Universidade Federal do Rio de Janeiro

ELABORAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E BIOACESSIBILIDADE DE UM GEL A BASE DA BETERRABA E AVALIAÇÃO DAS SUAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS.

MARINA FERNANDA DE ALMEIDA MORGADO

RIO DE JANEIRO

2017

Elaboração, Caracterização Nutricional e Bioacessibilidade de um Gel a Base da Beterraba e Avaliação das suas Propriedades Funcionais.

Marina Fernanda de Almeida Morgado

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadores: Thiago da Silveira Alvares e Anna Paola Trindade Rocha Pierucci

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2017

Elaboração, Caracterização Nutricional e Bioacessibilidade de um Gel a Base da Beterraba e Avaliação das suas Propriedades Funcionais.

Marina Fernanda de Almeida Morgado

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Banca examinadora:

_____

Prof. Dr. Thiago da Silveira Alvares
Prof. Adjunto do Instituto de Nutrição/UFRJ-Macaé
Orientador

_____

Prof[a]. Dr[a]. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci
Prof[a] Associado do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/INJC/UFRJ
Co-orientadora

_____

Prof[a]. Dr[a]. Mariana Costa Monteiro
Prof[a] Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/INJC/UFRJ
Revisora

_____

Prof. Dr. Carlos Adam Conte Júnior
Prof. Adjunto do Departamento de Tecnologia de Alimentos/Faculdade de Veterinária/UFF

_____

Dr. Igor Alexandre Fernandes
Pós-doutorando no Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017

Morgado, Marina Fernanda de Almeida.

Elaboração, Caracterização Nutricional e Bioacessibilidade de um Gel a Base da Beterraba e Avaliação das suas Propriedades Funcionais / Marina Fernanda de Almeida Morgado. Rio de Janeiro: UFRJ / INJC, 2017.

xii. 21f. il.

Orientadores: Thiago da Silveira Alvares e Anna Paola Pierucci. Dissertação (mestrado em nutrição humana) – UFRJ / INJC, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2017, 7.

1. Beterraba, nitrato e óxido nítrico. 2. Alterações vasculares causadas pelo envelhecimento. 3. Forma de apresentação da beterraba. 4. Beterraba e oxigenação muscular. 5. Beterraba e produção de força. 6. Beterraba e pressão arterial. I. Alvares, Thiago da Silveira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro / Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Elaboração, Caracterização Nutricional e Bioacessibilidade de um Gel a Base da Beterraba e Avaliação das suas Propriedades Funcionais.

Agradecimentos

Neste momento de realização pessoal e profissional, gostaria de agradecer aos colegas pesquisadores que participaram ativamente do projeto: Gustavo Vieira, Luiz Alberto Diniz e Victor Azevedo. Agradeço também à Mônica Volino e ao Elisaldo Mendes, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Prof. Dr. Carlos Conte, à Dra. Maria Lucia Guerra e à Profa. Dra. Anna Paola Pierucci, por me abrirem as portas do conhecimento em suas equipes. E principalmente ao Prof. Dr. Thiago Alvares pelo direcionamento do trabalho de pesquisa e amadurecimento científico.

Aos amigos Gusthavo Barbosa, Gláucio Gonçalves e Gabriela Brandão pelo constante apoio e estímulo nos momentos difíceis. E especialmente aos meus pais, Ranielle Lucas e Victor Sapienza, pela compreensão, respeito e incentivo em superar os obstáculos do mestrado.

Não menos importantes, os idosos voluntários do estudo devem ser lembrados. Os sorrisos estavam sempre presentes mesmo quando havia tristeza em seus corações. Cada um com uma história, esses foram os que me ensinaram a dar valor à vida, ao pão de cada dia e às oportunidades.

