revista chilena de nutrición**, v. 44, n. 3, p. 283-291, 2017.

RICHARDSON, D. L.; CLARKE, N. D. Effect of coffee and caffeine ingestion on resistance exercise performance. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 30, n. 10, p. 2892-2900, 2016.

RIVERS, W. H. R.; WEBBER, H. N. The action of caffeine on the capacity for muscular. **Journal of Physiology**, v. 36, n. 1, p. 33-47, 1907.

RIVKEES, S. A.; WENDLER, C. C. Regulation of cardiovascular development by adenosine and adenosine-mediated embryo protection. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 4, p. 851-855, 2012.

ROBERGS, R. A. Exercise-Induced Metabolic Acidosis: Where do the protons come from? **Sportscience**, v. 5, 2001. sportsci.org/jour/0102/rar.htm

ROBERGS, R. A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative**, v. 287, n. 3, p. R502-R516, 2004.

ROBERTSON, D.; WADE, D.; WORKMAN, R.; WOOSLEY, R. L.; OATES, J. A. Tolerance to the humoral and hemodynamic effects of caffeine in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 67, n. 4, p. 1111-1117, 1981.

ROTH, D. A. The sarcolemmal lactate transporter: transmembrane determinants of lactate flux. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 23, n. 8, p. 925-934, 1991.

SADEK, P.; PAN, X.; SHEPHERD, P.; MALANDAIN, E.; CARNEY, J.; COLEMAN, H. A randomized, two-way crossover study to evaluate the pharmacokinetics of caffeine delivered using

caffeinated chewing gum versus a marketed caffeinated beverage in healthy adult volunteers. **Journal of Caffeine Research**, v. 7, n. 4, p. 125-132, 2017.

SALAM, H.; MARCORA, S. M.; HOPKER, J. G. The effect of mental fatigue on critical power during cycling exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 118, n. 1, p. 85-92, 2018.

SALINERO, J. J.; LARA, B.; RUIZ-VICENTE, D.; ARECES, F.; PUENTE-TORRES, C.; GALLO-SALAZAR, C.; PASCUAL, T.; DEL COSO, J. CYP1A2 Genotype variations do not modify the benefits and drawbacks of caffeine during exercise: a pilot study. **Nutrients**, v. 9, n. 3, p. E269, 2017.

SARTORI, A. G. O.; SILVA, M. V. Caffeine in Brazil: intake, socioeconomic and demographic determinants, and major dietary sources. **Nutriri**, v. 41, n. 11, p. 2-7, 2016.

SAWYNOK, J. Methylxanthines and pain. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 200, p. 311-329, 2011.

SCHANKER, L. S.; SHORE, P. A.; BRODIE, B. B.; HOGBEN, C. A. Absorption of drugs from the stomach I. The rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 120, n. 4, p. 528-539, 1957.

SCOTT, A. T.; O'LEARY, T.; WALKER, S.; OWEN, R. Improvement of 2000-m rowing performance with caffeinated carbohydrate-gel ingestion. International Journal of Sports Physiology and Performance, v. 10, n. 4, p. 464-468, 2015.

SHI, D.; NIKODIJEVIC, O.; JACOBSON, K. A.; DALY, J. W. Chronic caffeine alters the density of A1-adenosine, ß-adrenergic, serotonin, cholinergic, and GABAA receptors and calcium channels in mouse brain. **Cellular Molecular Neurobiology**, v. 13, n. 3, p. 247-261, 1993.

SIDHU, S. K.; WEAVIL, J. C.; MANGUM, T. S.; JESSOP, J. E.; RICHARDSON, R. S.; MORGAN, D. E.; AMANN, M. Group III/IV locomotor muscle afferents alter motor cortical and corticospinal excitability and promote central fatigue during cycling exercise. **Clinical Neurophysiology**, v. 128, n. 1, p. 44-55, 2017.

SIDHU, S. K.; WEAVIL, J. C.; VENTURELLI, M.; GARTEN, R. S.; ROSSMAN, M. J.; RICHARDSON, R. S.; GMELCH, B. S.; MORGAN, D. E.; AMANN, M. Spinal μ-opioid receptor-sensitive lower limb muscle afferents determine corticospinal responsiveness and promote central fatigue in upper limb muscle. **Journal of Physiology**, v. 15, n. 22, p. 5011-5024, 2014.

SILVA-CAVALCANTE, M. D.; CORREIA-OLIVEIRA, C. R.; SANTOS, R. A.; LOPES-SILVA, J. P.; LIMA, H. M.; BERTUZZI, R.; LIMA-SILVA, A. E. Caffeine increases anaerobic work and restores cycling performance following a protocol designed to lower endogenous carbohydrate availability. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e72025, 2013.

SINCLAIR, C; GEIGER, J. Caffeine use in sports. A pharmacological review. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 40, n. 1, p. 71-79, 2000.

SOMANI, S. M.; GUPTA, P. Caffeine: A new look at an age-old drug. **International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology**, v. 26, n. 11, p. 521-533, 1988.

SOMANI, S. M.; KHANNA, N. N.; BADA, H. S. Caffeine and theophylline: Serum/CSF correlation in premature infants. **Jornal de Pediatria**, v. 96, n. 6, p.1091-1093, 1980.

SOUZA, D. B.; DEL COSO, J.; CASONATTO, J.; POLITO, M. D. Acute effects of caffeine-containing energy drinks on physical performance: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Nutrition,** v. 56, n. 1, p. 13-27, 2017.

STAHLE, L.; ARNER, P.; UNGERSTEDT, U. Drug distribution studies with microdialysis. 111. Extracellular concentrations of caffeine in adipose tissue in man. **Life Sciences**, v. 49, n. 24, p. 1853-1858, 1991.

STIG, L.; GERTJAN, E. The relationship between cadence, pedalling technique and gross efficiency in cycling. **European Journal of Applied Physiology**, v.111, n. 12, p. 28850-2893, 2011.

TANAKA, H.; NAKAZAWA, K.; ARIMA, M.; IWASAKI, S. The pharmacokinetics of caffeine and its dimethylxanthine metabolites in patients with chronic liver disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 205-213, 1989.

TARNOPOLSKY, M. A.; ATKINSON, S. A.; MACDOUGALL, J. D.; DUNCAN, J.; SALE, D. G, SUTTON, J. R. Physiological responses to caffeine during endurance running in habitual caffeine users. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 21, n. 4, p. 418-424, 1989.

TAYLOR, J. L.; AMANN, M.; DUCHATEAU, J.; MEEUSEN, R.; RICE, C. Neural contributions to muscle fatigue: From the brain to the muscle and back again. Med Sci Sports Exerc, v. 48, n. 11, p. 2294-2306, 2016.

TEEKACHUNHATEAN, S.; TOSRI, N.; ROJANASTHIEN, N.; SRICHAIRATANAKOOL, S.; SANGDEE, C. Pharmacokinetics of caffeine following a single administration of coffee enema versus oral coffee consumption in healthy male subjects. **ISRN Pharmacology**, v. 2013, p. 147238, 2013.

TITLOW, L. W.; ISHEE, J. H.; RIGGS, C. E. Failure of caffeine to affect metabolism during 60 min submaximal exercise. **Journal of Sports Sciences**, v. 9, n. 1, p.15-22, 1991.

TSUDA, Y.; MURAKAMI, R.; YAMAGUCHI, M.; SEKI, T. Acute supplementation with an amino acid mixture suppressed the exercise-induced cortisol response in recreationally active healthy volunteers: a randomized, double-blinded, placebo-controlled crossover study. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 39, 2020.

TUCKER, R. The anticipatory regulation of performance: The physiological basis for pacing strategies and the development of a perception based model for exercise performance. **British Journal of Sports Medicine**, v. 43, n. 6, p. 392-400, 2009.

TUCKER, R.; BESTER, A.; LAMBERT, E. V.; NOAKES, T. D.; VAUGHAM, C. L.; ST CLAIR GIBSON, A. Non-random fluctuations in power output during self-paced exercise. **British Journal of Sports Medicine**, v. 40, n.11, p. 912-917, 2006.

TUNNICLIFFE, J. M.; ERDMAN, K. A.; REIMER, R. A.; LUN, V.; SHEARER J. Consumption of dietary caffeine and coffee in physically active populations: physiological interactions. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 33, n. 6, p. 1301-1310, 2008.

UCI. **Union Cycliste Internationale**. Disponível em: https://web.archive.org/web/20120806032756/http://www.uci.ch/Modules/BUILTIN/getObject.asp

?MenuId=MTkzNg&ObjTypeCode=FILE&type=FILE&id=NDk3OTg&LangId=1. Acesso em: 01 dez. 2020.

VAN DER PLAS, A.; POULY, S.; BLANC, N.; HAZIZA, C.; de LA BOURDONNAYE, G.; TITZ, B.; HOENG, J.; IVANOV, N. V.; TARANU, B.; HEREMANS, A. Impact of switching to a heat-not-burn tobacco product on CYP1A2 activity. **Toxicology Reports**, v. 29, n. 7, p. 1480-1486, 2020.

VAN SOEREN, M. H.; GRAHAM, T. E. Effect of caffeine on metabolism, exercise endurance, and catecholamine responses after withdrawal. **Journal of Applied Physiology**, v. 85, n. 4, p. 1493-1501, 1998.

VAN SOEREN, M. H.; SATHASIVAM, P.; SPRIET, L. L., GRAHAM, T. E. Caffeine metabolism and epinephrine responses during exercise in users and nonusers. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 2, p. 805-812, 1993.

VELEY, V. H.; WALLER, A. S. On the comparative toxicity of theobromine and caffeine, as measured by their direct effect upon the contractility of isolated muscle. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 82, n. 559, p. 568-574, 1910.

VON LUBITZ, D. K. J. E.; PAUL, L. A.; JI, X. D.; CARTER, M.; JACOBSON, K. A. Chronic adenosine A1 receptor agonist and antagonist: Effect on receptor density and Nmethyl-D-aspartate-induced seizures in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 253, n. 1-2, p. 95-99, 1994.

WAGNER, P. D. CrossTalk proposal: Diffusion limitation of O_2 from microvessels into muscle does contribute to the limitation of VO2max. **Journal of Physiology**, 1; v. 593, n. (Pt 17), p. 3757-3758, 2015.

WALLET, A. M.; WOODS, A. L.; VERSEY, N.; GARVICAN,-LEWIS, L. A.; WELVAERT, M.; THOMPSON, K. G. Effect of intensified endurance training on pacing and performance in 4000-m cycling time trials. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v.13, n.6, 735-741, 2018.

WAN, J. J.; QIN, Z.; WANG, P. Y.; SUN, Y.; LIU, X. Muscle fatigue: general understanding and treatment. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 49, n. 10, p. e3842017, 2017.

WEISS, B.; LATIES, V. G. Enhancement of human performance by caffeine and the amphetamines. **Pharmacological Reviews**, v. 14, p. 1-36, 1962.

WESTERBLAD, H. Acidosis is not a significant cause of skeletal muscle fatigue. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 48, n. 11, p. 2339-2342, 2016.

WILK, M.; KRZYSZTOFIK, M.; MASZCZYK, A.; CHYCKI, J.; ZAJAC, A. The acute effects of caffeine intake on time under tension and power generated during the bench press movement. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 8, 2019.

WINGFIELD, G.; MARINO, F.; SKEIN, M. The influence of knowledge of performance endpoint on pacing strategies, perception of effort, and neural activity during 30-km cycling time trials. **Physiological Reports**, v. 6, n. 21, p. e13892, 2018.

WOMACK CJ. SAUNDERS MJ. BECHTEL MK. BOLTON DJ. MARTIN M. LUDEN ND. DUNHAM W. HANCOCK M. The influence of a CYP1A2 polymorphism on the ergogenic effects of caffeine. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2012.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY. 2021. **World Anti-Doping Code. World Anti-Doping Agency, Montreal, Quebec**. Disponível em: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list_en.pdf [accessed on 07.02.2021].

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Globalization, food and nutrition transitions**. WHO Commission on social determinants of health Ottawa: WHO, 2007. Disponível em: http://www.who.int/social_determinants/resources/gkn_hawkes.pdf

YANG, A.; PALMER, A. A.; DE WIT, H. Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. **Psychopharmacology**, v. 211, n. 3, p. 245-257, 2010.

ZAIDI, S. I.; JAFRI, A.; MARTIN, R. J.; HAXHIU, M. A. Adenosine A2A receptors are expressed by GABAergic neurons of medulla oblongata in developing rat. **Brain Research**, v. 1071, n. 1, p. 42-53, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Termo de consentimento

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ campus Macaé

Campus UFRJ-Macaé
Universidade Federal do Rio de Janeiro

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Efeito da ingestão crônica e/ou aguda de cafeína na performance no teste contra-relógio em ciclistas

Nome do Voluntário: _____

Prezado participante,

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa "Efeito da ingestão crônica e/ou aguda de cafeína na performance no teste contra-relógio em ciclistas" desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisa e Inovação em Ciências do Esporte (LAPICE/UFRJ-Macaé). O objetivo central do estudo é: Investigar o efeito da ingestão crônica e/ou aguda de cafeína na performance no teste contra-relógio em ciclistas. O convite a sua participação se deve à sua experiência mínima de dois anos na modalidade de ciclismo, frequência de treinamento no mínimo 3 x por semana, não serem usuários de esteróides anabólicos, consumo de quantidades de cafeína ≤300 mg.dia, (aproximadamente 3 xícaras de café instantâneo com cafeína), não possuir gastrite, não ter lesões no tecido ósseo-muscular-articular e não ser hipertenso. Sua participação é voluntária, isto é, ela não é obrigatória e você tem plena autonomia para decidir se quer ou não participar, bem como retirar sua participação a qualquer momento. Você não será penalizado de nenhuma maneira caso decida não consentir sua participação, ou desistir da mesma. Contudo, ela é muito importante para a execução da pesquisa. Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações por você prestadas. Qualquer dado que possa identificá-lo será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa e o material armazenado em local seguro que estará arquivado no laboratório através de códigos no computador, onde só o pesquisador principal terá as informações completas. A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar do pesquisador informações sobre sua participação e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito por meios de contato explicitados neste Termo.

A sua participação consistirá em visitar o laboratório em 4 ocasiões. A primeira visita você passará pela avaliação da sua alimentação, avaliação das medidas do corpo, avaliação cardiorrespiratória máxima e familiarização com o protocolo do teste contra-relógio (teste de desempenho físico na bicicleta). Na avaliação da sua alimentação você responderá 5 questionários até ao final do experimento. Cada questionário levará em torno de 45 minutos a ser respondido e, todos serão aplicados no próprio laboratório. Após a primeira semana você passará por 3 condições experimentais onde envolverá a suplementação crônica de placebo (250 mg de amido) e/ou cafeína (6 mg.kg peso corporal) no período de 4 dias seguidos e a suplementação aguda com cápsulas de placebo (250 mg de amido) e/ou cafeína (6 mg.kg peso corporal) realizada no dia do testes. Nos ensaios experimentais serão coletadas 5 amostras (10ml) sanguíneas para avaliar as concentrações de lactato (marcador de esforço) e cafeína. Você executará os testes de esforço submáximo (20 min.) no cicloergômetro (bicicleta ergométrica) e o teste de performance contra-relógio de 15km. O experimento terá um período total de 3 semanas com intervalos de 2 dias entre as semanas e será realizado no Laboratório de Pesquisa e Inovação em Ciências do Esporte (LAPICE/UFRJ-Macaé).

Durante as avaliações você será submetido a um pequeno desconforto inerente a coleta de amostra sanguínea, que será realizado com material descartável e por profissional (Enfermeiro) experiente habilitado, a fim de minimizar os desconfortos. Apesar de pouco provável, a execução do teste de esforço submáximo e o teste contra-relógio no cicloergômetro em atletas, oferece risco relacionado a tonturas, eventos cardiovasculares e/ou dores musculares tardias. Caso haja qualquer um desses sintomas não serão poupados esforços para minimiza-los, pois durante todo o experimento haverá uma equipe técnica da área de saúde treinada composta por Enfermeiro, Fisioterapeuta, Médico (cardiologista) e Profissionais de Educação Física a postos para prestar os primeiros socorros com os equipamentos específicos no laboratório (desfibrilador, ambu etc...). Caso haja necessidade será prestado ao atleta os primeiros atendimentos por uma equipe treinada em primeiro socorros/remoção e seu transporte será realizado em veículo particular para o Hospital Público de Macaé (HPM) onde receberá todo atendimento. O benefício (direto ou indireto) relacionado com a sua colaboração fornecerá informações específicas na elaboração de um planejamento dietético do nutricionista, especialmente no tocante da suplementação de cafeína para atletas na melhoraria do rendimento esportivo. Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Apesar de todos cuidados tomados, o Sr (a) terá o direito a assistência integral gratuita caso haja algum dano direto/ indireto e imediato/ tardios pelo tempo que for necessário, garantido pelo pesquisador. O Sr (a) terá a garantia de ressarcimento das despesas referente ao transporte e a alimentação. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador (a) (Dra. Beatriz Gonçalves Ribeiro) no endereço Av. Aloísio da Silva Gomes, 50 / Bloco C, salas: 201/202, Granja dos Cavaleiros, Macaé - RJ, CEP: 27930-560, pelo telefone 22 999429827, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFRJ - Macaé, na Rua Aloísio da Silva Gomes no. 50 - Granja dos Cavaleiros, 106 Bloco B (sala da coordenação de pesquisa e extensão) Macaé - CEP: 27930-560 TEL.: (22) 2796-2552 email: cepufrjmacae@gmail.com .

Consentimento Pós–Informação

Impressão do dedo polegar Caso não saiba assinar

Eu,_____
_____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

___/___/___

(Assinatura do voluntário) dia mês ano

(Nome do voluntário – letra de forma)

05/01/2018

Dra. Beatriz Gonçalves Ribeiro
Professora Associada (UFRJ-Macaé)
Pesquisador (a) Responsável
Coordenadora do Laboratório de Pesquisa e Inovação em Ciências do Esporte

(Assinatura da Testemunha, se necessário)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao voluntário indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir por ele.

___/___/___

(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

APÊNDICE 2 - Ordem contrabalançada dos testes com ingestão de cápsulas de placebo e cafeína

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ campus Macaé

Ciclistas	1˚ Ensaio Experimental	2˚ Ensaio Experimental	3˚ Ensaio Experimental	3˚ Ensaio Experimental
1	PP	PC	CC	CP
2	PP	PC	CC	CP
3	PP	PC	CC	CP
4	PP	PC	CC	CP
5	PC	CC	CP	PP
6	PC	CC	CP	PP
7	PC	CC	CP	PP
8	CC	CP	PP	PC
9	CC	CP	PP	PC
10	CC	CP	PP	PC
11	CC	CP	PP	PC
12	CP	PP	PC	CC
13	CP	PP	PC	CC
14	CP	PP	PC	CC

PP Placebo-Placebo; PC Placebo-Cafeína; CC Cafeína-Cafeína; CP Cafeína-Placebo

APÊNDICE 3 - Listagem de alimentos contendo cafeína

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ campus Macaé

Campus UFRJ-Macaé
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Orientações de Consumo para Cafeína

Prezado atleta, você participará da pesquisa "Efeito da ingestão crônica e/ou aguda de cafeína na performance no teste contra-relógio em ciclistas". Desta forma, pedimos que você **NÃO** consuma alimentos, medicamentos ou qualquer outro produto que contenha cafeína em sua formulação. Abaixo, segue a lista de alimentos ou produtos que devem ser retirados da sua alimentação durante a semana.

Café	Chocolate
● Tradicional	● Chocolate ao leite
● Instantâneo	● Chocolate meio amargo
● Descafeinado	● Cacau em pó
● Instantâneo	
● Expresso	
● Capuccino	

Chás	Bebidas prontas
● Verde	● Ice Tea
● Mate	● Matte Leão
● Preto	● Leão Fuse
● Chimarão	● Guaraviton ● Guaravita

Refrigerantes	Bebidas Energéticas
● Coca-Cola (Pepsi)	● Energéticos em geral
● Coca-Cola (Zero Zero,diet,light)	● Red Bull
● Guaraná	● TNT
● Guaraná (Zero,diet,light...)	● Burn
● Mineirinho	● Monster
	● Fusion

Medicamentos	Suplementos
● Para dor em geral	● Suplementos a base de cafeína
● Benoflex	● Termogênicos em geral
● Calmador	● Lipodrol
● Dipirona	● Sineflex

● Dorflex	● Black Burn
● Dorsaldina	● OxyElite
● Engov	● Lipo6
● Flexdor	● LipoDrol
● Flexalgex	● Therma Hard Core Pro
● Fenaflex	
● Mioflex	
● Miorelax	
● Miosan	
● Nasogrip	
● Neosaldina	
● Nogripe	
● Novraflex	
● Paracetamol	
● Relaflex	
● Tylenol	

APÊNDICE 4 - Avaliação dietética: consumo de cafeína

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ campus Macaé

Campus UFRJ-Macaé
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Questionário Original

CAFFEINE CONSUMPTION QUESTIONNAIRE (CCQ)

Please answer the following questions as completely and honestly as you can. This information is STRICTLY CONFIDENTIAL -- do not write your name anywhere on this page. Thank you for your cooperation. (c) 1988 R. Eric Landrum

Please answer the following questions about your caffeine usage. Respond to items that you consume at least once a week.

COFFEE (5 oz. servings/week)	MORNING 6am-12nn	AFTERNOON 12nn-6pm	EVENING 6pm-2am	NIGHT 2am-6am
Regular brewed				
Percolated				
Drip-brewed				
Regular instant				
Decaffeinated				
Brewed				
Instant				
TEA (5 oz. serv/week)				
COCOA (5 oz. serv./week)				
CHOCOLATE (8 oz. serv./week)				
SOFT DRINKS (12 oz. servings/week)	MORNING 6am-12nn	AFTERNOON 12nn-6pm	EVENING 6pm-2am	NIGHT 2am-6am
Coca-Cola				
Dr. Pepper				
Mountain Dew				
Mr. Pibb				
Tab				
Pepsi Cola				
Diet Pepsi				
RC Cola				
Mello Yello				
OVER-THE-COUNTER DRUGS (tablets/week)				
Vivarin				
NoDoz				
Excedrin				
Vanquish				
Anacin				
Dristan				
Dexatrim				

The CCQ as administered to students. To score the questionnaire yielding a milligrams/week measure, use the following caffeine amounts: percolated, 110.0 mg; drip-brewed, 150.0 mg; regular instant, 66.0 mg; decaffeinated-brewed, 4.5 mg; decaffeinated-instant, 2.0 mg; tea, 45.0 mg; cocoa, 13.0 mg; chocolate, 6.0 mg; Coca-Cola, 42.0 mg; Dr. Pepper, 61.0 mg; Mountain Dew, 49.0 mg; Mr. Pibb, 57.0 mg; Tab, 45.0 mg; Pepsi, 35.0 mg; Diet Pepsi, 34.0 mg; RC Cola, 36.0 mg; Mello Yello, 32.0 mg; Vivarin, 200.0 mg; NoDoz, 100.0 mg; Excedrin, 65.0 mg; Vanquish, 33.0 mg; Anacin, 32.0 mg; Dristan, 16.2 mg; Dexatrim, 200.0 mg.

LANDRUM, R. E. College students use of caffeine and its relationship to personality. **College Student Journal**, v. 26, n. 2, p. 151-155, 1992.

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ campus Macaé

Campus UFRJ-Macaé
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Questionário Adaptado

Por favor, preencha o questionário abaixo a respeito de seu uso de cafeína. Liste o número de vezes que você consome as seguintes substâncias durante uma semana (frequência semanal, diária ou mensal).

	MANHA 6-12h	**TARDE 12-18h**	**NOITE 18-2h**	**MADRUGADA 2-6h**
Café • Tradicional • Instantâneo • Descafeinado • Descafeinado instantâneo • Expresso				
Chá				
Cacau				
Chocolate • Chocolate em barra • Achocolado				
Refrigerantes • coca cola • coca cola diet • Pepsi • Pepsi diet • Outros:				
Energéticos • Red bull • Outros:				
Medicação: • Vivarin • Dexatrin • No- Doz • Excedrin • Aspirina • Tylenol • Dristan • Dexatrin • Outros:				
Suplementação				
Consumo total				

APÊNDICE 5- Avaliação antropométrica

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ campus Macaé

Campus UFRJ-Macaé
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Nome: Data:

Variáveis:	Medida 1	Medida 2	Medida 3
Estatura (cm)			
Massa Corporal (Kg)			
IMC ($Kg.m^2$)			

APÊNDICE 6 - Avaliação cardioventilatória máxima

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ campus Macaé

Protocolo:

• Aquecimento:

Tempo de Aquecimento: 5 min.
Intensidade: 68 watts (88 rpm)

• Protocolo no cicloergômetro:

Tempo previsto: 12-15 min
Intensidade inicial: 113 watts (88-90 rpm)
Incremento de carga: 45 watts a cada 2 min.

• Variáveis de Monitoramento:

Tempo de Monitoramento: ciclo de 3 respirações
Variáveis: FC - Frequência Cardíaca, VO_2 - consumo máximo de oxigênio, VCO_2 - produção de gás carbônico, RER - quociente respiratório, PSE - escala de percepção subjetiva de esforço e Wmáx - potência de saída máxima atingida.

• Protocolo de volta à calma:

Tempo: 3 min
Intensidade inicial: 68 watts (88 rpm)

• Critérios para teste válido:

RER: relação de troca respiratória superior a 1.10
Escala Subjetiva de Esforço: realização de exaustão voluntária máxima monitorada pela sensação de esforço máximo (10 na escala de Borg)

• Condições Ambientais:

Temperatura: 21-24°C
Umidade: 41-52%
Pressão Barométrica: 760mm Hg

APENDICE 7 - Escala subjetiva adaptada de Borg-10

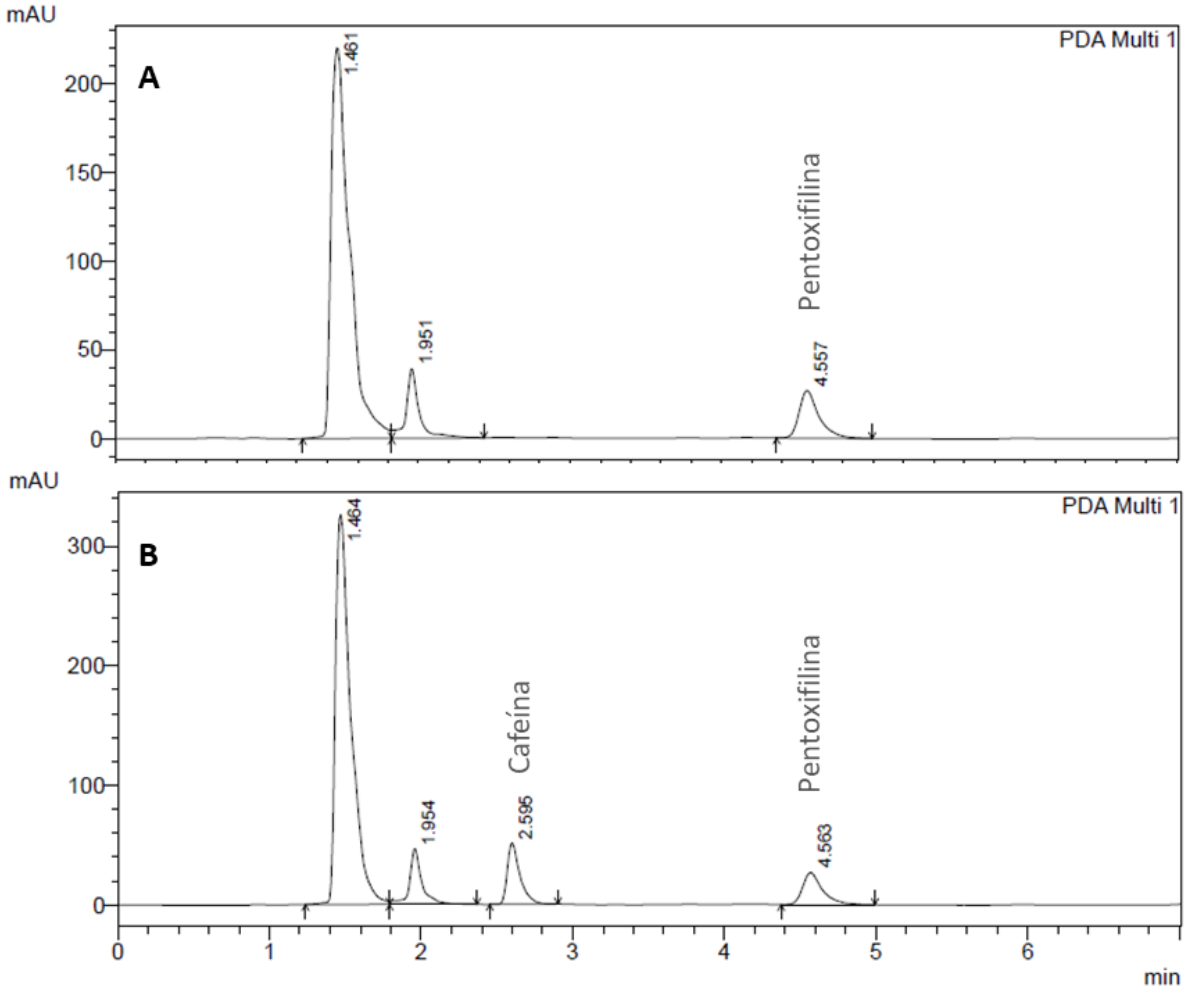
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ campus Macaé

0	**Nenhuma**
0.5	**Muito, Muito Leve**
1	**Muito Leve**
2	**Leve**
3	**Moderada**
4	**Pouco Intensa**
5	**Intensa**
6	
7	**Muito Intensa**
8	**Muito, Muito Intensa**
9	
10	**Máxima**

APÊNDICE 8 - Perfil cromatográfico de um atleta antes (A) e 1 hora após (B) a ingestão da cápsula de cafeína

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ campus Macaé

Campus UFRJ-Macaé
Universidade Federal do Rio de Janeiro



APÊNDICE 9 - Manuscrito publicado 1

RIBEIRO, B.G. *et al*. Acute effects of caffeine intake on athletic performance: A systematic review and meta-analysis. *Revista Chilena de Nutrición*, vol. 44, n. 3, p. 283-291, 2017.

Rev Chil Nutr Vol. 44, Nº 3, 2017
http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182017000300283

ARTÍCULOS ORIGINALES

Acute effects of caffeine intake on athletic performance: A systematic review and meta-analysis

Efectos agudos de la ingesta de cafeína en el rendimiento atlético: Una revisión sistemática y meta-análisis

ABSTRACT

Objective: Our objective was to perform a systematic review and meta-analysis of the research literature assessing the effect of caffeine on athletic performance. Methods: A total of 13 studies published between 2010 and 2015 were included in the meta-analysis of the effects of caffeine on maximum running distance (2 studies), time trial performance (7 studies), and muscle power (4 studies). The effect sizes were calculated as standardized differences in means (std in means). Meta-analysis was completed using a random effects model. Results: Caffeine supplementation did not increase maximum running distance (effect size= 0.37, p= 0.14) and muscle power (effect size= 0.17, p= 0.36). However, improvements were observed in the time trial performance (effect size= -0.40, p< 0.01). Subgroup analyses revealed that the improvement in time trial results may be related to the use of the 6 mg/kg of body weight of caffeine dose (effect size= -0.45, p= 0.01). Conclusion: Our meta-analysis showed that caffeine intake does not improve performance in maximum running distance and muscle power, but it seems to improve time trial performance. The effect of caffeine on time trial performance related to dose.

Key Words: caffeine, running, exercise test, cycling, muscle power.

Beatriz Gonçalves Ribeiro[1,4], Anderson Pontes Morales[1,2,3,4], Felipe Sampaio-Jorge[1,2,3], Felipe de Souza Tinoco[2], Alessandra Alegre de Matos[2,3], Tiago Costa Leite[1].

1. Laboratory of Research and Innovation in Sports Sciences, Federal University of Rio de Janeiro UFRJ, Macaé, Brazil
2. Higher Institutes of Education of CENSA, ISECENSA, Campos dos Goytacazes, Brazil
3. Secretary Municipal of Sport, City, Macaé, Brazil
4. Postgraduate Program in Nutrition, Institute of Nutrition, Federal University of Rio de Janeiro UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author. Beatriz Gonçalves Ribeiro. Laboratory of Research and Innovation in Sports Sciences, Federal University of Rio de Janeiro - Macaé Campus, RJ, Brazil. 159, Alcides da Conceição, Granja dos Cavaleiros, Macaé, Rio de Janeiro, Brazil 27930-560.
Telephone: +5522279333-378.
E-mail: ribeirogoncalvesb@gmail.com

Este trabajo fue recibido el 3 de marzo de 2017
Aceptado con modificaciones: 28 junio de 2017
Aceptado para publicación: 10 julio de 2017

INTRODUCTION

Athletes are always looking for legal ergogenic aids to increase their performance. Ergogenic aids are substances, techniques, or sports equipment that improve sports performance[1]. Among legal nutritional ergogenic resources, we highlight caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), which is one of the most used ergogenic aids by athletes[1-3]. Del Coso et al.[1] evaluated 20,686 urine samples from athletes of different sports (i.e., handball, triathlon, cycling, rowing, athletics (track and fiels), volleyball, soccer, and swimming) between 2004 and 2008. They found that 26.2% of the athletes presented blood caffeine levels below 0.1 μg.ml-1 (limit of detection), 67.3% had below 5 μg.ml-1, and only 0.6% exceeded the threshold of 12 μg.ml-1 (i.e., value considered as doping between 1985 and 2004). Following its 2004 removal from the World Anti-Doping Agency (WADA) Prohibited List, caffeine can be considered safe, effective, and legal when used according to established and practiced protocols.

The prevalence of caffeine intake by athletes before and during competition is high, with the substance obtained from various sources, such as energy drinks, energy gels, and tablets, carbonated sodas, and coffee[2]. In previous studies, caffeine doses commonly range from 3 (low)[4], 6 (moderate)[5], and 10 (high)[26] mg/kg of body weight when

the substance is ingested 30-60 minutes before exercise to allow the caffeine levels in the bloodstream to reach peak values[4,5].

Caffeine may affect performance through both peripheral and central mechanisms. The mechanism for improved endurance, sprint, and power performance has been related to a simple biologic mechanism, such as glycogen sparing, increased intracellular Ca^{++} concentration, or altered excitation–contraction coupling[6-9]. However, a caffeine paradigm for improved athletic performance is a complex, including biologic mechanisms, and cognitive perception[3]. Davis et al.[10] proposed a mechanism by which caffeine delays fatigue through its effects on the central nervous system (CNS). Recently, this mechanism has gained popularity because of previously known effects of caffeine as a CNS stimulant, through its action as an adenosine receptor antagonist, and its analgesic effects on the CNS.

Although the physiological basis of caffeine intake is well described, its clinical effect of improving athletic performance remains controversial. Caffeine intake has been reported to be safe to the cardiovascular system that does not cause changes in heart rate, blood pressure and heart rate variability[11]. However, the results are mixed in the context of "strength"[12] and "resistance" tests[13,14], using different tests to evaluate the strength (i.e., 1-RM test and maximal voluntary contraction - MVC) and endurance (i.e., repetitions until fatigue). This division does not describe the complexity of different tests, and it is difficult to classify tests into only two groups.

A pertinent question is whether the effects of caffeine supplementation are similar in all tests considered "endurance" or "strength" and if these effects could be limited to a subset of these two larger groups. From this perspective, this systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials aims to verify whether acute caffeine supplementation improves athletic performance regardless of whether the tests involve "endurance" or "strength", but considering the same types of tests conducted by performance athletic.

MATERIALS AND METHODS

Systematic Review

A systematic review of the literature was carried out to analyze the acute effects of caffeine intake on athletic performance, which was defined as: 1) the maximum total running distance during the test, 2) the time trial performance in exercise, and 3) the muscle power generated during exercise. The search included articles published between January 2010 and December 2015 and was carried out using the PubMed and Bireme databases. The terms used in the search were "caffeine" or "exercise" or "performance" or "drink" or "capsule." Only studies with humans were included.

Inclusion criteria

The criteria for inclusion in the analysis were: 1) studies with physically active humans (i.e., individuals involved in physical activities of medium slow/medium-intensity physical activities); 2) studies with at least two trials (or separate groups of subjects), in which the subjects consumed caffeine in one trial (or group) and placebo in the other, and 3) studies that showed results in absolute values of the studied variables (i.e., maximum running distance, time trial performance and muscle power).

The exclusion criteria were: 1) use of co-ingested caffeine with other known or potential ergogenic compounds (i.e., creatinine, ginseng, and taurine), used sweetened beverages containing caffeine or no sugar; 2) trials that included women, children, adolescents, and sedentary men; 3) studies that did not have full texts (in such cases, an attempt was made to retrieve the necessary data by e-mailing the author; and 4) duplicity in the two search criteria.

Selection of studies

Two reviewers (BGR and FSJ) separately carried out a full-text analysis of all eligible articles to independently check if all the inclusion and exclusion criteria were in agreement. Any disagreement between reviewers was discussed. If no agreement was reached, a third reviewer (APM) was consulted.

Data collection

Two reviewers (BGR and FSJ) independently extracted data from all eligible studies. Any disagreement was resolved as mentioned above. Continuous outcomes, means, and standard deviations were used. For data analysis, the studies were classified under maximum running distance, time trial performance and muscle power. For meta-analysis, the data were generally extracted using means, standard deviations, and sample sizes (n) for both caffeine and placebo conditions. For both treatments in all studies, the mean differences and 95% confidence intervals (CI) were calculated for comparison of continuous outcomes by using a random effects model.

Assessment of bias risk and study quality

The systematic error of the 13 studies was assessed using the Cochrane risk of bias tool. The following dimensions were considered: random sequence generation, allocation concealment, blinding of participants, blinding of personnel, blinding of outcome, incomplete outcome data, selective outcome reporting, and other sources of bias. The risk judgement was assessed by using prespecified criteria about the adequacy of the study and was expressed as "low risk of bias," "high risk of bias," or "unclear risk of bias"[15].

Meta-analysis

The meta-analysis was completed using the Comprehensive Meta-analysis software (version 2.2; Biostat Inc., Englewood, NJ). The data were extracted and converted into a standard format by calculating the standardized mean difference (SMD), referred to as "effect size" in the Results and Discussion.

RESULTS

DESCRIPTION OF THE INCLUDED STUDIES

Figure 1 illustrates the selection of studies included in the analysis. A total of 13 studies published between 2010 and 2015 were included in the meta-analysis of the effects of caffeine on maximum running distance (n= 2), time trial performance (n= 7) and muscle power (n= 4). The total sample consisted of 174 individuals. The mean age of individuals of the studies varied between 20.8 and 36.2 years. One study, however, did not report the age of the subjects. The dosage of caffeine varied between ~2.5 and 10 mg/kg of body weight; one study used a fixed dosage for the whole sample. In this case, to categorize the amount of caffeine consumed, the quantity of consumed caffeine was divided by the mean body mass of the sample. All articles used caffeine in capsules. General characteristic of the studies included on systematic review and meta-analysis are shown in Table 1.

Analysis of the subgroup of quantitative data (Dosage)

Table 2 illustrates the effect sizes of trials related to dosage (maximum running distance, time trial performance and muscle power). The dosage of 6 mg/kg on the time trial performance was significant with the effect size of -0.45 (-0.81 to -0.08; p= 0.01). No significant results were identified for the effects for <6 mg/kg dosage in the time trial performance (p= 0.18). Comparisons with maximum running distance and muscle power were not possible, since few articles were included for analysis in subgroup.

Assessment of quality and publication bias

Two of the studies assessed had a clear description of the random sequence generation (low risk of bias). Only one study reported allocation concealment (low risk of bias). A complete description of blinding of participants (low risk of bias) was observed in 11 studies, and blinding of personnel (low risk of bias) in 8 studies. One article had complete information on blinding of outcome assessors (low risk of bias); one article had incomplete outcomes (high risk of bias). All 13 evaluated studies reported selective outcomes describing the results and what had been identified (low risk of bias). These 13 studies were insufficient to assess other risks of bias (unclear risk of bias) (Figure 2).

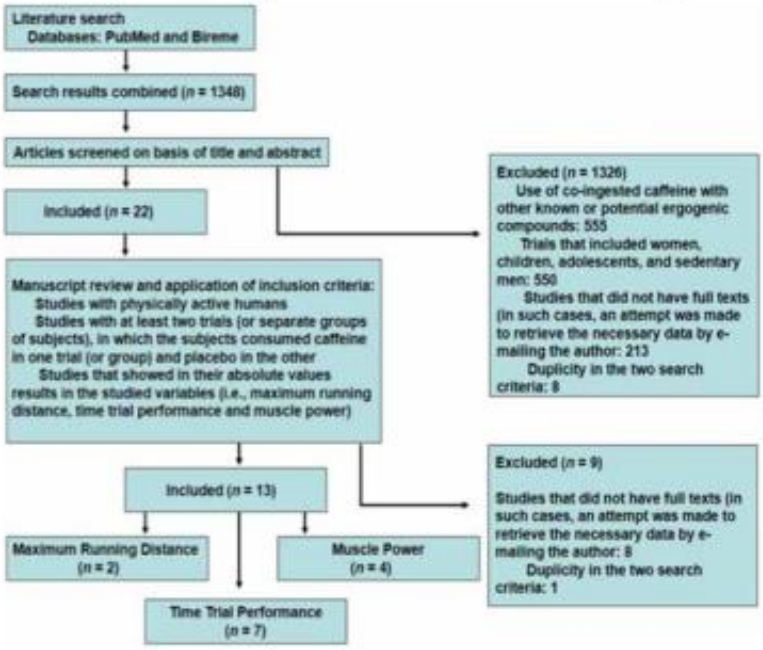


Figure 1. Flow chart of articles reviewed

Table 1
General characteristic of the studies included in the systematic review and meta-analysis.