Resumo

Morgado, Marina Fernanda de Almeida. Elaboração, Caracterização Nutricional e Bioacessibilidade de um Gel a Base da Beterraba e Avaliação das suas Propriedades Funcionais. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Devido ao nitrato, a beterraba (*Beta vulgaris L.*) tem sido utilizada como estratégia para aumentar a produção *in vivo* de óxido nítrico (NO) e, consequentemente, a oxigenação tecidual. No entanto, quando comparado a outros vegetais, a beterraba não possui boa aceitação pela população. Dessa forma, novas formas de apresentação da beterraba, que tenham boa aceitação e que apresentem elevados teores de nitrato podem ser uma alternativa para aumentar a síntese do NO e melhorar os níveis de oxigenação tecidual. Portanto, o objetivo do presente estudo foi elaborar um gel à base de beterraba (GB) e determinar a capacidade antioxidante (CAT) e os teores de nitrato, potássio (K^+) e compostos fenólicos totais (FT) do gel elaborado, assim como as respectivas digestibilidades *in vitro* dos compostos. Além disso, foi avaliado o efeito da ingestão do GB sobre a oxigenação, volume sanguíneo, força muscular, pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) e excreção urinária de nitrato e nitrito em idosos. A composição centesimal foi realizada através de métodos oficiais, nitrato e nitrito foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência, CAT e FT por espectrofotometria, K^+ por fotômetro de chamas, PAS e PAD por monitor automático, força muscular por aparelho de preensão manual e oxigenação e volume sanguíneo muscular, através de espectroscopia do infravermelho próximo. O GB apresentou 76,1±0,5% de umidade, 3,2±0,3% de proteínas, 2,1±0,2% de resíduo mineral fixo, 0,52±0,05% de lipídeos totais, 9,1±0,7% de açúcares totais. Valores significativamente maiores de nitrato, CAT, FT e K^+ foram observados antes e depois da digestão *in vitro* do GB quando comparado ao suco da beterraba. Com relação às propriedades funcionais, o consumo do GB promoveu melhora significativa no tempo de reoxigenação muscular e volume sanguíneo após o exercício quando comparado ao consumo do gel placebo (PLA), reduzido em nitrato. Também foi observada redução significativa no declínio da força 30 minutos após o término do exercício na intervenção GB e aumento significativo na concentração urinária de nitrato e nitrito após a ingestão do GB. Não foi observada diferença significativa na PAS e PAD entre as duas intervenções. Os resultados sugerem que o produto desenvolvido, rico em nitrato, promove melhora da oxigenação e força muscular em idosos.

Palavras-chave: Nitrato; óxido nítrico; oxigenação muscular; idosos;

Abstract

MORGADO, Marina Fernanda de Almeida. Elaboration, Nutritional Characterization and Bioaccessibility of a beetroot-based nutritional gel and Evaluation of its Functional Properties. Rio de Janeiro, 2017. Dissertation (Master in Human Nutrition) - Institute of Nutrition Josué de Castro, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Due to nitrate, beetroot (*Beta vulgaris L.*) has been used as a strategy to increase the *in vivo* production of nitric oxide (NO) and, consequently, tissue oxygenation. However, when compared to other vegetables, beetroot does not have good acceptance by the population. Thus, new forms of beetroot presentation, which have good acceptance and presence of high levels of nitrate can be an alternative to increase NO synthesis and improve tissue oxygenation levels. Therefore, the objective of the present study was to elaborate a beetroot based nutritional gel (BG) and to determine the antioxidant capacity (TAC) and the levels of nitrate, potassium (K^+) and total phenolic compounds (TP) of the elaborated gel, as well as the respective in vitro digestibilities of the compounds. In addition, the effect of BG intake on oxygenation, blood volume, muscle strength, systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), and urinary excretion of nitrate and nitrite in elderly subjects were evaluated. The centesimal composition was performed by official methods, nitrate and nitrite were evaluated by high performance liquid chromatography, TAC and TP by spectrophotometry, K^+ by flame photometer, SBP and DBP by automatic monitor, muscle strength by handgrip apparatus and oxygenation and muscle blood volume through near infrared spectroscopy. BG presented 76.1±0.5% moisture, 3.2±0.3% protein, 2.1±0.2% fixed mineral residue, 0.52±0.05% total lipids, 9.1±0.7% of total sugars. Significantly higher values of nitrate, TAC, TP and K^+ were observed before and after in vitro digestion of BG when compared to beetroot juice. Regarding the functional properties, BG consumption promoted a significant improvement in muscle reoxygenation time and blood volume after exercise when compared to placebo (PLA) reduced nitrate intake. A significant reduction in strength decline was observed 30 minutes after the end of exercise in the BG group and a significant increase in the urinary concentration of nitrate and nitrite after BG intake. There was no significant difference in SBP and DBP between the two groups. The results suggest that the developed product, rich in nitrate, promotes improved oxygenation and muscle strength in elderly.

Keyboard: Nitrate; Nitric oxide; Muscle Oxygenation; Aging;

Lista de siglas e abreviaturas

CAET	Capacidade antioxidante equivalente a Trolox
CAT	Capacidade antioxidante total
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DC	Dobra cutânea
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
FC	Frequência cardíaca
FD	Fase duodenal
FT	Fenólicos totais
GB	Gel à base de beterraba
PLA	Gel placebo
hHb	Desoxi-hemoglobina
hMb	Desoxi-mioglobina
ND	Não digerido
NIRS	*Near infra-red spectroscopy*
O_2Hb	Oxi-hemoglobina
O_2Mb	Oxi-mioglobina
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
SB	Suco de beterraba
SD	S*tandard deviation* (desvio padrão)
SmO_2	Saturação de oxigênio muscular
tHb	Hemoglobina total ou volume sanguíneo
$\Delta SmO_{2½DT}$	Amplitude de saturação de oxigênio muscular em metade do tempo de desoxigenação
$\Delta SmO_{2½RT}$	Amplitude de saturação de oxigênio muscular em metade do tempo de reoxigenação
ΔtHb_{Ex}	Hemoglobina total ou volume sanguíneo durante o período de exercício
ΔtHb_{Rec}	Hemoglobina total ou volume sanguíneo durante o período de recuperação