Reference	Form of ingestion	Subjects info	Caffeine dosage	Time of consumption pre-exercise (min)	Measurement Test	Measurement Unit	Mean ± SD Caffeine	Mean ± SD Placebo
Ackre-hewitt et al. (21)	Capsule	10 male cyclists; 28 ± 9 years; 178 ± 6 cm; 71 ± 6 kg	3 (mg/kg)	60	Time Trial Performance	Seconds	2616 ± 294	2652 ± 270
Bassini et al. (16)	Capsule	19 soccer players	5 (mg/kg)	60	Maximum Running Distance	Meters	1540 ± 330	1449 ± 378
Bortoletti et al. (5)	Capsule	13 male cyclists; 26 ± 10 years; 176 ± 6 cm; 71 ± 9 kg	6 (mg/kg)	60	Time Trial Performance	Seconds	2181±194	2191±158
Deshrow et al. (18)	Capsule	16 male cyclists; 36.2 ± 8.3years; 180.9 ± 5.5 cm; 78.5 ± 6.0 kg	6 (mg/kg)	90	Time Trial Performance	Seconds	3791 ± 281	3902 ± 340
Glaister et al. (26)	Capsule	17 well-trained males; 24 ± 6 years; 182 ± 0.06 cm; 82.2 ± 6.9 kg	10 (mg/kg)	60	Muscle Power	Watts	1141±195	1133 ± 186
Irwin et al. (4)	Capsule	12 male cyclists; 28.3 ± 5.8 years; 183 ± 0.04 cm; 80.2 ± 6.6 kg	3 (mg/kg)	90	Time Trial Performance	Seconds	3443 ± 272	3572 ± 272
Marriott et al. (17)	Capsule	12 male; 20.8 ± 1.4 years; 183 ± 7 cm; 78.9 ± 5.4 kg	6 (mg/kg)	70	Maximum Running Distance	Meters	480 ± 113	413 ± 121
Silva et al. (23)	Capsule	10 male cyclists; 32.5 ± 9.8 years; 177.5 ± 6.09 cm; 78.1±13.9 kg	6 (mg/kg)	60	Muscle Power	Watts	1014 ± 179	983 ± 128
Skinner et al. (20)	Capsule	14 male cyclists; 31 ± 5 year; 75.4 ± 5.7 kg	6 (mg/kg)	60	Time Trial Performance	Seconds	3476 ± 97	3546 ± 123
Souissi et al. (24)	Capsule	12 male judoists; 21.08 ± 1.16 years; 1.76 ± 6.57 cm; 83.75 ± 20.2 kg	5 (mg/kg)	60	Muscle Power	Watts	935 ± 209	855 ± 221
Souissi et al. (25)	Capsule	13 active males; 21.1 ± 1.1 years; 177 ± 0.06 cm; 77.1±7.2 kg	5 (mg/kg)	60	Muscle Power	Watts	871 ± 69	863 ± 77
Spence et al. (22)	Capsule	10 male cyclists; 30 ± 2 years; 79.10 ± 1.65 kg	200 (mg)	60	Time Trial Performance	Seconds	4439 ± 153	4497 ± 153
Womack et al. (19)	Capsule	16 male cyclists; 25.0 ± 7.3 years; 178.2 ± 8.8 cm; 74.3 ± 8.8 kg	6 (mg/kg)	60	Time Trial Performance	Seconds	4344 ± 252	4566 ± 348

Table 2
Subgroup analysis for the effect of caffeine ingestion on maximum running distance, time trial performance and muscle power using a random effect model.

	Maximum Running Distance			Time Trial Performance			Muscle Power	
	n	Effect size (95% CL)	p	n	Effect size (95% CL)	p	n	Effect size (95% CL)	p
Dosage									
6 mg/kg	1	-	-	4	-0.45 (-0.81 to -0.08)	0.01	1	-	-
> 6 mg/kg	-	-	-	-	-	-	1	-	-
< 6 mg/kg	1	-	-	3	-0.32 (-0.80 to 0.15)	0.18	2	0.26 (-0.29 to 0.81)	0.35

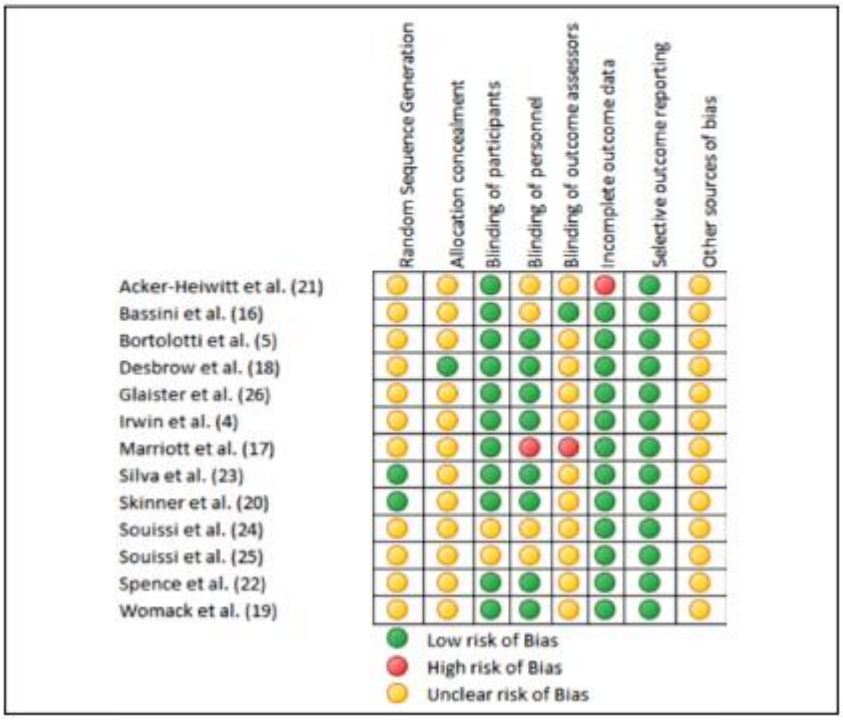


Figure 2. Summary of the quality of the 13 studies.

Effect of caffeine intake on maximum running distance

Two of the studies applied the yo-yo test (i.e., field test designed to estimate the maximum oxygen uptake - VO2max and the maximum running distance by athletes) to assess the maximum running distance of the subjects. The authors used caffeine dosage of 5 mg/kg of body weight[16] and 6 mg/kg of body weight[17] and found no improvement in the maximum running distance of the subjects (effect size = 0.37, p= 0.14, interpretation: small; Figure 3). The I2 statistic showed minimal heterogeneity between the studies (I2= 0.00; p= 0.55).

Effect of caffeine intake on time trial performance

Seven studies were included in the evaluation of time trial performance in cycling. Four of these studies used a caffeine dosage of 6 mg/kg of body weight[5,18-20], two studies used a caffeine dosage of 3 mg/kg of body weight[21,4] and one study used an intake fixed dose of 200 mg of caffeine (~2.5 mg/kg of body weight)[22]. Desbrow et al.[18] and Irwin et al.[4] evaluated the shortest time to reach a target amount of work among cyclists. Bortolotti et al.[5] and Acker-Hewitt et al.[21] applied a distance of 20 km, whereas Spence et al.[22], Skinner et al.[20] and Womack et al.[19] used a distance of 40 km. The studies showed an improvement in time trial performance among the subjects who ingested caffeine (effect size= -0.40, p< 0.01, interpretation: small; Figure 4). The I2 statistic showed minimal heterogeneity between the studies (I2= 0.00; p= 0.87).

Effect of caffeine intake on muscle power

Four studies evaluated muscle power generated in cycling. Three of these studies[23-25] used the Wingate test; the other study[26] used seven sprints for a maximum of 10 seconds. The average dosage of caffeine was 6.5 mg/kg of body weight. The studies did not show an improvement in the muscle power generated by the subjects who ingested caffeine (effect size = 0.17, p= 0.36, interpretation: trivial; Figure 5). The I2 statistic showed minimal heterogeneity between the studies (I2= 0.00; p= 0.94).

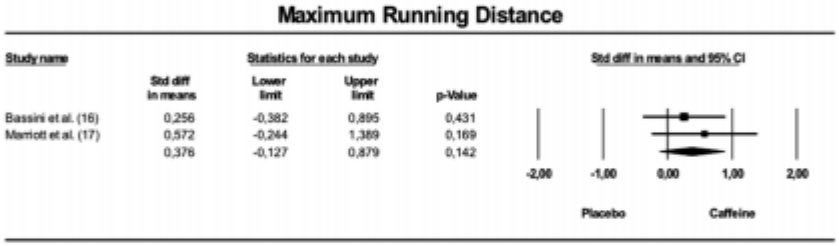


Figure 3. Forest plot of the total effect size from the two studies that assessed the effect of caffeine intake on maximum running distance.

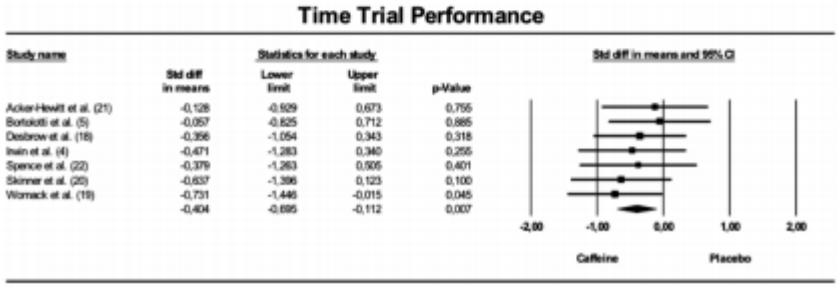


Figure 4. Forest plot of the total effect size from the seven studies that assessed the effect of caffeine intake on time trial performance.

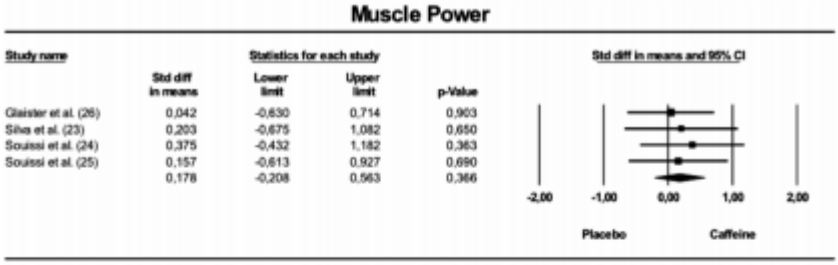


Figure 5. Forest plot of the total effect size from the four studies that assessed the effect of caffeine intake on muscle power in cycling.

DISCUSSION

The aims of this systematic review and meta-analysis were to evaluate the effects of caffeine supplementation on athletic performance. The main finding of this study was that caffeine improves performance on the time trials performance, but not on maximum running distance and muscle power test. In addition, subgroup analysis revealed that the effect of caffeine in the time trials performance test may be related to 6 mg/kg of body weight dosage.

The exact mechanisms by which caffeine exerts ergogenic effects are still under debate, with suggested mechanisms including fatty acid mobilization and oxidation and endogenous glycogen content sparing, attenuating fatigue[27]. The studies included in the evaluation of the maximum running distance did not improved performance with the use of caffeine (p= 0.14). In the individual analysis of the studies there was no response of caffeine. According to the hypothesis of Bassini et al.[16], the hyperammonic state changes the function of the blood-brain barrier and is postulated to cause central fatigue during exercise. However, we observed that the maximum running distance was small to induce hyperammonemia in athletes and consequently it was also small to test the positive ergogenic effect of caffeine. Marriot et al.[17] reported high variation in maximum running distance between assessed subjects, which they attributed to the existence of "high" and "low" responders to caffeine.

Subgroup analyses revealed that the improvement in time trial results may be related to the dose. According to Desbrow et al.[18], the use of high caffeine dosage could increase blood concentration of epinephrine and improve performance during the time trials performance test. Skinner et al.[20] explained that independent of dosage, for the ergogenic benefit of the peripheral action of caffeine to occur, greater availability of muscle is required (i.e., increased concentrations of caffeine at the site of action). Additionally, Irwin et al.[4] showed that acute caffeine supplementation positively affected exercise performance. The positive ergogenic effect of caffeine was found to be related to alteration in the rating of perceived exertion. Desbrow et al.[18] suggested that this mechanism (i.e., the central effects mediated by adenosine receptor antagonism) might explain the ergogenic effect of caffeine on exercise performance by using the time trials performance.

The null findings obtained in the studies of Acker-Hewitt et al.[21] and Bortolotti et al.[5] may relate to the nature of the performance protocol. Bortolotti et al.[5] used closed-loop protocol time trials. This allowed for the development of strategies during the test to finish in the shortest possible time, preventing the athlete from reaching exhaustion. On the other hand, although different doses of caffeine were used, there were similarities in the methodologies applied by Bortolotti et al.[5], Acker-Hewitt et al.[21], and Spence et al.[22]. In these three studies, participants ingested caffeine 60 minutes before the test and were instructed not to ingest any food or drink that might contain caffeine 48 hours before testing.

Regular consumption of caffeine has been associated with an upregulation of the number of adenosine receptors in the vascular and neural tissues of the brain[28,29]. Based on these observations, it could be speculated that habitual and non-habitual caffeine consumers would respond differently to caffeine supplementation during exercise. The minimum period of caffeine fasting in diet that is needed to obtain greater sensitivity to its action is not well established in the literature. Tavares and Sakata[30] indicated that the time required for the beginning of abstinence varies between 12 and 24 hours after cessation of consumption but could range between 48 and 216 hours. In the articles evaluated in the current study, it is possible that the subjects had low sensitivity to caffeine, which would require a longer period of abstinence and/or an increase in the dosage used. In particular, in Spence et al.[22], subjects were consumers of caffeine; thus, the dosage of 2.5 mg/kg of body weight used may be considered low. In fact, Warren et al.[31] indicated in their meta-analysis that the commonly used caffeine dosage was 4-6 mg/kg of body weight.

These results reinforce the notion that responses to caffeine may be triggered by other factors, such as genetics,

rather than habitual caffeine intake per se. According to Womack et al.[19], genetic polymorphisms in genes related to caffeine metabolism (aryl-hydrocarbon receptor [AHR], cytochrome P450 1A1 and 1A2 (CYP1A1-CYP1A2, Prenyl (Decaprenyl) are a potential explanation for the variability in the ergogenic response to caffeine supplementation in trained cyclists. These authors reported a significant main effect of supplementation with 6 mg/kg of body weight of anhydrous caffeine on the performance of cyclists. Given these prior findings, it could be hypothesized that a slower metabolism would be advantageous for maximizing the ergogenic benefit of caffeine. However, the major finding of their study was that caffeine affected the 40-km TT performance of cyclists homozygous for the AA (i.e., caffeine is metabolized at a higher rate) variant to a greater degree compared with cyclists with the C (i.e., caffeine is metabolized at a lower rate) variant. Specifically, caffeine decreased the 40-km TT time by an average of 3.8 minutes in the AA homozygotes compared with 1.3 minutes in the C-allele carriers. The authors speculate that the rapid accumulation of caffeine metabolites may have been responsible for the positive ergogenic effect in AA homozygotes. Paraxanthin and theophylline (metabolites downstream of caffeine metabolism) have higher binding affinities with adenosine receptors than caffeine[12]. Thus, it is possible that a faster caffeine metabolism in AA homozygotes created a faster production of paraxanthine and/or theophylline and thus increases the ergogenic effect.

It has been suggested that caffeine increases strength and muscle power performance through greater motor unit firing rates, increased calcium release from the sarcoplasmic reticulum, and surges in nitric oxide concentrations, working collectively to produce stronger muscle contractions[11]. However, it is possible that slow-twitch fibers are more sensitive to such action than fast-twitch fibers[14,15], which could help to explain the limited ergogenic effect upon maximal strength and muscle power. In their evaluation of the contractile properties of skeletal muscle, Souissi et al.[24], Souissi et al.[25], Silva et al.[23] and Glaister et al.[26] suggest that the positive benefit of caffeine use in cyclists may be more effective in longer time evaluations of muscle power compared to shorter tests. Thus further research is needed to elucidate the ergogenic effects of caffeine during muscle strength exercises.

CONCLUSION

In conclusion, this meta-analysis showed that caffeine intake does not improve performance in maximum running distance and muscle power, but seems to improve time trial performance. The potential effect of caffeine on time trial performance related to caffeine dose. The results of the present study contribute to the knowledge of the ergogenic effects of caffeine in several tests that evaluate athletic performance.

Financial Support This work was supported by Research Support Foundation of Rio de Janeiro FAPERJ – Brazil. Edict Innovations in Sports E-26/190.298. FAPERJ had no role in the design, analysis or writing of this article.

Conflicts of Interest The authors declare that there are no conflicts of interest in the present study.

The authors' contributions are as follows:

B.G.R and A.A.M (Nutritionist) designed the database, carried out the majority of the meta-analysis and contributed to the writing and the critical review of the manuscript;

F.S.J (Physiotherapist) helped to design the literature search and database storage and helped to design and provided guidance for the meta-analyses used;

F.T (Physical Education Teacher?) carried out a major part of the literature search, and extraction and contributed to the writing of the manuscript;

A.P.M (Physical Education Teacher?) contributed to the literature review and the discussion of manuscript;

T.C.L (Nutritionist) helped with the literature review and provided a critical revision of the manuscript, especially the discussion of results.

RESUMEN

Objetivo: Realizar una revisión sistemática y meta-análisis de la literatura de investigación que evalúa el efecto de la cafeína en el rendimiento atlético. Método: Un total de 13 estudios publicados entre 2010 y 2015 fueron incluidos en el meta-análisis de los efectos de la cafeína sobre la distancia máxima de carrera (2 estudios), el tiempo de prueba (7 estudios) y la potencia muscular (4 estudios). Los tamaños del efecto se calcularon como diferencias estandarizadas en las medias (std en los medias), y el meta-análisis se completó utilizando un modelo de efectos aleatorios. Resultados: La suplementación con cafeína no aumentó la distancia máxima de funcionamiento (tamaño del efecto= 0.37, p= 0.14) ni la potencia muscular (tamaño del efecto= 0.17, p= 0.36). Sin embargo, se observaron mejoras en el rendimiento del ensayo con tiempo (tamaño del efecto= -0.40, p< 0,01). Los análisis de subgrupos revelaron que la mejora en los resultados de los ensayos a tiempo podía estar relacionada con el uso de la dosis de 6 mg/kg de peso corporal de cafeína (tamaño del efecto= -0.45, p = 0.01). Conclusiones: El meta-análisis demostró que la ingesta de cafeína no mejora el rendimiento en la distancia máxima de carrera ni la potencia muscular, pero parece mejorar el rendimiento de la prueba de tiempo. Este efecto potencial de la cafeína en el rendimiento de la prueba de tiempo estuvo relacionado con la dosis.

Palabras clave: cafeína, funcionamiento, prueba de ejercicio, ciclo, energía del músculo.

REFERENCES

1. *Del Coso J, Muñoz G, Muñoz-Guerra J. Prevalence of caffeine use in elite athletes following its removal from the World Anti-Doping Agency list of banned substances. Appl Physiol Nutr Metab 2011; 36: 555-561.*
2. *Desbrow B, Leveritt M. Awareness and use of caffeine by*

athletes competing at the 2005 Ironman Triathlon World Championships, Int J Sport Nutr Exerc Metab 2006; 16: 545-558.
3. Desbrow B, Leveritt M. Well-trained endurance athletes' knowledge, insight, and experience of caffeine use, Int J Sports Nutr Exerc Metab 2007; 17: 328-339.
4. Irwin C, Desbrow B, Ellis A, Rant BO, Leveritt M. Caffeine withdrawal and high-intensity endurance cycling performance, J Sports Sci 2011; 29: 509-515.
5. Bortolotti H, Altimari LR, Vitor-Costa M, Cyrino ES. Performance during a 20-km cycling time-trial after caffeine ingestion, J Int Soc Sports Nutr 2014; 11: 1-7.
6. Clausen T. Na+-K+ pump regulation and skeletal muscle contractility, Physiol Rev 2003; 83: 1269-1324.
7. Doherty M, Smith P, Hughes M, Davison R. Caffeine lowers perceptual response and increases power output during high intensity cycling, J Sports Sci 2004; 22: 637-643.
8. Roy BD, Bosman MJ, Tarnopolsky MA. An acute oral dose of caffeine does not alter glucose kinetics during prolonged dynamic exercise in trained endurance athletes, Eur J Appl Physiol 2001; 85: 280- 286.
9. Van Soeren MH, Sathasivam P, Spriet LL, Graham TE. Caffeine metabolism and epinephrine responses during exercise in users and nonusers, J Appl Physiol 1993; 75: 805-812.
10. Davis JM, Zhao Z, Stock HS, Mehl KA, Buggy J, Hand GA. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 284: 399-404.
11. An SM, Park JS, Kim SH. Effect of energy drink dose on exercise capacity, heart rate recovery and heart rate variability after high-intensity exercise, J Exerc Nutrition Biochem 2014; 18: 31-39.
12. Goldstein E, Jacobs PL, Whitehurst M, Penhollow T, Antonio J. Caffeine enhances upper body strength in resistance-trained women, J Int Soc Sports Nutr 2010; 14: 7-18.
13. Jacobs I, Pasternak H, Bell DG. Effects of ephedrine, caffeine, and their combination on muscular endurance, Med Sci Sports Exerc 2003; 35: 987-994.
14. Williams AD, Cribb PJ, Cooke MB, Hayes A. The effect of ephedra and caffeine on maximal strength and power in resistance trained athletes, J Strength Cond Res 2008; 22: 464-470.
15. Higgins JP, Altman DG, Gøtzsche PC, Jüni P, Moher D, Oxman AD, Savovic J, Schulz KF, Weeks L, Sterne JA, Cochrane Bias Methods Group, Cochrane Statistical Methods Group. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials, BMJ 2011; 343: d5928.
16. Bassini A, Magalhães-neto AM, Sweet E, Bottino A, Veiga C, Marta B, Trazzi MB, Pickard MB, Cameron L. Caffeine decreases systemic urea in elite soccer players during intermittent exercise, Med Sci Sports Exerc 2013; 45: 683-690.
17. Marriott M, Krustrup P, Mohr M. Ergogenic effects of caffeine and sodium bicarbonate supplementation on intermittent exercise performance preceded by intense arm cranking exercise, J Int Soc Sports Nutr 2015; 12: 1-8.
18. Desbrow B, Biddulph C, Devlin B, Grant GD, Anoopkumar-Dukie S, Leveritt MD. The effects of different doses of caffeine on endurance cycling time trial Performance, J Sports Sci 2011; 30: 115-120.
19. Womack CJ, Saunders MJ, Bechtel MK, Bolton DJ, Martin M, Ludwo ND, Dunham W, Hancock M. The influence of a CYP1A2 polymorphism on the ergogenic effects of caffeine, J Int Soc Sports Nutr 2012; 9: 1-7.
20. Skinner TL, Jenkins DG, Taaffe DR, Leveritt MD, Coombes JS. Coinciding exercise with peak serum caffeine does not improve cycling performance, J Sci Med Sport 2013; 16: 54-59.
21. Acker-Hewitt TL, Shafer BM, Saunders MJ, Goh Q, Luden ND. Independent and combined effects of carbohydrate and caffeine ingestion on aerobic cycling performance in the fed state, Appl Physiol Nutr Metab 2012; 37: 276-283.
22. Spence AL, Sim M, Landers G, Peeling P. A comparison of caffeine versus pseudoephedrine on cycling Time-Trial performance, Int J Sports Nutr Exerc Metab 2013; 23: 507-512.
23. Silva CG, Cavazzotto TG, Queiroga MR. Supplementation of caffeine and anaerobic power indicators, Rev Educ Fis 2014; 25: 109-116.
24. Souissi M, Abedelmalek S, Chtourou H, Atheymen R, Hakim A, Sahnoun Z. Effects of morning caffeine ingestion on mood states, simple reaction time, and short-term maximal performance on elite judoists, Asian J Sports Med 2012; 3: 161-168.
25. Souissi M, Chtourou H, Abedelmalek S, Chaouane IB, Sahnoun Z. The effects of caffeine ingestion on the reaction time and short-term maximal performance after 36 h of sleep deprivation, Physiol Behav 2014; 131: 1-6.
26. Glaister M, Patterson SD, Foley P, Pedlar CR, Pattison JR, Mclones G. Caffeine and sprinting performance: dose responses and efficacy, J Strength Cond Res 2012; 26: 1001-1005.
27. Magkos F, Kavouras SA. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action, Crit Rev Food Sci Nutr 2005; 45: 535-562.
28. Fredholm BB. Adenosine actions and adenosine receptors after 1 week treatment with caffeine, Acta Physiol Scand 1982; 115: 283-286.
29. Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use, Pharmacological reviews 1999; 51: 83-133.
30. Tavares C, Sakata RK. Caffeine in the treatment of pain, Rev Bras Anestesiol 2012; 62: 387-401.
31. Warren GL, Park ND, Maresca RD, McKibans KI, Millard-Stafford ML. Effect of caffeine ingestion on muscular strength and endurance: a meta-analysis, Med Sci Sports Exerc 2010; 42: 1375-1387.
32. Daly JW, Butts-Lamb P, Padgett W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines, Cell Mol Neurobiol 1983; 3: 69-80.
33. Kalmar JM. The influence of caffeine on voluntary muscle activation, Med Sci Sports Exerc 2005; 37: 2113-2119.
34. Mitsumoto H, DeBoer GE, Bunge G, Andrish JT, Tetzlaff JE, Cruse RP. Fiber-type specific caffeine sensitivities in normal human skinned muscle fibers, Anesthesiol 1990; 72: 50-54.
35. Pagala MK, Taylor SR. Imaging caffeine-induced Ca2+ transients in individual fast-twitch and slow-twitch rat skeletal muscle fibers, Am J Physiol 1998; 274: C623-632.

APÊNDICE 10 - Manuscrito publicado 2

MORALES, A.P. et al. Caffeine supplementation for 4-day, followed by acute ingestion, did not impact triathlete output power after submaximal intensity exercise. *Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício*, v. 18, n. 3, 2019.

Rev Bras Fisiol Exerc 2019;18(3):118-28
https://doi.org/10.33233/rbfe.v18i3.3230

ORIGINAL ARTICLE

Caffeine supplementation for 4-day, followed by acute ingestion, did not impact triathlete output power after submaximal intensity exercise

A suplementação de cafeína por 4 dias, seguida de ingestão aguda, não impactou na potência de triatletas após realizarem exercício de intensidade submáxima

Anderson Pontes Morales*, Felipe Sampaio-Jorge**, Thiago Barth, D.Sc.***, Alessandra Alegre de Matos****, Luiz Felipe da Cruz Rangel, M.Sc.*****, Beatriz Gonçalves Ribeiro, D.Sc.******

**Doutorando em Ciências Nutricionais pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Docente dos Institutos Superiores de Ensino do CENSA (ISECENSA), Laboratório de Pesquisa e Inovação em Ciências do Esporte (LAPICE-UFRJ Macaé/SEMEL), **Doutorando em Biociências e Produtos Bioativos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Docente dos Institutos Superiores de Ensino do CENSA (ISECENSA), Laboratório de Pesquisa e Inovação em Ciências do Esporte (LAPICE-UFRJ Macaé/SEMEL), ***Docente da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ Macaé), Laboratório de Produtos Naturais (UFRJ Macaé), ****Especialista em Nutrição Clínica Estética pelo Instituto de Pesquisa Ensino Gestão e Saúde (IPGS), Laboratório de Pesquisa e Inovação em Ciências do Esporte (LAPICE-UFRJ Macaé/SEMEL), *****Docente da Universidade Estácio de Sá, Laboratório de Pesquisa e Inovação em Ciências do Esporte (LAPICE-UFRJ Macaé/SEMEL), ******Docente da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ-Macaé), Laboratório de Pesquisa e Inovação em Ciências do Esporte (LAPICE-UFRJ Macaé/SEMEL)*

Received: September 10, 2019; accepted: September 30; 2019.

Corresponding author: Anderson Pontes Morales, Laboratório de Pesquisa e Inovação em Ciências do Esporte (LAPICE/SEMEL), Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé Campus, RJ, Av. Aluízio da Silva Gomes, Granja dos Cavaleiros, n. 50, 27930-560 Macaé RJ

Anderson Pontes Morales: andersonmrl@hotmail.com
Felipe Sampaio-Jorge: felipesjorge@gmail.com
Thiago Barth: barththiago@yahoo.com.br
Alessandra Alegre de Matos: lebuzios@hotmail.com
Luiz Felipe da Cruz Rangel: luizfeliperangelfn@gmail.com
Beatriz Gonçalves Ribeiro: ribeirogoncalvesb@gmail.com

Abstract

Introduction: The aim of this study was to test the hypothesis that caffeine supplementation (6 mg·kg^{-1} body mass) for 4-days, followed by acute intake, would impact five male triathletes output power after performed submaximal intensity exercise. *Methods*: This was a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study, placebo (4-days) - placebo (acute) PP, placebo (4-day) -caffeine (acute) PC, and caffeine (4-day) - caffeine (acute) CC. Participants abstained from dietary caffeine sources for 4 days and ingested capsules containing either placebo or caffeine (6 mg.kg^{-1} body mass day in one absorption). The acute trials the capsules containing placebo or caffeine (6 mg·kg^{-1} body mass day in one absorption) were ingested 60min before completing exercise in a treadmill for 40min (80% VO_2max) and to perform the Wingate test. *Results*: Blood lactate was determined before, 60min after ingestion, and immediately after the exercise on the treadmill, the Wingate test, and after the recovery (10-min). CC and PC trials did not change the cardiopulmonary variables (P>0.05) and the anaerobic power variables (peak/mean power output and fatigue index) (P>0.05). The PC trial compared with PP promoted improvements in the curve power output in 2 sec by 31.19% (large effect-size d = 1.08; P<0.05) and 3 sec by 20% (large effect-size d = 1.19; P<0.05). A 10min recovery was not sufficient to reduce blood lactate concentration in the PC trial compared with PP (PC, 13.73±2.66 vs. PP, 10.26±1.60 mmol.L^{-1}; P<0.05, respectively) (P<0.05). *Conclusion*: In conclusion, these results indicate that caffeine supplementation (6 mg·kg^{-1} body mass) for 4 days, followed by acute ingestion, did not impact the triathletes output power after performed submaximal intensity exercise. Nutritional interventions may help researchers and athletes to adapt strategies for manipulating caffeine use.

Key-words: caffeine metabolism, Wingate test, blood lactate, performance.

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que a suplementação de cafeína (6 mg · kg^{-1} de massa corporal) por 4 dias, seguida de ingestão aguda, afetaria a potência de cinco triatletas masculinos após realizarem o exercício de intensidade submáxima. *Métodos*: Foi realizado um estudo cruzado, randomizado, duplo-cego, placebo-controlado, placebo (4-dias) - placebo (agudo) PP, placebo (4-dias) - cafeína (agudo) PC, cafeína (4-dias) - cafeína (agudo) CC. Os participantes se abstiveram de fontes alimentares de cafeína por 4 dias e ingeriram cápsulas contendo placebo ou cafeína (6 mg.kg^{-1} de massa corporal por dia). Os participantes nos ensaios agudos ingeriram cápsulas contendo placebo ou cafeína (6 mg.kg^{-1}de massa corporal) 60 minutos antes de realizar o exercício na esteira por 40 minutos (80% VO2máx) e em seguida realizaram o teste de Wingate. O lactato sanguíneo foi determinado antes, 60 minutos após a ingestão, imediatamente após o exercício na esteira e no teste de Wingate e, após 10 min. de recuperação. *Resultados*: Nos ensaios CC e PC não foram observadas alterações nas variáveis cardiopulmonares (P>0,05) e nas variáveis de potência anaeróbica (potência de pico, potência média e índice de fadiga) (P>0,05). No ensaio PC comparado ao PP promoveu melhorias na curva de potência no tempo de 2 segundos (31,19% - *large effect-size* d = 1,08; P<0,05) e no tempo de 3 segundos (20% - large effect-sized = 1,19; P<0,05). A recuperação de 10 minutos não foi suficiente para reduzir a concentração de lactato sanguíneo no ensaio PC em comparação ao PP (PC, 13,73 ± 2,66 vs. PP, 10,26 ± 1,60 mmol.L^{-1}; P<0,05, respectivamente) (P<0,05). *Conclusão*: Em conclusão, esses resultados indicam que a suplementação de cafeína (6 mg·kg-1 de massa corporal) por 4 dias, seguida de ingestão aguda não impactou na potência de saída de triatletas após realizarem o exercício de intensidade submáxima. Intervenções nutricionais podem auxiliar pesquisadores e atletas a adaptarem estratégias na manipulação do uso de cafeína.

Palavras-chave: metabolismo de cafeína, teste de Wingate, lactato sanguíneo, performance.

Introduction

Several physiological attributes contribute to the success of endurance exercises [1], including the interaction between the realization of submaximal (i.e., ≤ 99% of VO_2max) and maximal exercises [2]. To date, a wide range of acute and chronic interventions have been investigated regarding performance improvement in endurance exercises [3,4]. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) has been described as an effective ergogenic aid for enhancing performance in various sports [5-10]. Many researchers [11,12] have argued that the primary focus behind the ventilatory effect (i.e., increased alveolar ventilation) of caffeine is the central stimulation of the respiratory medullary complex. The explanations proposed by Chapman and Stager [12] are that the acute use of caffeine significant increase in minute ventilation (VE) during submaximal exercise, and this result in a rise in improving arterial oxyhemoglobin saturation (SaO2) and oxygen delivery to the working musculature. Furthermore, the acute use of caffeine may improve the coupling excitation/contraction by facilitating Ca+ exchange of the sarcoplasmic reticulum and/or by increasing the myofibrillar sensitivity for this ion [9]. This would result in positive changes in the power parameters of athletes [9,10].

To determine the ideal conditions for maximizing the physiological effects of caffeine, source [13], the timing of intake [14] and habituation [15] have been investigated. Chronic habituation to caffeine impacts the concentration of A1 and A2A receptors in various brain regions [16,17] and expression of A2A/A2B receptors distributed in the sarcolemma of skeletal muscle [18].

This includes A2A expression in the striatum, a subcortical region essential for coordinating motor activity [19], and oxygen consumption [4]. Moreover, the expression of A2A/A2B receptors of skeletal muscle is involved in the regulation of contractility of type I and type II fibers [18]. On this premise, it has been speculated whether caffeine intake exceeding usual consumption for a shorter period (i.e., four days) could lead to tolerance to the ergogenic effects of caffeine already demonstrated for long periods (≥ 20 days) [4,17].

The aim of this study was to test the hypothesis that caffeine supplementation (6 mg·kg-1 body mass) for 4-days, followed by acute intake would impact output power triathletes after performed submaximal intensity exercise.

Methods

Subjects

Five male triathletes federated from the state of Rio de Janeiro, all participants in national competitions in Brazil. The athletes presented (mean ± SD) were aged 33.0 ± 7.4 years, had a body mass of 75.79 ± 8.3 kg, and height of 179.4 ± 4.3 cm. All of them had at least 3.8 ± 1.2 years of experience in the sport. No athlete had a medical history of the cardiopulmonary disease or used any medication during the study. Habitual caffeine consumption was assessed using an adapted version of the Landrum, Meliska and Loke [20] caffeine consumption questionnaire. The athletes were regular consumers of caffeine (242 ± 39 mg.day^{-1}) with <300 mg.day^{-1} defined as low habitual caffeine consumption and >300 mg.day^{-1} as high habitual caffeine consumption [21]. In addition, a 24-hour dietary record was completed by each athlete before the first trial, it was then photocopied and handed back to the athletes so that the same diet could be repeated for subsequent trials (daily energy, 4016 ± 1119 kcal; carbohydrate, 52.39 ± 17.26%; protein, 16.51 ± 6.68%; fat, 31.08 ± 10.96%). Energy and macronutrient intake were analyzed by the software Dietpro® 5i (Dietpro, Minas Gerais, Brazil). All participants were notified of the investigation procedures, requirements, benefits, and risks before providing written consent. The protocol (2.540.958/2018) was approved by the Scientific and Ethics Committee of the Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Study design

This is a randomized, placebo-controlled, double-blind crossover study: placebo (supplementation for 4 days) - placebo (acute supplementation) (PP; n = 5); placebo (supplementation for 4 days) - caffeine (acute supplementation) (PC; n = 5); and caffeine (supplementation for 4 days) - caffeine (acute supplementation) (CC; n = 5). Each athlete visited the laboratory on four occasions. The first visit involved a preliminary confirmation of the maximum exercise capacity on the treadmill (i.e., cardiopulmonary exercise testing) to determine maximal oxygen uptake (VO2max) (Table I), assessment of daily caffeine consumption, familiarization with the protocol in the submaximal exercise at steady-state treadmill, and familiarization with the test in the cycle ergometer (Wingate test). From the first to the fourth day, the athletes were instructed to withdraw all their caffeine consumption (i.e., food sources of caffeine). The athletes were also instructed to continue the routine per week training (Table II). Experimental trials involved supplementation for four days (athletes were instructed to ingest single daily dose at a similar time: 8:00 a.m.) of placebo (250 mg magnesium silicate) or caffeine (6 mg.kg^{-1} body mass) capsules (first, second, third and fourth days). Acute supplementation consisted of ingestion of the capsules of placebo (250 mg magnesium silicate) or caffeine (6 mg.kg^{-1} body mass; the capsules were ingested with 250 ml of water) on the day of the experimental trials in the laboratory (fifth day). During supplementation for four days, the athletes were monitored by telephone contact, e-mail, and in-person [17]. On the second, third, and fourth visits (fifth day, acute supplementation), the athletes arrived at the laboratory (without performing any physical activity 24 h before) fasting (8 h) and subsequently an intravenous cannula (20G Jelco, B. Braun Medical Inc., USA) was then inserted into a forearm, and then a blood sample (10 ml) was obtained before capsule ingestion (Rest). The amount of time to collect each sample was ~ 150 seconds. After ingestion of the capsules, athletes remained in the tests area for 60 min without performing any physical activity, and immediately after the second blood sample was collected (AC). The athletes then underwent a 5-min warm-up on an exercise treadmill (50% VO_2max), and after performing the submaximal exercise in the treadmill for 40 min (80% VO_2max), a blood sample was collected (SE). Then the athletes performed the test on the cycle ergometer, and two blood samples were collected immediately after (WT) and 10 min after (R). During the 10-min recovery, the athletes were lying on a stretcher and did not make any physical effort. Two days of intervals (i.e., washout) between experimental trials were established. The experimental trials were performed at the same time of day (7:00 a.m.). During the experimental trials (fifth day, acute supplementation), the temperature of the laboratory was regulated between 20°C and 22°C (Figure 1).

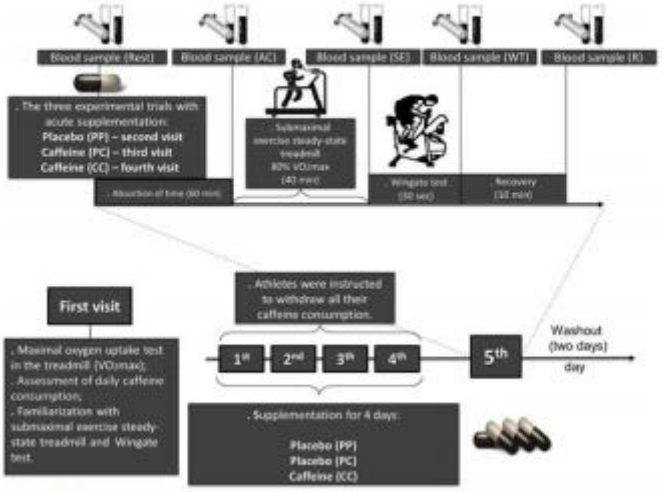


Figure 1 - *Experimental design.*

Maximal oxygen uptake incremental test in the treadmill

All triathletes were assessed using the same ramp protocol on a treadmill (ATL/Inbramed, Porto Alegre, Brazil) programmed to achieve the maximum duration of 8 to 14 min. After a 1-min walk at 5.5 km/h, the velocity was rapidly increased to 6 km/h and then increased by 0.14 km/h every 7.5 s (1.12 km/h every minute), maintaining treadmill inclination of 1% [22]. The heart rate was measured every 3 breaths (breath by breath) from a continuous recording on third derivations (using MC5, V2, and AVF) measured by a digital electrocardiograph ErgoMet (HeartWare, Belo Horizonte, Brazil) with the ErgoMet software version 1.0.3.2 (HeartWare). Ventilatory expired gas was collected with a preVent® pneumotachograph (MedGraphics, St. Paul, MN) with the aid of a neoprene mask and was analyzed by VO2000 (MedGraphics), which was calibrated. The adapted criteria to ensure a maximal exercise test were (a) achievement of maximum voluntary exhaustion, despite verbal encouragement, accompanied by a rate of perceived exertion (adapted Borg scale, 0-10 points) and (b) a respiratory exchange ratio greater than 1.10 [22].

Submaximal exercise steady-state treadmill

After the 5-min warm-up on the treadmill (50% VO_2max), the athletes performed the exercise on a steady-state treadmill with a submaximal protocol of 40 min (80% VO_2max). Athletes were monitored every 5min with the following cardiopulmonary variables: heart rate (HR), maximal oxygen uptake (VO_2), carbon dioxide production (VCO_2), minute volume (VE), O_2 expiration fraction (FeO_2), and rate of perceived exertion (RPE) (adapted Borg scale, 0-10 points).

Inertial Wingate test

After performing the submaximal exercise steady-state treadmill, the triathletes performed the Wingate test. Before the test, the following instructions were given by the investigators: (i) in the first seconds of the test, they should pedal from 0 rpm to the greatest pedaling velocity possible (rpm) for 30 sec; and (ii) maintain this high-power level during the longest possible time until the test end [23]. Two of the authors motivated the subjects during the test duration. The Wingate test was performed in a cycle ergometer of mechanical resistance

(Biotec 2100, Cefise®, São Paulo, Brazil) with double sensors and weights of basket. The resistance was established with each athlete's body mass (0.075 kg·kg^{-1}). The cycle ergometer was connected to a laptop using "Ergometric" software (version 7.0, Cefise®) for the collection and storage of data, such as peak power output (Watts), mean power output (Watts), fatigue index (peak power output - minimum power output) / peak power output × 100) (%) and curve power output (Watts).