Lista de figuras

Página

Figura 1 - Desenho experimental.....26

Apresentação

Visando a compreensão dos dados apresentados, a presente Dissertação foi dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo refere à caracterização nutricional de um gel à base de beterraba desenvolvido no laboratório bem como a investigação da composição proximal, da capacidade antioxidante e dos teores de nitrato, potássio e compostos fenólicos totais do gel de beterraba. Ainda no primeiro capítulo estão apresentados dados referentes aos efeitos da digestão *in vitro* sobre a capacidade antioxidante, nitrato, potássio e compostos fenólicos totais do gel de beterraba. O segundo capítulo refere sobre a oxigenação tecidual, volume sanguíneo, produção de força e pressão arterial sistólica e diastólica *in vivo*, avaliados em idosos, após ingestão do gel de beterraba.

Sumário

Página

1 Introdução 12
2 Revisão da literatura 133
2.1 Beterraba, nitrato e óxido nítrico 13
2.2 Alterações vasculares causadas pelo envelhecimento 14
2.3 Forma de apresentação da beterraba 15
2.4 Beterraba e oxigenação muscular 15
2.5 Beterraba e produção de força 16
2.6 Beterraba e pressão arterial 16
3 Justificativa 17
4 Capítulo 1. Desenvolvimento de um gel à base de beterraba contendo altos teores de nitrato dietético bioacessível e antioxidantes 18
4.1 Objetivo geral 18
4.2 Objetivos específicos 18
4.3 Metodologia 18
4.3.1 Preparo do gel a base de beterraba 18
4.3.2 Composição proximal do gel a base de beterraba 19
4.3.3 Determinação dos teores de açúcares no gel a base de beterraba 19
4.3.4 Determinação do teor de potássio no gel a base de beterraba 19
4.3.5 Determinação do teor de nitrato no gel a base de beterraba 20
4.3.6 Capacidade antioxidante total e análise de fenólicos totais no gel a base de beterraba 20
4.3.7 Digestão *in vitro* do gel a base de beterraba 21
4.3.8 Análise sensorial 22
4.3.9 Análise estatística 23
4.4 Resultados e discussão 23
4.5 Conclusão 23
5 Capítulo 2. O consumo de beterraba melhora a oxigenação do músculo do antebraço, volume sanguíneo e força em idosos 23
5.1 Objetivos gerais 24
5.2 Objetivos específicos 24
5.3 Metodologia 24
5.3.1 Voluntários 24

5.3.2 Desenho experimental 25
5.3.3 Preparo do gel à base de beterraba 27
5.3.4 Preparo do gel placebo 27
5.3.5 Intervenção nutricional 27
5.3.6 Controle dietético 27
5.3.7 Análise de nitrato e nitrito na urina 28
5.3.8 Análise da oxigenação e volume sanguíneo muscular 29
5.3.9 Teste de força 31
5.3.10 Protocolo de exercício 32
5.3.11 Mensuração da pressão arterial sistêmica e frequência cardíaca 32
5.3.12 Análise estatística 32
5.4 Resultados e discussão 32
5.5 Conclusão 33
6 Conclusão Geral 33
7 Referências Bibliográficas 33
ANEXO A 40
ANEXO B 49
ANEXO C 53
ANEXO D 55

1 Introdução

A beterraba (*Beta vulgaris L.*), um tubérculo pertencente à família *Chenopodiaceae* (TRANI; CANTARELLA; TRIVELLI, 2005), é considerada uma importante fonte dietética de nitrato (PETERSEN; STOLTZE, 1999). Esse, por sua vez, possui participação no metabolismo do óxido nítrico (NO). Esse gás é formado endogenamente, em situações de acidose ou hipóxia, atuando no relaxamento de células musculares lisas e promovendo, assim, vasodilatação (CASEY *et al.*, 2010).

Durante o envelhecimento ocorre o aumento da rigidez e da disfunção vascular e diminuição da biodisponibilidade do NO (RAMMOS *et al.*, 2014). Além disso, o fluxo sanguíneo está limitado (PARK *et al.*, 2015) e a passagem de sangue no lúmen dos vasos torna-se restrita, tornando menor a distribuição de nutrientes e oxigênio para os tecidos (GROOT *et al.*, 2013).