Blood caffeine and lactate analysis

The measurement of blood levels of caffeine and lactate was performed in Rest, AC, SE, WT, and R. Liquid chromatography was adapted from Ribeiro *et al.* [5]. The liquid chromatographic analyses were carried out using a Shimadzu chromatograph (Shimadzu® Corp., Kyoto, Japan), equipped with an LC-20AT quaternary solvent pump unit, an SPD-M20A diode array detector operating at 274 nm. The caffeine analyses were performed at 35°C using a column oven model CTO-20A, and solvent degassing was performed by a DGU-20A5 degasser. An LCsolution™ software, version 1.25 SP1, was used for system control and data acquisition. The caffeine was extracted from human serum by a protein precipitation procedure. Aliquots of 200 µL of drug-free human serum were spiked with 25 µL of caffeine working solutions or samples obtained from the athletes and were transferred to 10-mL conical glass tubes. Then, 25 µL of pentoxifylline solution (60 µg/mL) was used as internal standard and 300 µL of methanol was added. This mixture was vortex agitated for 1 min and then centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Finally, 250 µL of the supernatant was collected, and 50 µL was analyzed by HPLC. The quantification of caffeine in serum was carried out using a calibration curve obtained by spiking aliquots of drug-free serum with working solutions of caffeine at concentrations of 1.2, 3.6, 8, 40, 120, and 240 µg/mL resulting in concentrations of 0.15, 0.45, 1.0, 5, 15, and 30 µg/mL in a drug-free serum. Plotting was performed by the ratio of caffeine and internal standard peak areas (y) versus theoretical caffeine concentrations (x). Measurement of blood levels of lactate was performed to evaluate possible changes induced by the interventions. After collection, the blood samples were deposited in tubes with the presence of sodium fluoride. Plasma was obtained by centrifugation at 2.500 rpm at 4°C for 20 min. The resultant plasma was stored at -20°C until the analyses could be performed. We used commercial kits (Labtest, Brazil) and the BIO200 analyzer (Bioplus®, São Paulo, Brazil) [4]. All analyses were made in triplicate.

Statistical analysis

All values are expressed as mean ± SD and coefficient of variation (CV). The Shapiro-Wilk test was used to verify the normality of the data. Two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey post hoc test was used to compare the differences between the PP, PC, and CC in routine per week training, in blood measurements (caffeine and lactate), in cardiopulmonary variables (HR, VO_2, VCO_2, VE, FeO_2 and RPE), and in anaerobic power (peak power output, mean power output, fatigue index and curve power output). A Cohen's d effect size was calculated to quantify the differences between the PP, PC, and CC trials anaerobic power (peak power output, mean power output, fatigue index and curve power output) and concentration lactate. A P value of <0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using SPSS 16.0 software for statistical analyses (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Ethical approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Results

The values obtained in the maximum incremental test are shown in Table I.

Table I - *Values obtained in the maximum incremental test. Mean a SD and coefficient of variation CV (n = 5).*

Variables	Mean ± SD	CV (%)
$HR_{max}(bpm^{-1})$	181 ± 8.86	4.90
$VO_{2max}(ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1})$	55.12 ± 2.90	5.27
$VCO_{2max}(ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1})$	67.43 ± 2.85	4.23
$VE_{max}(1 \cdot min^{-1})$	110.73 ± 6.94	6.27
RER_{max}	1.36 ± 0.05	4.34
Borg	10 ± 0.00	0.00
Maximum speed on treadmill (Km/h_{max})	19.64 ± 0.53	4.27

HRmax = maximum heart rate; VO_2max = maximum oxygen uptake; VCO_2max = maximum output of carbon dioxide; VEmax = maximum minute ventilation; RERmax = respiratory exchange ratio; Km/hmax = maximum speed reached. Adapted Borg rate of perceived exertion RPE (0-10 points).

In Table II, values obtained in routine per week training prior to acute experimental trials. There were no significant differences found (P>0.05).

Table II - *Training routine per week (hours). Mean ± SD (n = 5).*

	n = 5	n = 5	n = 5	
Sports Modality	PP	PC	CC	*P*
Swimming	2.2 ± 0.83	1.8 ± 0.83	1.8 ± 0.83	0.69
Cycling	4.1 ± 1.34	3.2 ± 1.64	3.4 ± 2.30	0.72
Running	3.0 ± 1.00	2.2 ± 1.30	2.8 ± 1.64	0.63

Figures 2 A, B, C, D, E and F show that between both experimental conditions (PP, PC, and CC), there were no significant differences in cardiopulmonary responses (group x time interaction: HRP=0.33; VO_2P=0.07; VCO_2P=0.08; VE P=0.08; FeO_2P=0.17) and the rate of perceived exertion (RPE P=0.51) over time for 40 min.

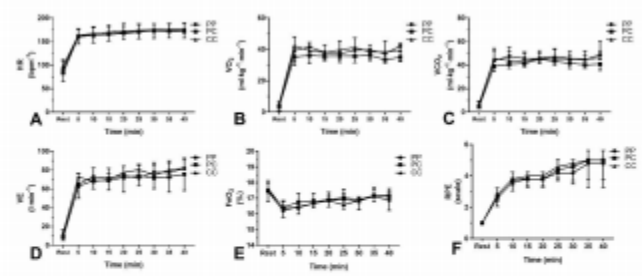


Figure 2 - *Cardiopulmonary responses of the following variables: (A) heart rate, (B) oxygen uptake, (C) output of carbon dioxide, (D) minute ventilation, (E) expired oxygen fraction, and (F) rate of perceived exertion. Error bars represent the standard deviation of the mean. (PP, placebo-placebo [n = 5]; PC, placebo-caffeine [n = 5]; CC, caffeine-caffeine [n = 5]).*

Figures 3 A, B, and C shows that between both experimental conditions, there were no significant differences in peak power output (PC, 826.99 ± 109.57 vs. PP, 779.76 ± 72.44 watts; p=0.70; CC, 822.84 ± 88.92 vs. PP,779.76 ± 72.44 watts; PC, 826.99 ± 109.57 vs. CC, 822.84 ± 88.92 watts; P=0.99), mean power output (PC,645.08 ± 74.91 vs. PP,625.89 ± 47.67 watts; P=0.98; CC,637.49 ± 67.99 vs. PP,625.89 ± 47.67 watts; P=0.97; PC, 645.08 ± 74.91 vs.CC, 637.49 ± 67.99watts; P=0.97) and fatigue index (PC, 68.61 ± 12.85 vs. PP, 75.54 ± 12.88 %;

P=0.57; CC, 79.32 ± 2.98 vs. PP, 75.54 ± 12.88 %; p=0.84; PC, 68.61 ± 12.85 vs.CC, 79.32 ± 2.98%: large effect-size d = -1.14; P=0.28). In Figure 3D, significant differences between the experimental condition in power curve in time of the 2 sec (PC, 657.05 ± 138.36 vs. PP, 497.54 ± 155.58 watts: large effect-size d = 1.08; P<0.05) and 3 sec (PC, 792.48 ± 102.31 vs. PP, 660.00 ± 119.45 watts: large effect-size d = 1.19; P<0.05) were observed.

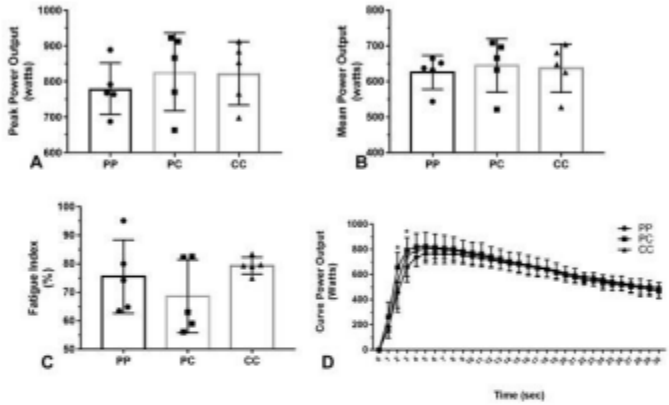


Figure 3 - *Power variables in the figures (A) peak power output, (B) mean power output, (C) fatigue index, and (D) curve power output recorded in the Wingate test of the athletes according to the experimental conditions (PP, placebo-placebo [n = 5]; PC, placebo-caffeine [n = 5]; CC, caffeine-caffeine [n = 5]). Error bars represent the standard deviation of the mean. (*) Significant difference between the PC vs. PP trials (P<0.05).*

In Figure 4, serum concentration of caffeine was not observed in the PP trial (Rest, AC, SE, WT, and R). We found significant differences (P<0.05) in serum caffeine levels in the PC trial (AC, 6.75±0.81 µg/mL-1; SE, 7.29±0.67 µg/mL-1; WT, 7.13±0.57 µg/mL-1; and R, 7.46±1.16 µg/mL-1) and CC trial (AC, 7.19±0.83 µg/mL-1; SE, 7.37±0.674 µg/mL-1; WT, 7.47±0.72 µg/mL-1; and R, 7.56±0.85 µg/mL-1) compared to PP trial. In figure 4 B, significant differences between the experimental condition PC 13.73±2.66 vs. PP 10.26±1.60 mmol.L^{-1} trials (large effect-size d = 1.58; P<0.05) in lactate blood concentration after 10-min recovery (R) were observed. There were significant differences in the concentration of lactate in PC trial (Rest 1.11±0.27 vs. ES 5.48±2.71 mmol.L^{-1}; large effect-size: d = 2.26; P<0.05) and in CC trial (Rest 1.35±0.55 vs. ES 5.59±3.79 mmol.L^{-1}; large effect-size: d = 1.56; P<0.05). There were significant differences in the concentration of lactate in PP (Rest 1.35±0.55 vs. WT 13.52±2.49 mmol.L^{-1}; large effect-size: d = 6.74; P<0.05), PC (Rest 1.11±0.27 vs. WT 14.49±2.34 mmol.L^{-1}; large effect-size: d = 8.03; P<0.05), and CC (Rest 1.35±0.55 vs. WT 14.33±3.31 mmol.L^{-1}; large effect-size: d = 5.47; P<0.05) trials.

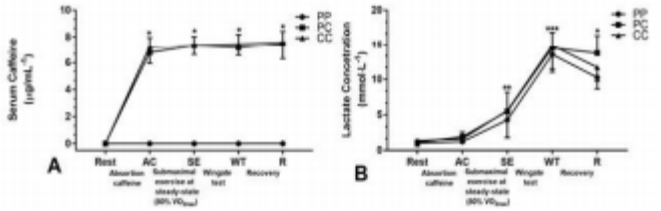


Figure 4 - *Analysis of blood samples: (A) serum caffeine, (B) lactate concentration (PP, placebo-placebo [n = 5]; PC, placebo-caffeine [n = 5]; CC, caffeine-caffeine [n = 5]). Error bars represent the standard deviation of the mean. Figure 4A: (*) Significant difference between the PC, CC vs. PP (P<0.001). Figure 4B: (*) Significant difference between the PC vs. PP in R (p<0.05). (**) Significant difference of PC and CC trials compared to Rest (P<0.01). (***) Significant difference of PP, PC, and CC trials compared with Rest (P<0.001).*

Discussion

The aim of this study was to test the hypothesis that caffeine supplementation (6 mg·kg-1 body mass) for 4 days, followed by acute intake would impact output power after performed submaximal intensity exercise. The present data observed that caffeine supplementation for 4 days, followed by acute intake did not show changes in cardiopulmonary variables (HR, VO_2, VCO_2, VE and FeO_2), in RPE and the following anaerobic power variables: peak/mean power output and fatigue index (P>0.05). However, only the PC trial compared with PP trial promoted improvements in the curve power output in 2 sec by 31.19% (P<0.05) and 3 sec by 20% (P<0.05). Additionally, a 10-min recovery was not enough to reduce blood lactate concentration in PC trials compared with PP trials (P<0.05).

Different methodologies have been used by several researchers to explain the positive ergogenic effects in the use of chronic [15] and acute caffeine [11]. The influence of a subjects' caffeine habituation is the determining factor in the verification of an ergogenic response, which is often neglected in many studies [24,13,14], although evidence shows that this interferes with physical performance after acute supplementation [15]. To minimize this conflict, all triathletes were classified as low caffeine users (242 ± 39 mg·day^{-1}) [18].

A recent positron emission tomography (PET) study Elmenhorst *et al.* [25] showed that almost half of the brain A1receptors were occupied by caffeine use when participants received an intravenous dose of 4.3 mg·kg-1 body mass, which corresponded to a plasma concentration of ~8 µg/mL-1. We used a dosage of 6 mg.kg^{-1} caffeine body mass and observed a peak serum concentration of (PC) 7.46±1.16 and (CC) 7.56±0.85 µg/mL^{-1}) (Figure 4A), similar to the study (6.59±4.44 µg/mL^{-1}) conducted by our research group, resulting in increased athletic performance [5]. This dose represents a posology of 450 mg of caffeine for 75 kg body mass (equivalent of 5 expresso cup), exceeding the usual consumption of the triathletes studied (242 ± 39 mg·day^{-1}). There is evidence that this dosage (6 mg·kg-1 body mass) may be capable of promoting reduction in the rate of perceived exertion [10]. However, we did not observe changes in RPE in PC and CC trials (Figure 2 F, P>0.05) even under a high blood lactate concentration observed after submaximal exercise in relation to Rest (Figure 4 B, P<0.01).

It is known that the rate of absorption may vary among athletes [5], and the hypothesis that 4 days habituation to caffeine could influence the increase in absorption rate was questioned [17]. However, we did not observe differences between PC and CC trials (Figure 4 A, P>0.05). The explanations are that this could facilitate the metabolization and increase the concentrations of paraxanthine, theobromine, and theophylline (caffeine metabolites not verified in the present study) [26-28]. In view of these arguments, we believe that chronic use of caffeine in the plasma is an important step in not inducing a positive ergogenic effect. Therefore, it was expected that only the acute use of caffeine (PC) could promote improvements in performance in endurance during the submaximal exercise on the treadmill [3]. However, we did not verify these changes by cardiopulmonary responses (Figures 2 A, B, C and D, P>0.05). The findings of several studies show that the main mechanism that undergoes the influence of caffeine use is the respiratory medullary complex [27,10,11]. It is known that elevated VE may increase the partial pressure of

alveolar/muscular oxygen and consequently induce improvements in performance in endurance [11]. In certain investigations, they failed to observe these findings, because the acute use of caffeine during the performance of a submaximal exercise at steady state (i.e., above 75% the VO_2max) revealed increases in diaphragm muscle fatigue [29,11]. Therefore, it does not seem prudent that fatigue of the diaphragm muscle could be associated to the findings observed in our study, because the fatigue installed in this muscle can promote significant reductions in the VE [11], and this was not observed (Figure 2 D, P>0.05). We believe that the intensity (80% VO_2max) of the submaximal exercise protocol in the present study was high about the cardiopulmonary condition of the athletes studied (Table I) to observe changes in cardiopulmonary parameters with caffeine use.

It is postulated that as a result of a resensitization of adenosine receptors (A2A/A2B) in skeletal muscle induced by the withdrawal to the chronic use of caffeine, may have induced an improvement in performance [28,17]. However, Irwin *et al.* [15] showed similar improvements in time-trial exercise with caffeine in habitual consumers regardless of a 4-day withdrawal period. Similarly, Van Soeren & Graham [24] showed equal improvements in time of exhaustion with acute caffeine supplementation in habituated consumers following no, 2-days and 4-days of caffeine withdrawal. Although our findings indicate that the acute use of caffeine (PC) improved the performance (Figure 3 D, P<0.05) and exhibition high values of lactate in recovery (PC 13.73±2.66 vs. PP 10.26±1.60 $mmol \cdot L^{-1}$ P<0.05 Figure 4 B), the 4 days period use of caffeine (CC) did not impact the mean/peak power output and fatigue index compared to placebo (PP) (Figure 3 A, B, and C P>0.05). However, the results observed individually of the 5 triathletes, PC; 4 and PC/CC; 3 triathletes responded to the use of caffeine (peak/mean power output) (Figure 3 A-B).

These results should be interpreted with caution considering inter-individual variability observed in the metabolism of caffeine. According to Ribeiro et al. [8], genetic polymorphisms in related genes to caffeine metabolism (aryl-hydrocarbon receptor [AHR], cytochrome P450 1A1 and 1A2 (CYP1A1-CYP1A2, Prenyl (Decaprenyl)) are a potential explanation for the variability in the ergogenic response to caffeine supplementation in trained athletes. Given these prior findings, it could be hypothesized that a slower metabolism would be advantageous for maximizing the ergogenic benefit of caffeine [28]. The limitation of this study is that we were unable to evaluate the polymorphisms in related genes to caffeine metabolism. This could minimize the impact on interindividual variability of a small sample of athletes and favor an improvement in statistical testing power.

Other studies [4,15,17] questioned that changes in athletes' training routines could induce doubtful findings regarding the effects of caffeine use. However, we did not observe significant changes in training routine per week (Table II, P>0.05). This suggests that triathletes have maintained similar physical capacity over the study period. Therefore, any influence on performance during the performance of the Wingate test in any experimental trial (PP, PC, and CC) is due to the 4 days period and acute supplementation.

Conclusion

In conclusion, these results indicate that caffeine supplementation (6 mg·kg-1 body mass) for 4-days, followed by acute ingestion, did not impact the triathletes output power after performed submaximal intensity exercise. The intensity (80% VO_2max) of the submaximal exercise protocol in the present study was high about the cardiopulmonary condition of the triathletes studied to observe changes in cardiopulmonary and output power parameters using the recommended caffeine dose. Thus, nutritional interventions may help athletes to adapt strategies for manipulating caffeine use. Sports and activities that alternate aerobic and anaerobic power would be applicable to the results of this study.

Acknowledgements

The authors thank the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro* (FAPERJ), the triathletes of the cities of Macaé/RJ and Campos dos Goytacazes/RJ, the professor Henrique Mota for the collections of blood, Paula Pontes and Alessandra Neves for the translation and the scientific initiation students of our laboratory. This study was financed in part by the *Corordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil* (CAPES) (Finance Code 001)

References

1. Bentley DJ. Millet GP,Vleck VE, McNaughton LR. Specific aspects of contemporary triathlon: implications for physiological analysis and performance. Sports Med 2002;32(6):345-9. https://doi.org/10.2165/00007256-200232060-00001
2. Bonsignore MR, Morici G, Abate P, Romano S, Bonsignore G. Ventilation and entrainment of breathing during cycling and running in triathletes. Med Sci Sports Exercise 1998;30(2):239-5. https://doi.org/10.1097/00005768-199802000-00011
3. Barnes KR, Kilding AE. Strategies to improve running economy. Sports Med 2015;45(1):37-56. https://doi.org/10.1007/s40279-014-0246-y
4. Lara B, Ruiz-Moreno C, Salinero JJ, Del Coso J. Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. PLoS One 2019;14:e0210275. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275
5. Ribeiro BG, Morales AP, Sampaio-Jorge F, Barth T, de Oliveira MB, Coelho GM et al. Caffeine attenuates decreases in leg power without increased muscle damage. Journal of Strength & Conditioning Research 2016;30(8):2354-2360. https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000001332
6. Powers SK, Dodd S, Woodyard J, Magnum M. Caffeine alters ventilator and gas exchange kinetics during exercise. Med Sci Sports Exercise 1986;18(1):101-6.
7. Assi HN, Bottoms L. The effects of caffeine on rugby passing accuracy while performing the Reactive Agility Test. Sci Sports 2014;29(5):275-81. https://doi.org/10.1016/j.scispo.2014.07.012
8. Ribeiro BG, Morales AP, Sampaio-Jorge F, Tinoco FS, MatosAA, Leite TC.Acute effects of caffeine intake on athletic performance: A systematic review and meta-analysis. Revista Chilena de Nutrición 2017;44(3):283-91. https://doi.org/10.4067/s0717-75182017000300283
9. Wilk M, Krzysztofik M, Maszczyk A, Chycki J, Zajac A. The acute effects of caffeine intake on time under tension and power generated during the bench press movement. International Society of Sports Nutrition 2019;16(1):8. https://doi.org/10.1186/s12970-019-0275-x
10. Grgic J, Mikulic P, Schoenfeld BJ, Bishop DJ, Pedisic Z. The influence of caffeine supplementation on resistance exercise: A review. Sports Med 2019;49(1):17-30. https://doi.org/10.1007/s40279-018-0997-y
11. Chapman RF, Mickleborough TD. The effects of caffeine on ventilation and pulmonary function during exercise: an often-overlooked response. Physician and Sports Medicine 2009;37(4):97-103. https://doi.org/10.3810/psm.2009.12.1747
12. Chapman RF, Stager JM. Caffeine stimulates ventilation in athletes with exercise-induced hypoxemia. Medicine & Science in Sports & Exercise 2008;40(6):1080-6. https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181667421
13. Hodgson AB, Randell RK, Jeukendrup AE. The metabolic and performance effects of caffeine compared to coffee during endurance exercise. PLoS One 2013;8(4):e59561. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059561
14. Skinner TL, Jenkins DG, Taaffe DR, Leveritt MD, Coombes JS. Coinciding exercise with peak serum caffeine does not improve cycling performance. J Sci Med Sport 2013;16(1):54-9. https://doi.org/10.1016/j.jsams.2012.04.004
15. Irwin C, Desbrow B, Ellis A, Rant BO, Leveritt M. Caffeine withdrawal and high-intensity endurance cycling performance. J Sports Sci 2011;29(5):509-15. https://doi.org/10.1080/02640414.2010.541480
16. Johansson B, Ahlberg S, van der Ploeg I, Brené S, Lindefors N, Persson H et al. Effect of long term caffeine treatment on A1 and A2 adenosine receptor binding and on mRNA levels in rat brain. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 1993;347(4):407-14. https://doi.org/10.1007/bf00165391
17. Beaumont R, Cordery P, Funnell M, Mears S, James L, Watson P. Chronic ingestion of a low dose of caffeine induces tolerance to the performance benefits of caffeine. J Sports Sci 2017;35(19):1920-27. https://doi.org/10.1080/02640414.2016.1241421
18. Lynge J, Hellsten Y. Distribution of adenosine A1, A2A and A2B receptors in human skeletal muscle. Acta Physiologica Scandinavica 2000;169(4):283-90. https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2000.00742.x

19. Yang JN, Chen JF, Fredholm BB. Physiological roles of A1 and A2A adenosine receptors in regulating heart rate, body temperature, and locomotion as revealed using knockout mice and caffeine. Am J Physiol Heart Cir Physiol 2009;296(4):H1141-1149. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00754.2008
20. Landrum RE, Meliska CJ, Loke WH. Effects of caffeine and task experience on task performance. Psychologia: An International Journal of Psychology in the Orient 1988;31(2):91-7.
21. Westerterp-Plantenga MS, Lejeune MP, Kovacs EM. Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation. Obes Res 2005;13(7):1195-1204. https://doi.org/10.1038/oby.2005.142
22. Morales AP, Sampaio-Jorge F, Cruz Rangel LF, Souza MJ, Leite TC, Ribeiro BG. Cardiopulmonary performance during maximal exercise in soccer players with alterations in renal function. J Hum Kinet 2017;57(1):107-15. https://doi.org/10.1515/hukin-2017-0052
23. Bar-Or O. The Wingate anaerobic test. An update on methodology, reliability and validity. Sports Med 1987;4(6):381-94. https://doi.org/10.2165/00007256-198704060-00001
24. Van Soeren MH, Graham TE. Effect of caffeine on metabolism, exercise endurance, and catecholamine responses after withdrawal. J Applied Physiol 1998;85(4):1493-501. https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.4.1493
25. Elmenhorst D, Meyer PT, Matusch A, Winz OH, Bauer A. Caffeine occupancy of human cerebral A1 adenosine receptors: in vivo quantification with 18F-CPFPX and PET. Journal of Nuclear Medicine 2012;53(11):1723-29. https://doi.org/10.2967/jnumed.112.105114
26. Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. J Neurosci 1999;19(10):4011-22.
27. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. Pharmacological Reviews 1999;51(1):83-133.
28. Gonçalves LS, Painelli VS, Yamaguchi G, Oliveira LF, Saunders B, Silva RP, et al. Dispelling the myth that habitual caffeine consumption influences the performance response to acute caffeine supplementation. J Applied Phys 2017;123(1):213-20. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00260.2017
29. Mayock DE, Standaert TA, Woodrum DE. Effect of methylxanthines on diaphragmatic fatigue in the piglet. Pediatr Res 1992;32(5):580-4. https://doi.org/10.1203/00006450-199211000-00019

APÊNDICE 11 - Manuscrito publicado 3

MORALES, A. P. *et al*. Caffeine Supplementation for 4 days does not induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters of cyclists: A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled study. *Nutrients*, vol. 12, p. 2101, 2020.

nutrients

MDPI

Article

Caffeine Supplementation for 4 Days Does Not Induce Tolerance to the Ergogenic Effects Promoted by Acute Intake on Physiological, Metabolic, and Performance Parameters of Cyclists: A Randomized, Double-Blind, Crossover, Placebo-Controlled Study

Anderson Pontes Morales [1,2,3,4,*,†], Felipe Sampaio-Jorge [1,2,3,5], Thiago Barth [5,6], Anna Paola Trindade Rocha Pierucci [4] and Beatriz Gonçalves Ribeiro [1,4]

1 Laboratory Research and Innovation in Sports Sciences, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Macaé, RJ 27930-560, Brazil; felipesjorge@gmail.com (F.S.-J.); ribeirogoncalvesb@gmail.com (B.G.R.)
2 Macaé Sports Secretary, City Government of Macaé (PMM), Macaé, RJ 27913-080, Brazil
3 Higher Institutes of Education of CENSA (ISECENSA), Campos dos Goytacazes, RJ 28030-260, Brazil
4 Postgraduate Program in Nutrition, Josué de Castro Nutrition Institute, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Macaé, RJ 21941-590, Brazil; appierucci@gmail.com
5 Postgraduate Program in Bioactive Products and Biosciences, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Macaé, RJ 27930-560, Brazil; barththiago@yahoo.com.br
6 Laboratory of Bioactive Products, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Macaé, RJ 27933-378, Brazil
* Correspondence: andersonmrl@hotmail.com; Tel.: +55-22997087-600
† Current address: Laboratory Research and Innovation in Sports Sciences, Federal University of Rio de Janeiro—Macaé Campus, RJ, Brazil. 50, Aluízio da Silva Gomes, Granja dos Cavaleiros, Macaé, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 16 June 2020; Accepted: 8 July 2020; Published: 16 July 2020

check for updates

Abstract: The present study investigated whether the caffeine supplementation for four days would induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters of cyclists. A double-blind placebo-controlled cross-over design was employed, involving four experimental trials; placebo (4-day)-placebo (acute)/PP, placebo (4-day)-caffeine (acute)/PC, caffeine (4-day)-caffeine (acute)/CC and caffeine (4-day)-placebo (acute)/CP. Fourteen male recreationally-trained cyclists ingested capsules containing either placebo or caffeine (6 mg·kg^{-1}) for 4 days. On day 5 (acute), capsules containing placebo or caffeine (6 mg·kg^{-1}) were ingested 60 min before completing a 16 km time-trial (TT). CC and PC showed improvements in time (3.54%, ES = 0.72; 2.53%, ES = 0.51) and in output power (2.85%, ES = 0.25; 2.53%, ES = 0.20) ($p < 0.05$) compared to CP and PP conditions, respectively. These effects were accompanied by increased heart rate (2.63%, ES = 0.47; 1.99%, ES = 0.34), minute volume (13.11%, ES = 0.61; 16.32%, ES = 0.75), expired O_2 fraction (3.29%, ES = 0.96; 2.87, ES = 0.72), lactate blood concentration (immediately after, 29.51% ES = 0.78; 28.21% ES = 0.73 recovery (10 min), 36.01% ES = 0.84; 31.22% ES = 0.81), and reduction in expired CO_2 fraction (7.64%, ES = 0.64; 7.75%, ES = 0.56). In conclusion, these results indicate that caffeine, when ingested by cyclists in a dose of 6 mg·kg^{-1} for 4 days, does not induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters.

Keywords: caffeine; endurance; exercise; fatigue

1. Introduction

The search for licit ergogenic resources is growing by cyclists in an attempt to minimize muscle fatigue generated in training sessions/competitions. In cyclists, muscle fatigue is manifested by the inability to repeatedly produce muscle strength or power over some time [1]. The ergogenic aid can be characterized as a supplement that delays fatigue, thus maintaining the output power and contributing to the improvement of sports performance [1,2]. In this scenario, caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) has been described as a licit ergogenic resource that is effective in increasing performance in various sports (i.e., triathlon, and cycling) [1,3], in particular, sports that mainly involve muscle strength/power and aerobic endurance [1,2].

The primary mechanism of action described for caffeine is its role as a central nervous system (CNS) stimulant acting as a non-selective antagonist of the central and peripheral adenosine receptors (A_1, A_{2A}, A_{2B}, and A_3) [4]. Adenosine is a neurotransmitter that acts by modulating various physiological (i.e., perceptual and cardiorespiratory) and metabolic (i.e., cortisol and lactate blood levels) parameters.

In an attempt to establish the proper protocol to induce ergogenicity, researchers have examined different strategies, including the source of caffeine to be used [5], the dose used [2,3], and the acute time of ingestion [6]. Among these strategies, acute caffeine intake before exercise has been studied more closely by researchers [7–11].

The use of caffeine 1 h before exercise (acute intake) was suggested as an ergogenic strategy by the recommendation of current sports nutrition guidelines [12], using doses ranging from 3 to 6 $mg \cdot kg^{-1}$ body mass. However, these recommendations do not address the impact of athletes' usual caffeine consumption or chronic supplementation on their possible acute ergogenic effect [9,10]. For example, Beaumont et al. [9] observed that chronic use of caffeine supplementation (1.5 $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$) followed by acute intake (3 $mg \cdot kg^{-1}$ body mass of caffeine) induced tolerance to ergogenic effects on performance. Lara et al. [10], using an incremental cycle ergometer model, demonstrated that daily caffeine supplementation (3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$) for 20 days, followed by acute intake (6 $mg \cdot kg^{-1}$ body mass of caffeine) caused a reduction in the magnitude of ergogenicity on the ventilatory response. Both studies [9,10] used caffeine doses that exceeded the average amount of the subjects' usual caffeine consumption and show that chronic use followed by an acute dose produced tolerance effects.

Irwin et al. [7] did not observe tolerance to ergogenic effects on time trial performance in low to moderate caffeine users. They received a dose (3 $mg \cdot kg^{-1}$ body weight) of caffeine similar to the usual consumption (3 $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$) in a short period (4 days), followed by an acute dose (6 $mg \cdot kg^{-1}$ body weight of caffeine). This investigation [7] is comparable to the present study, but, differently, a higher dose of caffeine above the usual consumption will be tested in moderate to high consumers.

Thus, the present study investigated whether the caffeine supplementation for four days would induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters of cyclists.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

A statistical power analysis (G*Power 3.1) was performed to estimate the sample size based on the simulated cycling time trial (TT) (16 km) of a pilot study ($n = 8$ cyclists). The projected sample size was 12 with an effect size f of 0.41, alpha of 0.05, and power of 0.80. Using a more conservative approach (a priori) and taking into account possible dropouts, the effect size f was 0.36 (medium effect size), and the projected sample size was fourteen male cyclists. Participation was voluntary, and the following inclusion criteria were established: (a) all had at least 4 years of cycling experience; (b) participated in at least 20 competitions between 2018 and 2019; (c) have not had a history of cardiorespiratory, gastrointestinal, and musculoskeletal disorders in the last 3 months (Supplementary File—CONSORT Flow Diagram). They had a mean ± standard deviation (SD) age of 34.1 ± 4.4 years, a height of 178 ± 9 cm, body mass of 79.1 ± 11.8 kg, body mass index of 24.6 ± 2.1 $kg \cdot m^2$, maximal oxygen uptake

(VO_2max) of 51.5 ± 6.3 mL·kg^{-1}·min^{-1}, and power output max (Wmax) of 398.9 ± 35.1 W. The training volume of the cyclists was 202 ± 83 km per week. In addition, a validated caffeine consumption questionnaire was administered to the participants, showing that all participants were moderate to high caffeine consumers (285.9 ± 108.0 mg·day^{-1}) [8]. Participants gave their written informed consent before inclusion. The protocol (2.540.958/2018) was approved by the Ethics Committee of Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) and was registered on a publicly accessible virtual platform (Brazilian Clinical Trials Registry) (http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-5745nv/).

2.2. Study Design

A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled design was used in this study. On the first visit to the laboratory, participants underwent dietary assessment and cycling test to exhaustion. On the second visit, cyclists became familiar with the time trial test. So they received four visits from the researchers at home, one per day, for delivery and verification of capsule consumption (according to randomization). The other day they consumed the capsule acutely 60 min before the 16 km time trial test. The study preconized a seven-day washout [7,10] between the different intervention strategies characterized below. We tested the following strategies: Placebo–Placebo (PP), participants received Placebo (4-day supplementation), and Placebo (acute ingestion, 60 min before simulated cycling TT completed). Placebo capsules were 250 mg of magnesium silicate single daily dose. Placebo–Caffeine (PC), participants received Placebo (4-day supplementation), and Caffeine (acute ingestion, 60 min before simulated cycling TT completed). Caffeine capsules were 6 mg·kg^{-1} body mass. Caffeine–Caffeine (CC), participants received Caffeine (4-day supplementation), and Caffeine (acute ingestion, 60 min before simulated cycling TT completed). Caffeine–Placebo (CP), participants received Caffeine (4-day supplementation), and Placebo (acute ingestion, 60 min before simulated cycling TT completed). Random numbers placed in sealed envelopes drawn only by the second researcher constituted the randomization process of the study. At the first visit to the laboratory, the researchers verified the routine energy and caffeine intake of food, VO_2max, and workload capacity in the graded test until exhaustion in the cycle ergometer. The athletes were instructed to withdraw all their caffeine consumption (i.e., food sources of caffeine) during the experiment and were monitored by telephone contact, e-mail, and in-person. On the test day, cyclists arrived fasting in the laboratory, and soon an intravenous cannula (20G Jelco; B. Braun Medical Inc., Bethlehem, PA, USA) was inserted into the forearm, and then four blood samples (10 mL) were obtained: before ingestion of capsules (baseline), 60 min after intake of capsules (T1), immediately after TT (T2) and after 10 min of recovery (recovery). Cyclists did not exercise 24 h before the experimental trials in the laboratory. The athletes were instructed to continue the routine of daily training. The experimental trials were performed at the same time of day (7:00 AM) (Figure 1).

2.3. Habitual Food Intake Recording and Caffeine-Containing Foods

Each athlete completed the 24-h food record from the first to the fourth trial. According to the 24-h food record of the first trial, it was photocopied and returned to athletes so that the same diet could be repeated for subsequent trials. Energy consumption, total carbohydrates, total proteins, and total lipids were determined. The TACO® database was used to quantify macronutrient intake and Dietpro® 5i (Dietpro, Viçosa, MG, Brazil) software was used for nutrient calculation. To assess habitual caffeine intake, we used a questionnaire adapted from Landrum et al. [13]. The questionnaire was applied individually with the supervision of a qualified nutritionist. The questionnaire consists of a list of food sources of caffeine (coffee, tea, cocoa, chocolate, soft drinks, medicine, and dietary supplements) and the period of the day (morning, 6:00 AM to 12 noon; afternoon, 12 noon to 6:00 PM; evening, 6:00 AM to 2:00 AM; night, 2:00 AM to 6:00 AM) consumed. The types of food, dietary supplements in the diet, and medicaments of athletes who contained caffeine were identified. Caffeine content was obtained from the USDA Food Composition Databases, from food labels and medication package inserts.

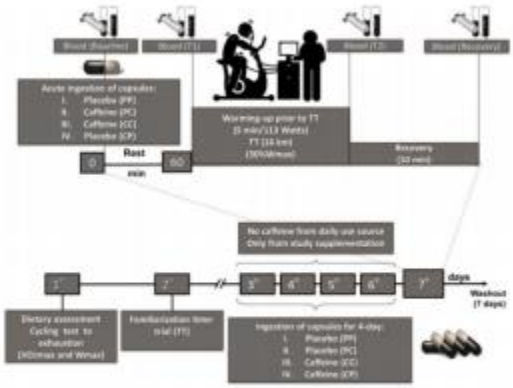


Figure 1. Experimental design.

2.4. VO_2max and Workload Capacity

Participants performed a graded exercise test until exhaustion on a mechanically braked cycle ergometer (Biotec 2100, Cefise®, São Paulo, Brazil) to determine VO_2max. Participants began pedaling at a power output of 113 W, with 45-W increments every 2 min and pedaling rate 88 rpm was kept constant until exhaustion. Maximal workload capacity (Wmax) was determined by the following equation: Wmax = Output Power (Woutput) + ((t/113) × 45), Woutput is the workload in the last completed stage, and t is the time spent in the final stage not completed [8]. Heart rate was monitored continuously (Polar Electro Oy®, Kempele, Finland). Pulmonary gas exchange was determined breath by breath, by use of a gas analysis system VO2000 (MedGraphics®, St. Paul, MN, USA). The equipment was calibrated automatically according to the manufacturer's specifications before each test. The present study determined and validated the VO_2max following these criteria: increase in VO_2 less than 2.1 mL·kg^{-1}·min^{-1} by increasing the intensity; exhaustion of the individual; the respiratory exchange ratio bigger than 1.10. The plateau in VO_2 was determined when the difference in oxygen consumption in the final 30 s of the last two stages (ΔVO_2) was ≤ 2.1 mL·kg^{-1}·min^{-1}.

2.5. Simulated Cycling TT Performance

Participants reported to the laboratory at individually standardized times after an 8-h fasting period. Before the main exercise, participants underwent a 5-min warm-up at 113 W (88 rpm), immediately followed by the simulated cycling TT. The protocol consisted of a continuous test, with each subject cycling with a rotation higher than 88 rpm as quickly as possible at a distance of 16 km at work intensity. It was used a constant workload representing 50% of the maximum capacity (above 199.67 ± 17.90 W equivalent to work higher than ~407 kJ, determined by the following equation: work (J) = 50% Wmax × t) on the mechanized cycle ergometer brake. The cycle ergometer was connected to a laptop using "Ergometric" software (version 7.0, Cefise®, São Paulo, Brazil) for the collection and storage of data, such as power output (W) and cadence (rpm). The participants were blinded to performance-related information (exercise time and cadence) during the tests. The only information that the participants received during the test was the distances (2 km, 4 km, 6 km, 8 km, 10 km, 12 km, 14 km, and 16 km). At these set intervals during the trial, participants were asked their rating of perceived exertion (RPE) using the 0-to-10-point Borg Scale [14]. Ventilation (volume minute V_E, oxygen uptake VO_2, carbon dioxide output VCO_2, O_2 expiration fraction FeO_2, and CO_2 expiration

fraction $FeCO_2$), heart rate (HR), and power output parameters were measured continuously during the TT. The parameters listed are expressed in ten points (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, 90%, and 100%), the curve of the total time completed during the TT and average in PP, PC, CC and CP conditions. All the trials were performed in a climate-controlled laboratory (21 °C to 24 °C, 41% to 52% relative humidity).

2.6. Nutritional Intervention

The participants were administered a dose of anhydrous caffeine (6 mg·kg^{-1} body mass) or placebo (250 mg magnesium silicate), provided in gelatin capsules, identical in color, size, and appearance. Because the participants are used to consuming average amounts of caffeine daily, around 285.92 ± 108.04 mg·day^{-1} (verified through a questionnaire), the present study chose to offer a higher dose than usual. This dose (6 mg·kg^{-1} of body weight) represented a dosage of 474.78 ± 70.80 mg, exceeding the average amount of usual consumption, which made it possible to verify the effects of tolerance. In the presence of a researcher, all athletes were instructed to take a single capsule daily at the same time (9:00 AM) during the 4-day supplementation. In acute ingestion, the capsule was administered with 250 mL of water 60 min before TT. Participants rested quietly for 60 min before starting the test in all the sessions. Supplements for each participant were prepared and separated by a non-affiliated researcher to ensure double-blinding.

2.7. Blood Caffeine, Cortisol, Lactate, and Glucose Concentrations Analysis

The measurement of blood levels of caffeine, cortisol, lactate, and glucose were performed at baseline, T1, T2, and recovery. Plasma and serum were obtained by centrifugation at 2.500 rpm at 4 °C for 20 min. The resultant plasma and serum were stored at −20 °C until the analyses could be performed. The caffeine blood levels were determined using a HPLC method, adapted from Ribeiro et al. [2]. The HPLC analyses were carried out using a Shimadzu chromatograph (Shimadzu® Corp., Kyoto, Japan). To perform the lactate and glucose analyses, commercial kits from (Labtest, Lagoa Santa, Brazil) and the BIO200 analyzer (Bioplus®, São Paulo, Brazil), respectively, were used. Cortisol was analyzed by the chemiluminescent technique using the reagent kit (Abbott Diagnostics Division, Santa Clara, CA, USA) and the Architect i2000SR automatic immunoassay analyzer (Abbott®, Abbott Park, IL, USA).

2.8. Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± SD or as median (interquartile deviation), following the normality of Shapiro Wilk test. All variables were analyzed (SPSS, version 16.0) with one way or two way ANOVA according to the data. Mauchly's test of sphericity was performed for all test variables, and Greenhouse–Geisser correction for within-subject effects was used in cases where the assumption of sphericity was violated. Significant interactions were followed up by pairwise comparisons through simple main effect analysis with Tukey correction for multiple comparisons (habitual food intake recording, perception of effort responses and cardiorespiratory parameters, cycling TT and power output, cortisol and lactate concentrations). We used the Friedman and Kruskal–Wallis tests for the glucose and caffeine concentrations. Effect Sizes (ES) (Cohen's d: small effect ≥ 0.20, medium effect ≥ 0.50, large effect ≥ 0.80, very large effect ≥ 1.30) and Delta (Δ) of caffeine supplementation were calculated as the difference between means corresponding to caffeine (PC, CC, CP) and placebo (PP). For all statistical analyses, a p value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Habitual Food Intake Recording

Food intake, which did not exhibit significant main effects in treatment 24 h before the trials, is shown in Table 1: energy [F(2.320, 30.16) = 0.8352, $p = 0.4590$], carbohydrates [F(1.901, 24.71) = 1.117, $p = 0.3406$], protein [F(1.933, 25.13) = 2.097, $p = 0.1450$], and lipids [F(1.809, 23.52) = 1.912, $p = 0.1729$].

Table 1. Food intake of cyclists 24-h before the trials.