Estudos recentes demonstraram que a ingestão de suco de beterraba melhora a oxigenação. Kenjale *et al.* (2011) constatou que 12,9 mmol de nitrato dietético em suco de beterraba diminui o consumo de oxigênio, aumenta o volume sanguíneo em exercício, reduz a pressão arterial diastólica (PAD) durante exercício de panturrilha e também a pressão arterial sistólica (PAS) em recuperação de adultos e idosos com doença arterial periférica (KENJALE *et al.*, 2011). Corroborando com esses resultados, Curtis *et al* (2015) mostrou diminuição na extração de oxigênio e redução da PAD em exercício em ciclo ergômetro em idosos com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), através do consumo de 9,1 mmol de nitrato dietético proveniente de suco de beterraba. Ainda não foi encontrada diferença significativa na pressão arterial sistólica (PAS) e PAD utilizando gel à base de beterraba (~ 12 mmol de nitrato) em idosos (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Entretanto, o estímulo ao aumento do consumo do nitrato tendo a beterraba como fonte dietética é desafiador, posto que seus produtos não apresentam boa aceitação comparados a outros vegetais (HOBBS *et al.*, 2014). Dessa forma, um alimento pronto para o consumo, com boa aceitação, de fácil transporte e com maiores concentrações de nitrato que as fontes usuais, como o gel à base de beterraba (DA SILVA *et al.*, 2016), poderia atrair e beneficiar a população idosa, que possui o metabolismo do NO prejudicado.

Não se sabe, ainda, sobre o efeito do gel à base de beterraba sobre a oxigenação durante e após o exercício bem como sobre a alteração do volume sanguíneo em músculos do

antebraço, assim como na produção de força e na pressão arterial sistólica e diastólica de idosos.

Com base na necessidade do desenvolvimento do produto mencionado, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do gel à base de beterraba sobre a oxigenação, o volume sanguíneo, a força, a pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica. A hipótese deste estudo é que o gel pode melhorar os níveis de oxigenação e volume sanguíneo muscular, além de aumentar a força e reduzir a PAS e PAD de idosos.

2 Revisão da literatura

2.1 Beterraba, nitrato e óxido nítrico

A beterraba (*Beta vulgaris L.*) é um tubérculo pertencente à família *Chenopodiaceae* (TRANI; CANTARELLA; TRIVELLI, 2005), considerada importante fonte de nitrato dietético (PETERSEN & STOLTZE, 1999). Através da via nitrato-nitrito-óxido nítrico, o nitrato pode ser reduzido a oxido nítrico (NO) (WEBB *et al.*, 2008), que possui propriedade vasodilatadora (CASEY, 2010) e, portanto, é capaz de promover efeitos benéficos à saúde cardiovascular.

Através dessa via o nitrato ingerido é reduzido a nitrito na cavidade oral por bactérias facultativas que expressam a enzima nitrato redutase (DUNCAN *et al.*, 1995). No estômago, o pH ácido decompõe, de forma não enzimática, parte do nitrito a NO e outros óxidos de nitrogênio bioativos, que podem ser absorvidos até a primeira porção do intestino. Por ter meia-vida curta, o NO é rapidamente convertido a nitrato ou nitrito. Disponibilizado no sangue, o nitrato pode ser transportado até a boca para dar continuidade ao ciclo entero-salivar. Em situações de hipóxia, como acontece durante o exercício (BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, *et al.*, 2005), o nitrato e o nitrito podem ser reduzidos a NO (LUNDBERG *et al.*, 2008). O NO formado promove a vasodilatação através do relaxamento das células musculares lisas (CASEY, 2010), podendo, dessa forma, melhorar a distribuição de oxigênio para os tecidos e aumentar a produção aeróbia de adenosina trifosfato (ATP).

Estudos recentes demonstraram que a ingestão de suco de beterraba melhora a oxigenação. Kenjale *et al*. (2011) constatou que 12,9 mmol de nitrato dietético em suco de beterraba diminui o consumo de oxigênio, aumenta o volume sanguíneo em exercício, reduz a pressão arterial diastólica (PAD) durante exercício de panturrilha e também a pressão arterial sistólica (PAS) em recuperação de adultos e idosos com doença arterial periférica (KENJALE *et al.*, 2011). Corroborando com esses resultados, Curtis *et al.* (2015) mostrou diminuição no

consumo de oxigênio e redução da PAD em exercício em ciclo ergômetro em idosos com DPOC, através do consumo de 12,9 mmol de nitrato dietético proveniente de suco de beterraba. Ainda não foi encontrada diferença significativa na pressão arterial sistólica (PAS) e PAD utilizando gel à base de beterraba (~ 12 mmol de nitrato) em idosos (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Portanto, uma estratégia nutricional que poderia ser empregada visando o aumento do consumo dietético de nitrato, especialmente em populações que possuem menor biodisponibilidade do metabolismo do NO como os idosos, seria através da beterraba sob a forma de gel, que apresente boa aceitabilidade e seja de fácil consumo e transporte.