	PP ($n = 14$)	PC ($n = 14$)	CC ($n = 14$)	CP ($n = 14$)
Energy (kcal)	2132.93 ± 743.67	2056.90 ± 389.76	2181.42 ± 452.35	2261.41 ± 525.69
Carbohydrates (g·day^{-1})	250.92 ± 67.58	242.06 ± 67.23	276.70 ± 80.51	291.61 ± 67.58
Protein (g·day^{-1})	121.62 ± 45.38	114.38 ± 42.55	126.62 ± 47.25	131.63 ± 45.38
Lipids (g·day^{-1})	78.50 ± 45.69	69.23 ± 25.28	62.01 ± 27.92	76.35 ± 27.62

PP, Placebo–Placebo; PC, Placebo–Caffeine; CC, Caffeine–Caffeine; CP, Caffeine–Placebo.

3.2. RPE and Cardiorespiratory Parameters

RPE only exhibited significance of distance traveled in TT (Table 2) [F(7, 91) = 150.1, $p = 0.0001$] for the main effect. There were no differences between treatments and interaction between treatment and distance traveled in TT ($p > 0.05$) (Table 2).

Table 2. Mean (±SD) rating of perceived exertion (RPE) for every 2 km of distance traveled in cycling time trial (TT).

	Distance							
Treatment	2 km	4 km	6 km	8 km	10 km	12 km	14 km	16 km
PP	3.56 ± 1.01	4.67 ± 1.22 *	5.67 ± 1.32 *	6.44 ± 1.13 *	6.89 ± 1.05 *	8.11 ± 0.93 *	9.00 ± 1.00 *	9.11 ± 0.78 *
PC	3.44 ± 1.51	4.67 ± 1.32 *	5.78 ± 1.48 *	6.56 ± 1.42 *	7.11 ± 1.05 *	8.00 ± 1.12 *	8.78 ± 0.97 *	9.00 ± 1.0 *
CC	4.00 ± 1.32	4.67 ± 1.12 *	5.56 ± 1.42 *	6.67 ± 1.22 *	7.22 ± 0.83 *	8.00 ± 1.00 *	8.67 ± 1.32 *	8.78 ± 1.30 *
CP	4.11 ± 1.54	5.22 ± 1.72 *	6.22 ± 1.64 *	7.00 ± 1.41 *	7.44 ± 1.13 *	8.67 ± 1.12 *	9.00 ± 1.00 *	9.11 ± 0.93 *

PP, Placebo–Placebo; PC, Placebo–Caffeine; CC, Caffeine–Caffeine; CP, Caffeine–Placebo. * Significant difference from 2 km ($p < 0.05$).

HR (Figure 2A) showed significant treatment [F(3, 39) = 9.134, $p = 0.000$] and percentage of time curve [F(9, 117) = 109.0, $p = 0.000$] in the main effect. However, there was no significance observed in the interaction between treatment and percentage of time curve [F(27, 351) = 1.345, $p = 0.120$]. HR was higher with caffeine in the PC condition (174.01 ± 9.94 vs. 170.6 ± 9.51 bpm) ($\Delta = 3.41$ bpm; $p = 0.02$; ES = 0.34 [95% CI 0.36, 6.46]) than that with PP, and higher in the CC condition (176.01 ± 9.59 vs. 171.49 ± 9.47 bpm^{-1}) ($\Delta = 4.52$ bpm; $p = 0.00$; ES = 0.47 [95% CI 1.32, 7.42]) than that with CP. No differences were observed between CC and PC ($p > 0.05$).

There was no significant difference ($p = 0.7947$) in the main effects on VO_2 (Figure 2B). However, a significant percentage of time curve [F(9, 117) = 14.37, $p = 0.0001$] and interaction between treatment and percentage of time curve ($p = 0.0005$) effects were seen.

VCO_2 (Figure 2C) exhibited significant treatment [F(3, 39) = 5.065, $p = 0.0047$] and percentage of time curve [F(9, 117) = 38.33, $p = 0.001$] main effects. However, there was no significance observed in the interaction between treatment and percentage of time curve ($p = 0.7184$). VCO_2 was higher with caffeine in the PC condition (45.06 ± 5.32 vs. 42.04 ± 5.15 mL·kg^{-1}·min^{-1}) ($\Delta = 3.02$ mL·kg^{-1}·min^{-1}; $p = 0.02$; ES = 0.57 [95% CI 0.24, 5.79]) than that with PP. No differences were observed between CC and PC ($p > 0.05$).

V_E (Figure 2D) exhibited significant treatment [F(3, 39) = 14.49, $p = 0.000$] and percentage of time curve [F(9, 117) = 76.07, $p = 0.000$] main effects. However, a significant interaction between treatment and percentage of time curve ($p = 0.070$) was not observed. VE was higher with caffeine in the PC condition (86.38 ± 16.50 vs. 74.26 ± 15.62 L·min^{-1}) ($\Delta = 12.12$ L·min^{-1}; $p = 0.00$; ES = 0.75

[95% CI 5.76, 18.47]) than that with PP, and with caffeine in the CC position (84.62 ± 16.44 L·min^{-1} vs. 74.81 ± 15.44 L·min^{-1}) (Δ = 9.81 L·min^{-1}; p = 0.00; ES = 0.61 [95% CI 3.44, 16.16]) than that with CP. No differences were observed between CC and PC (p > 0.05).

FeO_2 (Figure 2E) exhibited significant treatment [F(3, 39) = 10.93, p = 0.0001] and percentage of time curve [F(9, 117) = 91.09, p = 0.0001] main effects. However, there was no significant interaction between treatment and percentage of time curve (p = 0.9996) observed. FeO2 was higher with caffeine in the PC condition (17.17 ± 0.65% vs. 16.69 ± 0.68%) (Δ = 0.48%; p = 0.00; ES = 0.72 [95% CI 0.07, 0.88]) than that with PP, and in the CC condition (17.22 ± 0.65% vs. 16.67 ± 0.24%) (Δ = 0.55%; p = 0.00; ES = 0.96 [95% CI 0.20, 0.88]) than that with CP. No differences were observed between CC and PC (p > 0.05).

$FeCO_2$ (Figure 2F) exhibited significant treatment [F(3, 39) = 8.006, p = 0.0003] and percentage of time curve [F(9, 117) = 60.46, p = 0.0001] main effects. However, there was no significant interaction between treatment and percentage of time curve (p = 0.9996) observed. FeCO2 was lower with caffeine in the PC condition (4.28 ± 0.64% vs. 4.64 ± 0.63%) (Δ = −0.36%; p = 0.00; ES = 0.56 [95% CI −0.64, −0.07]) than that with PP, and with caffeine in the CC condition (4.23 ± 0.63% vs. 4.58 ± 0.28%) (Δ = −0.35%; p = 0.00; ES = 0.64 [95% CI −0.63, −0.07]) than with CP. No differences were observed between CC and PC (p > 0.05).

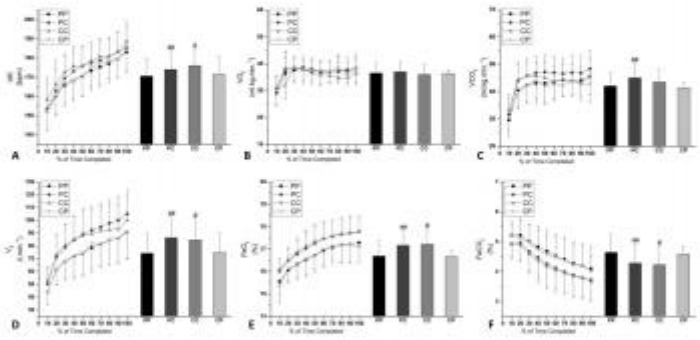


Figure 2. Mean (±SD). Mean (±SD). Curve values and the average of cardiorespiratory parameters during TT performance: (**A**) HR, (**B**) VO_2, (**C**) VCO_2, (**D**) V_E, (**E**) FeO_2, and (**F**) $FeCO_2$. * Significant difference to CC from CP (p <0.05). # Significant difference from CP (p < 0.05). ## Significant difference from PP (p < 0.05).

3.3. Power Output and Cycling TT Performance

Power output (Figure 3A) exhibited significant treatment [F(3, 39) = 8.957, p = 0.0001] and percentage of time curve [F(9, 117) = 9.409, p = 0.0001], and an interaction between treatment and percentage of time curve [F(27, 351) = 2.383, p = 0.0002] main effects. Power output was higher with caffeine in the PC condition (250.3 ± 30.24 W vs. 244.1 ± 29.33 W) (Δ = 6.20 W; p = 0.00; ES = 0.20 [95% CI 1.25, 11.10]) than that with PP, and in the CC condition (249.7 ± 27.23 W vs. 242.5 ± 29.51 W) (Δ = 7.12 W; p = 0.00; ES = 0.25 [95% CI 0.55, 10.53]) than that with CP. No differences were observed between CC and PC (p > 0.05).

There was a main effect of treatment on TT performance (Figure 3B) [F(2.488, 3234) = 11.66, p = 0.0001]. TT test completion time was lower with caffeine in both PC (1631 ± 90.45 s vs. 1674 ± 72.88 s) (Δ = −43 s; p = 0.04; ES = 0.51 [95% CI −85.00, −1.71]) than that with PP, and in CC (1634 ± 61.29 s vs.

1692 ± 90.47 s) (Δ = −58 s; $p = 0.00$; ES = 0.72 [95% CI −97.38, −18.34]) than that with CP. No differences were observed between CC and PC ($p > 0.05$).

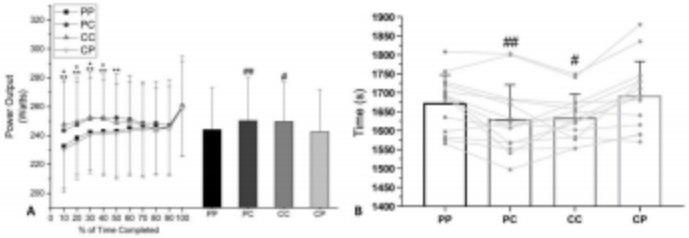


Figure 3. Mean (±SD). Curve values and the average of performance parameters during TT performance: (**A**) Power output and (**B**) time of simulated cycling TT performance. * Significant difference to CC from CP ($p < 0.05$). ** Significant difference to PC from PP ($p < 0.05$). # Significant difference from CP ($p < 0.05$). ## Significant difference from PP ($p < 0.05$).

3.4. Blood Caffeine, Cortisol, Lactate and Glucose Concentrations

Caffeine concentration exhibited significant time ($p = 0.0001$) and treatment ($p = 0.0001$) main effects. Cortisol concentration only exhibited significant time [$F(3, 39) = 163.4$, $p = 0.000$] main effect. Lactate concentration exhibited significant treatment [$F(3, 39) = 18.32$, $p = 0.000$] and time [$F(3, 39) = 239.6$, $p = 0.000$], and an interaction between treatment and time [$F(9, 117) = 11.61$, $p = 0.000$] main effects. Glucose concentration exhibited significant time ($p = 0.0001$) main effect (Table 3).

Table 3. Analysis of blood samples ($n = 14$). Mean ±SD and median (interquartile deviation).

	Baseline	T1	T2	Recovery
Caffeine ($\mu g \cdot mL^{-1}$)				
PP	0.34 (0.14)	0.37 (0.22)	0.36 (0.16)	0.37 (0.11)
PC	0.00 (0.32)	7.60 (1.32) [a,b]	7.61 (1.33) [a,b]	7.80 (0.56) [a,b]
CC	0.45 (0.41)	8.19 (0.76) [a,c]	8.35 (0.76) [a,c]	8.18 (1.11) [a,c]
CP	0.33 (0.36)	0.30 (0.38)	0.21 (0.31)	0.27 (0.44)
Cortisol ($\mu g \cdot mL^{-1}$)				
PP	10.74 ± 3.45	10.98 ± 3.34	14.90 ± 4.2 [a]	15.33 ± 4.20 [a]
PC	9.64 ± 3.66	9.70 ± 3.67	16.60 ± 5.2 [a]	16.84 ± 5.06 [a]
CC	10.73 ± 3.58	10.90 ± 3.39	16.02 ± 4.28 [a]	16.44 ± 4.23 [a]
CP	11.49 ± 2.14	11.62 ± 2.26	15.76 ± 2.61 [a]	16.17 ± 2.80 [a]
Lactate ($mmol \cdot L^{-1}$)				
PP	1.09 ± 0.42	1.02 ± 0.50	12.58 ± 4.59 [a]	9.16 ± 3.31 [a]
PC	1.04 ± 0.60	1.38 ± 0.54	16.13 ± 5.06 [a,b]	12.02 ± 3.68 [a,b]
CC	1.11 ± 0.48	1.30 ± 0.53	15.14 ± 4.34 [a,c]	12.01 ± 4.07 [a,c]
CP	1.14 ± 0.77	1.01 ± 0.64	11.69 ± 4.43 [a]	8.83 ± 3.35 [a]
Glucose ($mmol \cdot L^{-1}$)				
PP	5.84 (1.62)	5.67 (1.35)	9.80 (4.25) [a]	9.87 (3.31) [a]
PC	5.41 (1.79)	5.72 (1.33)	12.10 (6.05) [a]	12.55 (6.07) [a]
CC	5.97 (1.37)	5.97 (1.46)	10.82 (2.45) [a]	10.80 (4.33) [a]
CP	6.44 (1.76)	5.94 (1.33)	9.54 (4.34) [a]	9.66 (3.31) [a]

PP, Placebo–Placebo; PC, Placebo–Caffeine; CC, Caffeine–Caffeine; CP, Caffeine–Placebo. T1—60 min after capsule ingestion. T2—immediately after TT performance. [a] Significant difference from baseline or/and T1 ($p < 0.05$). [b] Significant difference from PP ($p < 0.05$). [c] Significant difference from CP ($p < 0.05$).

4. Discussion

The results of the present study indicate that caffeine, when ingested by cyclists in a dose of 6 mg·kg^{-1} for 4 days, does not induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters. Furthermore, CC and PC showed improvements in time and in output power compared to CP and PP conditions, respectively. The physiological and metabolic responses such as an increase in heart rate, minute volume, expired O_2 fraction, blood lactate concentration (T2 and Recovery), and reduction in expired CO_2 fraction were similar in both withdrawal and 4-day supplementation conditions.

The cyclists in the present study who consumed caffeine acutely (CC and PC) had more output power in the first half of the TT test (Figure 3A). It can be explained by the effect of caffeine to pre-dispose the subject to perform tasks [4,12,15]. With this, the individuals achieved a significant improvement in the time of the TT test, indicating a potential ergogenic effect corroborating with previous studies [1,8]. The present findings are in agreement with the results of Irwin et al. [7]. They reported that acute caffeine intake (6 mg·kg^{-1} body mass of caffeine) significantly improves exercise performance, regardless of whether a period of withdrawal or consumption (3 mg·kg^{-1} body mass of caffeine) for 4 days is imposed on regular users of caffeine.

According to the authors [7], an explanation for the inability to influence the ergogenic potential of caffeine in their study would be the participants' usual consumption (3 mg·kg^{-1}·day^{-1}). In another study [8], the authors observed similar improvements in performance using a cross-sectional protocol, comparing low (58 ± 29 mg·day^{-1} or 0.80 mg·kg^{-1}·day^{-1}), moderate (143 ± 25 mg·day^{-1} or 1.90 mg·kg^{-1}·day^{-1}) and high (351 ± 139 mg·day^{-1} or 4.91 mg·kg^{-1}·day^{-1}) consumers, when administered in cyclists an acute dose of 6 mg·kg^{-1} body mass of caffeine. The plausible explanation for this finding indicates that the dose used for acute intake exceeded the average amount of caffeine about the usual consumption of low, moderate, and high consumers [8]. In our study, cyclists were moderate to high consumers, and the dose of 6 mg·kg^{-1} body mass of caffeine exceeded the average amount of usual caffeine consumption. Thus, in the present study, it was suggested that the improvement in performance is related to acute intake, regardless of habitual consumption and caffeine supplementation for 4 days.

A previous study by Graham and Spriet [16] concluded that an acute intake of 6 mg·kg^{-1} body mass of caffeine could cause saturation in hepatic metabolism and, consequently, the maintenance of caffeine blood concentration for a prolonged time. Therefore, we believe that the improvement in time (Figure 3B) observed in 85.71% (CC and PC) of cyclists (12 cyclists) may be associated with the maintenance of the blood caffeine concentration over time (~1 h 37 min) (Table 3). These results reinforce the notion that the use of this dose (6 mg·kg^{-1} body mass) may reduce interindividual metabolic responses [8].

Furthermore, evidence shows that an increase in primary caffeine metabolites (paraxanthine, theobromine, and theophylline) is due to caffeine metabolism, which may promote tolerance effects [15,17,18]. Because they have a higher affinity for adenosine receptors than caffeine [19], this could result in the higher development of tolerance to caffeine's ergogenic effects [9,10]. To reverse the effects of tolerance, the use of the caffeine withdrawal strategy, followed by the use of an acute dose, may result in the resensitization of adenosine receptors (A_{2A}/A_{2B}) [7,15]. However, in the present study, cyclists' blood caffeine concentrations (verified in acute intake) remained similar between trials (CC and PC) (Table 3), suggesting that the ergogenic effects observed in the CC and PC conditions were due to acute intake (use before the test). Previous evidence [7,15] suggested that withdrawal caffeine intake strategy a few days before the competition is needed to elicit an ergogenic effect of caffeine. However, the present data propose otherwise. It seems that athletes may (at least over the short-term) continue using caffeine before the competition.

The effects of acute caffeine intake appear to regulate blood cortisol and glucose concentrations during exercise [20,21]. From this perspective, elevated blood cortisol concentrations may stimulate gluconeogenesis in the liver and induce substantial increases in blood glucose levels. There is evidence

that caffeine acts by increasing cortisol secretion by increasing adrenocorticotropic hormone (ACTH) production in the pituitary [21], although the precise mechanisms still need to be characterized. The findings of the present study indicated that caffeine intake did not alter blood cortisol and glucose concentrations between experimental trials (Table 3). However, the increase in cortisol and glucose concentration observed at T2 and recovery (Table 3), regardless of caffeine intake, may be associated with exercise using intensities ≥40% of VO_2max [22], as shown in our results where cyclists reached an average intensity of approximately 70.61% of VO_2max.

The distribution of adenosine receptors throughout the peripheral tissues and the central nervous system suggests that caffeine may act directly or indirectly through multiple mechanisms. The findings of previous studies [23,24] showed higher HR responses during exercise, which is due to the ergogenic effects promoted by acute caffeine intake. These findings suggest that caffeine ingestion attenuates the brainstem response of the baroreflex due to metaboreflex activation caused by the accumulation of muscle metabolites (lactate, H^+, and P_i) as a result of increased muscle metabolism during exercise. Thus, we attributed the increase in HR to the high blood lactate concentrations observed after TT (T2 and recovery) (Table 3). It was then expected, due to changes in CNS responses and peripheral metabolism (metabolic muscle accumulation), that acute caffeine intake may reduce RPE [3]. In the present study, however, probably due to the exercise protocol used (TT) [25], this assumption was not observed (Table 2). According to the findings of the study [26] that investigated the effects of caffeine intake on neuromuscular fatigue, the reduction in RPE is strongly associated with the use of exercise protocols until exhaustion.

Adopting a high pacing strategy at the beginning of TT is the most commonly used form by cyclists expecting to increase fatigue tolerance [27]. However, success in using this strategy is reduced when many highly trained cyclists exhibit induced arterial hypoxemia (at sea level) at the beginning of exercise [28]. This phenomenon is explained by the delayed physiological response of integrated neural control, because the reduction in the ventilatory mechanism may negatively impact the release of O_2 to the muscles. Interestingly, Jones et al. [27] observed in cyclists that the reduction in the percentage of the mean response time of the ventilatory mechanism was significantly correlated ($r = 0.85$, $p < 0.05$) with the improvement in time to TT. Investigators [27,28] argue that the primary focus on reducing the effects of hypoxemia is associated with increased respiratory medullary complex stimulation. This evidence suggests that acute caffeine intake may increase the sensitivity of peripheral chemoreceptors to potentiate hyperventilation (minute ventilation) during exercise [28,29]. Thus, our findings indicate that the improvement in the partial pressure of alveolar oxygen (Figure 2D–F) induced by acute caffeine intake may be associated with an increase in the output power curve at the beginning of TT (Figure 3A).

In future studies, it should be encouraged to test whether the blinding procedure was effective. Asking participants to identify the supplement ingested, to test the efficacy of the blinding method, should be a great way to avoid bias in the analysis of the results [30]. The experimental design used in the present investigation presented some limitations that should be discussed for the correct application of the results. In the present study, the cycle ergometer was used to determine the ergogenic effects of caffeine under laboratory conditions. However, these results should be confirmed in additional research protocols, which use field tests (i.e., cycling competition or simulations) or assessments utilizing the athlete's bike, to transfer the findings of this investigation to coaches accurately. Other limitations of the present study are related to the interindividual variability observed in caffeine metabolism [17] and to the analysis of the expression of adenosine receptors in skeletal muscle tissue, given its up-regulation during chronic treatment with the use of caffeine [31]. According to Ribeiro et al. [1], genetic polymorphisms in related genes to caffeine metabolism, such as aryl-hydrocarbon receptor (AHR) and cytochrome P450 1A1 and 1A2 (CYP1A1-CYP1A2, Prenyl (Decaprenyl)), are a potential explanation for the variability in the ergogenic response to caffeine supplementation in trained athletes. Given these prior findings, it could be hypothesized that a higher metabolism would be advantageous for maximizing the ergogenic benefit of caffeine [18,32]. However, we were not able to evaluate the

polymorphisms in genes related to caffeine metabolism, which could minimize the impact on the interindividual variability of cyclists.