2.2 Alterações vasculares causadas pelo envelhecimento

Diferentes modificações vasculares são causadas durante o envelhecimento, podendo ser a nível metabólico, inflamatório e/ou estrutural. O conjunto de alterações ocorridas caracteriza a disfunção endotelial (RAMMOS *et al.*, 2014; SINDLER *et al.*, 2014), condição que prejudica a distribuição de oxigênio e provoca variações hemodinâmicas que incluem o aumento da PA (DONATO *et al.*, 2015).

Alterações estruturais provocados pelo aumento da produção de colágeno e fragmentação da elastina alteram o tônus vascular (DONATO *et al.*, 2015). Além disso, o aumento da inflamação, através da expressão de proteínas sinalizadoras (interleucinas 1 e 6, interferon gama e fator de necrose tumoral α), o aumento do estresse oxidativo provocado por desequilíbrio entre enzimas (NADPH oxidase e superóxido dismutase) e disfunção mitocondrial, prejudicam as vias de formação de NO e, dessa forma, contribuem para a disfunção vascular dos idosos (SINDLER *et al.*, 2014).

Óxido nítrico sintase é um conjunto de enzimas responsável pela produção endógena de NO. Devido ao envelhecimento, há redução do seu substrato L-arginina e oxidação do seu cofator tetrahidrobiopterina (RECKELHOFF *et al*., 1994). Ademais, inibidores da síntese do NO como dimetil-arginina-assimétrica também estão aumentados (BODE-BOGËR; SCALERA; IGNARRO, 2007), comprometendo a produção do NO no idoso. Logo, o quadro de disfunção pode ser piorado, visto que ocorreria relaxamento de células musculares lisas e vasodilatação ineficientes em situação de hipóxia, como o exercício (GROOTH *et al.*, 2013), prejudicando até mesmo as atividades diárias.

Com base nas informações acima, o envelhecimento é acompanhado de várias alterações vasculares que prejudicam a produção de óxido nítrico. Portanto, estudos que

propõem reverter ou amenizar o estado de disfunção endotelial são de suma importância para a saúde cardiovascular desses indivíduos.

2.3 Forma de apresentação da beterraba

O aumento do consumo de nitrato a partir da beterraba como fonte dietética é desafiador, posto que seus produtos não possuem boa aceitação quando comparados aos outros vegetais (HOBBS *et al.*, 2014). Ademais, alimentos oferecidos na forma de gel tendem a ter maiores concentrações de nutrientes em menores volumes, além de serem mais fáceis de transportar, poderem ser armazenados a temperatura ambiente e serem de fácil ingestão.

Um alimento de boa aceitação produzido com o intuito de promover efeitos benéficos à saúde cardiovascular, como o gel à base de beterraba (MORGADO *et al.*, 2016), poderia atrair e beneficiar àqueles que possuem baixa biodisponibilidade do metabolismo do NO, podendo ser uma estratégia para melhorar o perfil vascular de idosos.

2.4 Beterraba e oxigenação muscular

Através de espectroscopia do infravermelho próximo (*near infra-red spectroscopy* - NIRS), McCully *et al.* (1994) mostraram que o tempo para ressaturação muscular de oxigênio pós-exercício de flexão plantar foi menor em jovens quando comparado com idosos saudáveis (21,5 s *vs* 26,9 s). Devido ao menor fluxo sanguíneo (PARK *et al.*, 2015) e da menor distribuição de oxigênio em idosos, pode haver desoxigenação mais rápida pelos músculos (DELOREY; PATERSON; KOWALCHUK, 2007) e resaturação de oxigênio mais lenta em recuperação do exercício. Tais alterações prejudicam o desempenho aeróbico dos idosos e, consequentemente, a execução de atividades diárias.

Além disso, Kenjale *et al.* (2011) mostraram, através de NIRS, melhora de oxigenação e menor consumo de oxigênio após a ingestão de 500 mL de suco de beterraba contendo 9,1 mmol de nitrato, aferido no músculo gastrocnêmico em resposta a exercício máximo cardiopulmonar em esteira em adultos e idosos com doença arterial periférica. Tais resultados demonstram que a suplementação dietética de nitrato foi capaz de melhorar o perfil de oxigenação em indivíduos com disfunção vascular.