5. Conclusions

In conclusion, these results indicate that caffeine, when ingested by cyclists (moderate to high caffeine consumers) in a dose of 6 mg·kg^{-1} for 4 days, does not induce tolerance to the ergogenic effects promoted by acute intake on physiological, metabolic, and performance parameters. Furthermore, the ergogenic effects observed in the supplementation and withdrawal conditions for 4 days were due to acute intake, verified by a similar blood concentration of caffeine.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2072-6643/12/7/2101/s1, Figure S1: Disposition of study participants.

Author Contributions: Conceptualization, A.P.M. and F.S.-J.; Data curation, A.P.M. and F.S.-J.; Formal analysis, A.P.M. and F.S.-J.; Investigation, A.P.M. and F.S.-J.; Methodology, A.P.M. and B.G.R.; Project administration, B.G.R.; Resources, A.P.M. and T.B.; Software, F.S.-J.; Supervision, A.P.M. and B.G.R.; Validation, A.P.T.R.P.; Visualization, A.P.M., F.S.-J. and B.G.R.; Writing—original draft, A.P.M. and B.G.R.; Writing—review & editing, A.P.M., F.S.-J., T.B., A.P.T.R.P. and B.G.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001 and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Acknowledgments: The authors thank the cyclists from Macaé-RJ and Campos dos Goytacazes-RJ, cities. We also thanks, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES), the teacher Thiago Costa Leite, nutritionist Alessandra Alegre and students of nutrition from our laboratory.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ribeiro, B.G.; Morales, A.P.; Sampaio-Jorge, F.; Tinoco, F.S.; Matos, A.A.; Leite, T.C. Acute effects of caffeine intake on athletic performance: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Chil. Nutr.* **2017**, *44*, 283–291. [CrossRef]
2. Ribeiro, B.G.; Morales, A.P.; Sampaio-Jorge, F.; Barth, T.; De Oliveira, M.B.; Coelho, G.M.; Leite, T.C. Caffeine attenuates decreases in leg power without increased muscle damage. *J. Strength Cond. Res.* **2016**, *30*, 2354–2360. [CrossRef]
3. Potgieter, S.; Wright, H.H.; Smith, C. Caffeine improves triathlon performance: A field study in males and females. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **2018**, *28*, 228–237. [CrossRef]
4. Lopes, J.P.; Pliássova, A.; Cunha, R.A. The physiological effects of caffeine on synaptic transmission and plasticity in the mouse hippocampus selectively depend on adenosine A1 and A2A receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *166*, 313–321. [CrossRef]
5. Cox, G.R.; Desbrow, B.; Montgomery, P.G.; Anderson, M.E.; Bruce, C.R.; Macrides, T.A.; Martin, D.T.; Moquin, A.; Roberts, A.; Hawley, J.A.; et al. Effect of different protocols of caffeine intake on metabolism and endurance performance. *J. Appl. Physiol. (1985)* **2002**, *93*, 990–999. [CrossRef]
6. Bell, D.G.; McLellan, T.M. Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. *J. Appl. Physiol. (1985)* **2002**, *93*, 1227–1234. [CrossRef]
7. Irwin, C.; Desbrow, B.; Ellis, A.; O'Keeffe, B.; Grant, G.; Leveritt, M. Caffeine withdrawal and high-intensity endurance cycling performance. *J. Sports Sci.* **2011**, *29*, 509–515. [CrossRef]
8. Gonçalves, L.S.; Painelli, V.S.; Yamaguchi, G.; Oliveira, L.F.; Saunders, B.; Da Silva, R.P.; Maciel, E.; Artioli, G.G.; Roschel, H.; Gualano, B. Dispelling the myth that habitual caffeine consumption influences the performance response to acute caffeine supplementation. *J. Appl. Physiol. (1985)* **2017**, *123*, 213–220. [CrossRef]
9. Beaumont, R.; Cordery, P.; Funnell, M.; Mears, S.; James, L.; Watson, P. Chronic ingestion of a low dose of caffeine induces tolerance to the performance benefits of caffeine. *J. Sports Sci.* **2017**, *35*, 1920–1927. [CrossRef]

10. Lara, B.; Ruiz-Moreno, C.; Salinero, J.J.; Del Coso, J. Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210275. [CrossRef]
11. Wilk, M.; Krzysztofik, M.; Maszczyk, A.; Chycki, J.; Zajac, A. The acute effects of caffeine intake on time under tension and power generated during the bench press movement. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2019**, *16*, 8. [CrossRef]
12. Maughan, R.J.; Burke, L.M.; Dvorak, J.; Larson-Meyer, D.E.; Peeling, P.; Phillips, S.M.; Rawson, E.S.; Walsh, N.P.; Garthe, I.; Geyer, H.; et al. IOC consensus statement: Dietary supplements and the high-performance athlete. *Br. J. Sports Med.* **2018**, *52*, 439–455. [CrossRef]
13. Landrum, R.E. College students use of caffeine and its relationship to personality. *Coll. Stud. J.* **1992**, *26*, 151–155.
14. Borg, G. *Borg's Perceived Exertion and Pain Scales*; Human Kinetics: Champaign, IL, USA, 1998.
15. Van Soeren, M.H.; Graham, T.E. Effect of caffeine on metabolism, exercise endurance, and catecholamine responses after withdrawal. *J. Appl. Physiol. (1985)* **1998**, *85*, 1493–1501. [CrossRef] [PubMed]
16. Graham, T.E.; Spriet, L.L. Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine. *J. Appl. Physiol. (1985)* **1995**, *78*, 867–874. [CrossRef]
17. Guest, N.; Corey, P.; Vescovi, J.; El-Sohemy, A. Caffeine, CYP1A2 genotype, and endurance performance in athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2018**, *50*, 1570–1578. [CrossRef] [PubMed]
18. Pickering, C.; Kiely, J. Are the current guidelines on caffeine use in sport optimal for everyone? Inter-individual variation in caffeine ergogenicity, and a move towards personalised sports nutrition. *Sports Med.* **2018**, *48*, 7–16. [CrossRef]
19. Svenningsson, P.; Nomikos, G.G.; Fredholm, B.B. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 4011–4022. [CrossRef]
20. Hearris, M.A.; Hammond, K.M.; Fell, J.M.; Morton, J.P. Regulation of muscle glycogen metabolism during exercise: Implications for endurance performance and training adaptations. *Nutrients* **2018**, *10*, E298. [CrossRef]
21. Lovallo, W.R.; al'Absi, M.; Blick, K.; Whitsett, T.L.; Wilson, M.F. Stress-like adrenocorticotropin responses to caffeine in young healthy men. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1996**, *55*, 365–369. [CrossRef]
22. Hill, E.E.; Zacki, E.; Battaglini, C.; Viru, M.; Viru, A.; Hackney, A.C. Exercise and circulating cortisol levels: The intensity threshold effect. *J. Endocrinol. Investig.* **2008**, *31*, 587–591. [CrossRef]
23. Jammes, Y.; Joulia, F.; Steinberg, J.G.; Ravailhe, S.; Delpierre, S.; Condo, J.; Guieu, R.; Delliaux, S. Endogenous adenosine release is involved in the control of heart rate in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2015**, *675*, 667–675. [CrossRef]
24. Amann, M. Significance of group III and IV muscle afferents for the endurance exercising human. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2012**, *39*, 831–835. [CrossRef]
25. Passfield, L.; Coakley, S. Comparing time-trial and time to exhaustion performance. *J. Sci. Cycling* **2014**, *3*, 39.
26. Smirmaul, B.P.; de Moraes, A.C.; Angius, L.; Marcora, S.M. Effects of caffeine on neuromuscular fatigue and performance during high-intensity cycling exercise in moderate hypoxia. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2017**, *117*, 27–38. [CrossRef]
27. Jones, A.M.; Wilkerson, D.P.; Vanhatalo, A.; Burnley, M. Influence of pacing strategy on O_2 uptake and exercise tolerance. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **2008**, *18*, 615–626. [CrossRef]
28. Chapman, R.F.; Mickleborough, T.D. The effects of caffeine on ventilation and pulmonary function during exercise: An often-overlooked response. *Physician Sportsmed.* **2009**, *37*, 97–103. [CrossRef]
29. Grgic, J.; Diaz-Lara, F.J.; Del Coso, J.; Duncan, M.J.; Tallis, J.; Pickering, C.; Schoenfeld, B.J.; Mikulic, P. The effects of caffeine ingestion on measures of rowing performance: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients* **2020**, *12*, 434. [CrossRef]
30. Saunders, B.; de Oliveira, L.F.; da Silva, R.P.; de Salles Painelli, V.; Gonçalves, L.S.; Yamaguchi, G.; Gualano, B. Placebo in sports nutrition: A proof-of-principle study involving caffeine supplementation. *Scand. J. Med. Sci. Spor.* **2016**, *27*, 1240–1247. [CrossRef]

31. Ribeiro, J.A.; Sebastião, A.M. Caffeine and adenosine. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *20 S1*, S3–S15. [CrossRef]
32. Grgic, J.; Grgic, I.; Pickering, C.; Schoenfeld, B.J.; Bishop, D.J.; Pedisic, Z. Wake up and smell the coffee: Caffeine supplementation and exercise performance-an umbrella review of 21 published meta-analyses. *Br. J. Sports Med.* **2020**, *54*, 681–688. [CrossRef] [PubMed]

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

ANEXOS

ANEXO 1 Parecer do comitê de ética:

UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - CAMPUS MACAÉ

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da ingestão crônica e/ou aguda de cafeína na performance no teste contra-relógio em ciclistas

Pesquisador: Beatriz Gonçalves Ribeiro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 82002318.3.0000.5699

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Macaé

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.540.958

Apresentação do Projeto:

Protocolo apresentado por Beatriz Gonçalves Ribeiro, cujo objetivo é estudar o efeito da ingestão de cafeína em ciclistas. A cafeína vem sendo comumente utilizada de forma aguda antes de treinos ou competições. Os seus efeitos são decorrentes da sua ação direta no sistema nervoso central (estimulante) incrementando a capacidade física/ performance em diversos protocolos experimentais. A pesquisadora afirma que "uma lacuna ainda não elucidada na literatura científica diz respeito a eficácia da utilização de forma aguda e/ou crônica de cafeína, a qual poderia atenuar ou até mesmo reverter a interferência dos efeitos da realização de exercício submáximo na geração de força/potência muscular em uma mesma sessão de treinamento".

A casuística será composta por atletas que serão recrutados por meio de um banco de dados prévio do laboratório coordenado pela pesquisadora proponente (Laboratório de Pesquisa e Inovação em Ciências do Esporte – LAPICE), localizado no Polo Universitário da UFRJ – Campus Macaé. Serão recrutados 20 ciclistas do sexo masculino (18 anos de idade) que não possuam vínculos com associação esportiva. Os critérios de inclusão serão: a) experiência mínima de dois anos na modalidade e ter sido classificado entre os 10 primeiros lugares nas categorias das provas realizadas no estado do Rio de Janeiro; b) frequência de treinamento no mínimo 3 x por semana incluindo sessões de treinamentos técnicos e físicos; c) não serem usuários de esteróides anabólicos; d) atletas que consomem quantidades de cafeína 300 mg.dia. Serão excluídos atletas que apresentarem gastrite, hipertensos, lesões osteomioarticulares e os que não finalizarem o

estudo.

O procedimento experimental incluirá ensaios experimentais randomizados, duplo-cego, placebo-controlado cruzado. Os atletas farão quatro visitas ao LAPICE. A primeira visita avaliação dietética, avaliação antropométrica, avaliação cardiorrespiratória máxima (ACM) e familiarização com o teste contra-relógio no cicloergometro (TCR). As três visitas subsequentes serão os ensaios experimentais randomizados, duplo-cego, placebo-controlado cruzado. As condições experimentais envolverão suplementação crônica de placebo e/ou cafeína. Os atletas chegarão ao laboratório em jejum de 8h e sem praticarem exercícios físicos nas 24 horas anteriores ao dia do teste. Será coletada uma amostra de sangue no momento antes da ingestão das cápsulas (PRC). Uma segunda amostra de sangue será coletada 60 minutos após a ingestão das cápsulas (POC). Para avaliar a ingestão dietética calórica e de cafeína das 24 h antes da realização dos testes, será utilizado um recordatório alimentar e um questionário específico para avaliação do uso da cafeína. Após o POC os atletas executarão o protocolo de exercício submáximo (ES) e ao final será coletada outra amostra de sangue (PES). Após a coletada a amostra de sangue (PES) os atletas executarão o teste contra-relógio. Ao final e 10 minutos após serão coletadas outras amostras de sangue (PCR e PCR10). Os grupos experimentais corresponderão; placebo/placebo (PP), placebo/cafeína (PC) e cafeína/cafeína (CC). Será estabelecido um washout de no mínimo dois dias e no máximo cinco dias entre os ensaios experimentais. Todos os atletas selecionados como participantes da pesquisa serão instruídos a ingerir (dose única diária) as cápsulas de cafeína/placebo no mesmo horário (8h) do dia durante todos os quatro dias de suplementação. Os atletas serão monitorados por contato telefônico, e-mail e pessoalmente. De acordo com a pesquisadora responsável, os resultados do estudo contribuirão para a elaboração do planejamento dietético do nutricionista especialmente no tocante da suplementação de cafeína para a melhor compreensão do metabolismo bem como seu uso como recurso ergogênico no esporte.

Objetivo da Pesquisa:

GERAL: Investigar o efeito da ingestão crônica e/ou aguda de cafeína na performance no teste contra-relógio em ciclistas.

ESPECÍFICOS

- Estimar a ingestão dietética e medicamentosa de cafeína pelos atletas ciclistas.
- Identificar as variáveis antropométricas e a capacidade cardiorrespiratória máxima dos ciclistas.
-Comparar entre os grupos de ciclistas as variáveis cardiorrespiratórias e a taxa de oxidação de carboidratos e lipídios durante a execução do exercício submáximo.

- Comparar o tempo e a potência muscular alcançados no teste contrarrelógio dos ciclistas entre os ensaios experimentais com a ingestão crônica/aguda.
- Comparar entre os ensaios experimentais com os ciclistas as concentrações sanguíneas de lactato e cafeína durante a realização do protocolo experimental.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos estão bem descritos no protocolo de pesquisa e envolvem a coleta de amostra sanguínea e os testes de esforço submáximo e teste contra-relógio. Os riscos inerentes a coleta de sangue incluem desconforto, dor, hematoma, desmaio/reação vaso-vagal, ansiedade/medo, lesão de nervos, ou infecções no local de punção.

Na execução do teste de esforço submáximo e do teste contrarrelógio no cicloergômetro é informado que os riscos estão relacionados a tonturas, eventos cardiovasculares e/ou dores musculares tardias. A pesquisadora informa que o LAPICE e os pesquisadores estão preparados para minimizar os riscos, pois durante todo o experimento haverá uma equipe técnica da área de saúde treinada composta por Enfermeiro, Fisioterapeuta, Médico (cardiologista) e Profissionais de Educação Física a postos para prestar os primeiros socorros e que no laboratório onde serão realizados os testes encontram-se os equipamentos para primeiros socorros. Esses equipamentos estão listados na brochura da pesquisadora e incluem:

Equipamentos para as vias aéreas: Oxigênio; Bolsa de AMBU com válvula de Bicarbonato de sódio; Tubos para intubação orotraqueal de diferentes tamanhos.

Suporte e conjunto intravenosos: Seringas e agulhas para administração de medicamentos; Esparadrapo; Cardioversor/desfibrilador portátil; Equipamentos de proteção individual (luvas, óculos, etc); Adenosina; Amiodarona; Atropina; Adrenalina; Procainamida; Verapamil; Dopamina; Dobutamina; Lidocaína; Nitroglicerina (sublingual ou spray); Broncodilatadores; Soro fisiológico a 0,9%; Solução de glicose a 25% ou 50%.

Caso haja necessidade o participante da pesquisa será encaminhado em veículo particular para o Hospital Público de Macaé (HPM) onde receberá atendimento especializado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo está bem delineado e atende aos princípios éticos de autonomia, não-maleficência, beneficência e justiça. A pesquisadora apresenta o percurso metodológico a ser seguido. O grupo populacional a ser estudado e suas características estão bem descritos, incluindo os critérios de inclusão ou não no estudo. Os instrumentos de coleta de dados (questionários e recordatório alimentar) são adequadamente apresentados. A infraestrutura para a realização do estudo está devidamente comprovada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: adequada

Projeto Detalhado / Brochura Investigador: adequado

TCLE: adequado

Cronograma detalhado: adequado

Orçamento financeiro detalhado da pesquisa: adequado

Declaração da equipe do projeto: adequada.

Termo de compromisso do pesquisador: adequado

Declaração de manuseio material biológico: adequada

Termo de autorização de uso de imagem e depoimentos: adequado

Declaração de instituição e infraestrutura: adequada

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer anterior foram adequadamente respondidas. Desta forma, este CEP é de parecer favorável a aprovação do protocolo de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisadora deve apresentar relatório a este CEP após a conclusão do projeto em tela.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1060553.pdf	09/02/2018 19:00:28		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	revisado4.pdf	09/02/2018 18:58:27	Beatriz Gonçalves Ribeiro	Aceito
Outros	revisado3.docx	09/02/2018 18:57:46	Beatriz Gonçalves Ribeiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	revisado2.doc	09/02/2018 18:56:55	Beatriz Gonçalves Ribeiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	revisado1.docx	09/02/2018 18:55:15	Beatriz Gonçalves Ribeiro	Aceito
Outros	respostas.doc	09/02/2018 18:53:32	Beatriz Gonçalves Ribeiro	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	05/01/2018 18:52:35	Beatriz Gonçalves Ribeiro	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

MACAE, 13 de Março de 2018

Assinado por:
Rejane Correa Marques
(Coordenador)

ANEXO 2 Laudo da cafeína fornecida pela farmácia de manipulação

infinity pharma

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Cafeína Anidra	**Data de Análise:**	27-02-2018
Lote Interno:	18B07-B015-029720	**Lote Fabricante:**	CF/1730166(M-01)
Data de Fabricação:	01-06-2017	**Data de Validade:**	01-05-2022
Origem:	India	**Procedência:**	Brasil
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	**Ordem de Fracionamento:**	029720

DCB:	01642	**DCI:**	CAFFEINE
CAS:	58-08-2	**Peso Molecular:**	194,2
Fórmula Molecular:	C8H10N4O2		

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição *	Pó branco ou agulhas brilhantes brancas, geralmente emaranhado opaco, inodoro.	Conforme		USP - 40
Solubilidade *	Facilmente solúvel em clorofórmio; Ligeiramente solúvel em água e em álcool; Pouco solúvel em éter	Conforme		USP - 40
Identificação *	IV - O espectro da amostra está de acordo com o do padrão	Conforme		USP - 40
Identificação *	HPLC - O tempo de retenção da amostra corresponde ao tempo de retenção do padrão	Conforme		USP - 40
Perda por Dessecação *	<= 0,5 (60ºC/ 4 horas)	0,43	%	USP - 40
Resíduo por Ignição *	<= 0,1	0,08	%	USP - 40
Impurezas Relacionadas(HPLC) *	Impureza Individual <= 0,1	0,02	%	USP - 40
Impurezas Relacionadas(HPLC) *	Impureza Total <= 0,1	0,05	%	USP - 40
Solvente Residual *	Clorofórmio <= 60 ppm	Não detectado	ppm	USP - 40
Solvente Residual *	Ácido acético <= 5000 ppm	Conforme	ppm	USP - 40
Solvente Residual *	Ácido fórmico <= 5000 ppm	Conforme	ppm	USP - 40
Ensaio (HPLC) *	98,5 a 101,0 (base seca)	100,32	%	USP - 40
Controle Microbiológico				
Contagem total de aeróbios *	<= 1000	< 10	UFC/g	Fabricante
Contagem de Leveduras *	<= 100	< 10	UFC/g	Fabricante
Escherichia coli *	Ausente	Ausente		Fabricante
Staphylococcus aureus *	Ausente	Ausente		Fabricante
Salmonella sp *	Ausente	Ausente		Fabricante
Pseudomonas aeruginosa *	Ausente	Ausente		Fabricante
Candida Albicans *	Ausente	Ausente		Fabricante
Controle Final				

infinity pharma

2

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Cafeina Anidra	Data da Análise:	27-02-2018
Lote Interno:	18B07-B015-029720	Lote Fabricante:	CF/1730166(M-01)
Data de Fabricação:	01-05-2017	Data de Validade:	01-05-2022
Origem:	India	Procedência:	Brasil
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fracionamento:	029720

DCB:	01642	DCI:	CAFFEINE
CAS:	58-08-2	Peso Molecular:	194,2
Fórmula Molecular:	C8H10N4O2		

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	
Densidade Aparente *	Informativo (com compactação)	0,40	g/mL	MG

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Conclusão:

Aprovado (X)
Reprovado ( )

Responsável Técnico
João Paulo Sartin Mendes
CRF-GO: Nº 7355

Responsável Técnico Substituto
Olivia Neiva Mesquita Mendes
CRF-GO: Nº 5227

Responsável Técnico
Ana Ligia Boer Barbosa
CRF-SP: 72.656

Fim do Documento