Os efeitos da ingestão de uma única dose de produtos à base de beterraba sobre a oxigenação exclusivamente na população idosa foram pouco estudados. Espera-se, dentre outros benefícios, que com o aumento da distribuição de oxigênio provocado pela ingestão do

GB, o tempo para dessaturação de oxigênio muscular em exercício aumente e que o tempo de ressaturação em recuperação diminua, melhorando a condição aeróbica da população.

2.5 Beterraba e produção de força

Durante o envelhecimento há queda de força nos membros superiores e inferiores (LYNCH *et al.*, 1999), o que dificulta a movimentação dos idosos. Entretanto, existem poucos estudos na literatura avaliando consumo de nitrato dietético sobre a produção da força e não foram encontrados, até o momento, pesquisas com essa população.

Em contrações voluntárias máximas o principal sistema de energia utilizado é o fosfagênio, que utiliza o grupamento fosfato da fosfocreatina (PCr) para produção de adenosina trifosfato (ATP), para interagir com os filamentos musculares actina e miosina (WEBBER; MURRAY, 1973). Foi demonstrado em estudo anterior que adultos mais velhos possuem menores concentrações de PCr (SMITH *et al.*, 1998), o que pode estar relacionado com a queda da força em idosos (MCMAHON; JENKINS, 2002), limitando a produção de ATP.

Entretanto, evidências mostram que o nitrato dietético é capaz de aumentar a regeneração de PCr aumentando a razão P/O (produção de ATP por átomo de oxigênio), além de diminuir o custo de ATP para produção de força em adultos saudáveis (BAILEY *et al*., 2010).

Baseado nas informações acima, a suplementação de nitrato dietético está envolvida com complexos mecanismos de sinalização celular, metabólicos e fisiológicos que agem sinergicamente para produção de força em indivíduos idosos, podendo ser utilizada como uma estratégia para melhora da força nessa população.

2.6 Beterraba e pressão arterial

Durante o envelhecimento ocorrem diversas alterações no sistema cardiovascular. Principalmente devido ao aumento da resistência vascular periférica, há aumento da PAS e PAD (MENDES *et al.*, 2008), o que requer estratégias nutricionais para seu controle. Poucos são os estudos que reportam efeitos anti-hipertensivos em uma única dose de produtos a base de beterraba e ainda mais escassos os realizados em idosos.

Webb *et al.* (2008) mostraram redução significativa da PAS e PAD em 10,4 mmHg e 8,0 mmHg, respectivamente, em adultos saudáveis, após ingestão de dose única de 500 mL de

suco de beterraba contendo 22,5 mmol de nitrato. Estudo realizado com normotensos mostrou que a ingestão de suco de beterraba promoveu queda dose dependente na PAS e PAD. A ingestão de 100 mL, 250 mL e 500 mL do SB contendo, respectivamente, 2,3 mmol, 5,7 mmol e 11,4 mmol nitrato promoveu a redução da PAS na ordem de 13,1 mmHg, 20,5 mmHg e 22,2 mmHg e da PAD na ordem de 16,6 mmHg, 14,6 mmHg e 18,3 mmHg. O efeito da ingestão de pão enriquecido com 100 mL de suco de beterraba também foi avaliado e foi observada redução na PAS e PAD na ordem de 23,6 mmHg e 23,2 mmHg, respectivamente (HOBBS *et al.*, 2012).

Até o momento, os estudos que avaliaram os efeitos da ingestão de única dose de SB sobre a PA de idosos, investigaram indivíduos com DPOC. O consumo de SB, contendo 12,9 mmol de nitrato, promoveu a redução significativa na PAS de 12 mmHg (KERLEY *et al.*, 2015) e na PAD entre 1,6 mmHg a 7,0 mmHg (CURTIS *et al.*, 2015; KERLEY *et al.*, 2015). Não foi encontrada diferença significativa na PA de idosos com fatores de risco para doenças cardiovasculares pós-consumo de gel à base de beterraba (~10 mmol de nitrato) (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Levando em consideração que os produtos à base de beterraba anteriormente estudados apresentaram diferentes efeitos na pressão arterial contendo concentrações de nitrato próximas ao gel elaborado, seria relevante elucidar se GB contendo aproximadamente 12 mmol de nitrato poderia reduzir a pressão arterial de idosos, podendo, dessa forma, contribuir para a melhora da qualidade de vida da população.

3 Justificativa

Devido às mudanças demográficas de envelhecimento populacional, estudos como esse são necessários para promover estratégias visando melhora da qualidade de vida dessa população. Devido às alterações estruturais, bioquímicas, metabólicas e fisiológicas do envelhecimento, há diminuição da oxigenação e da força, inversamente ocorre aumento da pressão arterial (PA), prejudicando a execução de atividades diárias e ocupacionais. Portanto, estratégias para a melhora da hemodinâmica a partir da suplementação da beterraba, podem reverter tais modificações. A maioria dos estudos publicados até a presente data investigou os efeitos do suco da beterraba em indivíduos saudáveis. Apesar de já ter sido mostrado o efeito do suco sobre a microcirculação da panturrilha e pressão arterial de adultos e idosos com doença arterial periférica, o presente estudo propõe avaliar os efeitos de uma alternativa mais concentrada em nitrato, um gel à base de beterraba, fácil de armazenar a temperatura

ambiente, de transportar e de boa aceitabilidade, durante e após execução de exercício do antebraço, além de avaliar seu efeito sobre a força muscular e pressão arterial.

4 Capítulo 1. Desenvolvimento de um gel à base de beterraba contendo altos teores de nitrato dietético bioacessível e antioxidantes

4.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo geral produzir um gel à base de beterraba, caracterizar sua composição e avaliar a digestibilidade dos seus principais componentes *in vitro.*

4.2 Objetivos específicos

- Preparar um gel alimentício rico em nitrato, elaborado a base da beterraba;
- Determinar a composição centesimal, o teor de nitrato, de potássio e de compostos fenólicos totais e avaliar a capacidade antioxidante total do gel elaborado a base de beterraba;
- Avaliar o efeito da digestão *in vitro* do gel de beterraba sobre o teor de nitrato, potássio, compostos fenólicos totais e sobre a capacidade antioxidante total;
- Avaliar a aceitação sensorial do gel de beterraba, comparando com o suco de beterraba.

4.3 Metodologia

4.3.1 Preparo do gel a base de beterraba

Beterrabas convencionais (*Beta vulgaris* L.) foram adquiridas na cidade do Rio de Janeiro (Sudeste do Brasil - 22 540 S 43 100 W). Dois quilos de beterraba foram lavados em água corrente, higienizados com solução clorada (80 ppm durante 20 min) e separados em quatro lotes diferentes (500 g cada), cada lote foi composto de três beterrabas cruas. Cada lote foi colocado em liquidificador-centrífuga (Modelo CE700, Black & Decker, Baltimore, MD). O sumo resultante (229,9 mL; 46% de rendimento) foi centrifugado (10000 *g*, 10 min; Modelo 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) para remover as partículas sólidas. Após centrifugação o sobrenadante foi separado e seco em um secador de pulverização (Buchi 190, Buchi Laboratoriums Technik AG, Flawil, Suíça) para obter um pó de beterraba (27,9 g; 5,6% de rendimento). Para produzir o gel de beterraba (100g), ~1 beterraba foi higienizada

com solução clorada (80 ppm durante 20 min) e colocada em liquidificador-centrífuga para obter-se o suco. Em seguida, 80 mL de SB foram misturados com 16,2 g do pó de beterraba, 2,8 g de carboximetilcelulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 1 mL de essência artificial sabor laranja. Os ingredientes foram misturados até ser obtida a consistência de gel e armazenados em refrigerador entre 4ºC e 8ºC. Para realizar as análises descritas abaixo, quatro amostras diferentes a partir de cada lote foram separadas e analisadas em triplicata.

4.3.2 Composição proximal do gel a base de beterraba

Os teores de umidade, gordura total, proteína bruta e resíduo mineral fixo foram determinados no gel de beterraba de acordo com o protocolo de análise descrito na AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*, 2012). Os resultados foram expressos em g/100 g (base em peso seco e úmido).

4.3.3 Determinação dos teores de açúcares no gel a base de beterraba

Sacarose, frutose e glicose no GB foram analisadas em triplicata diretamente após diluição e centrifugação (10000 *g*, 10 min; Modelo 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) do gel. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e 20 ml de cada amostra foram imediatamente injetados em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os teores de açúcares foram determinados de acordo com metodologia descrita por Hernández *et al.* (1998), com algumas modificações.

Curva de calibração externa foi utilizada para quantificar os teores de sacarose (0 a 10 mg/mL), frutose (0 a 1 mg/mL) e glicose (0 a 0,5 mg/mL) do GB. Os padrões comerciais foram analisados em pelo menos seis níveis de concentração. A equação de regressão linear foi obtida através da representação gráfica da concentração do padrão e da área do respectivo composto. Boa correlação foi obtida (sacarose: R^2=0,999, frutose: R^2=0,998 e glicose: R^2=0,997). Para expressar o teor de açúcares totais a soma dos teores de sacarose, frutose e glicose foi realizada. Todos os resultados foram expressos em g/100 g.

4.3.4 Determinação do teor de potássio no gel a base de beterraba

O teor de potássio no GB foi analisado por meio de um fotômetro de chamas fotoelétrico (910 MS, Analyser, São Paulo, Brasil). As amostras foram diluídas e

centrifugadas a 10000 *g* durante 10 min (Modelo 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e imediatamente aspirado por fotômetro de chama fotoelétrica. O teor de potássio presente na amostra do GB foi calculado comparando com uma solução padrão de cloreto de potássio. Os resultados foram expressos em g/100 g.

4.3.5 Determinação do teor de nitrato no gel a base de beterraba

O nitrato no GB foi analisado em triplicata diretamente após diluição e centrifugação a ~19700 *g* por 10 min (Modelo 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Os teores de nitrato foram determinados de acordo com metodologia descrita por Croitoru (2012) com algumas modificações. A identificação e a quantificação do nitrato foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A separação cromatográfica dos analitos foi obtida utilizando-se uma coluna de CLAE de fase reversa C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm, Discovery®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) acoplada a uma coluna de guarda C18 (5 µm, 50mm x 4,6 mm, Ascentis®, Sigma-Aldrich). A fase móvel constituiu de eluição isocrática composta de 2,5 mm de brometo de tetrabutilamonio (pH 2,0) e acetonitrila (90:10; *v*/*v*) utilizando-se fluxo de 1,5 mL/min. O eluente foi monitorado a 222 nm.

O nitrato foi quantificado usando curva de calibração externa através da matriz da amostra com nitrato de sódio (0 a 4 mmol/L), em um mínimo de seis níveis de concentração. Cada concentração foi analisada no sistema de CLAE e a equação de regressão linear foi obtida através da representação gráfica da concentração do padrão e da área do composto. Boa correlação foi obtida (R^2=0,999). Os resultados foram expressos em mmol/100 g.

A fim de testar a recuperação do analito após os procedimentos de extração, diferentes concentrações (0,5 e 10 mmol/L) de soluções-padrão foram adicionadas na amostra. Cada pico de concentração foi analisado em triplicata, incluindo um ensaio em branco para avaliar as recuperações médias.

4.3.6 Capacidade antioxidante total e análise de fenólicos totais no gel a base de beterraba

A capacidade antioxidante do gel de beterraba foi avaliada através do ensaio TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) conforme metodologia descrita por Deng *et al.* (2013). Solução estoque do radical 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

(ABTS) foi realizada pela reação entre persulfato de potássio (2,45 mmol/l) e ABTS (7 mmol/l) numa proporção de 1:1 (*v*:*v*), e em seguida, incubadas no escuro à temperatura ambiente durante 16 h e utilizado dentro de 2 dias. 100 µL da amostra foram misturados a 3,8 ml de solução de trabalho de ABTS, incubados à temperatura ambiente e, após 6 minutos, a leitura da absorbância foi realizada a 734 nm. A percentagem de inibição da absorbância a 734 nm foi calculada e os resultados foram expressos como equivalentes de Trolox µmol/100 g.

A determinação do teor de fenólicos totais (FT) foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, tal como descrito anteriormente (Singleton & Rossi 1965), com algumas modificações. Resumidamente, as amostras (5g) foram homogeneizadas com 20 mL de metanol e centrifugadas (10000 *g*, 15 min a 4 °C, Modelo 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Antes da análise, 500 µL do sobrenadante foram misturados com 300 µL de peróxido de hidrogênio 1,5 M para oxidar os compostos interferentes. A mistura foi levada ao vortex e sujeita ao ensaio de Folin-Ciocalteu. Para isso, 15 µL da mistura de amostra foram diluídas com 240 µL de água destilada em 96 poços de microplacas e foram adicionados 15 µL de 0,25 N de reagente Folin-Ciocalteu e 30 µL 1N de carbonato de sódio. A mistura foi incubada durante 2 h e a leitura da absorbância foi realizada a 765 nm. Curva padrão de ácido gálico foi utilizada para a quantificação, e os resultados foram expressos como mg equivalentes de ácido gálico por 100 g (mg equivalentes de ácido gálico/100 g).

4.3.7 Digestão *in vitro* do gel a base de beterraba

Análise de nitrato, potássio, capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais foram repetidas após a digestão *in vitro* do GB a fim de estimar suas bioacessibilidades. O experimento de digestão *in vitro* também foi realizado com o SB visando a comparação da matriz alimentar. O modelo de digestão *in vitro* foi realizado de acordo com Wootton-Beard & Ryan (2011) com algumas modificações. Resumidamente, 5 g de GB ou 5 mL de SB foram misturados com solução salina de Hanks (com $NaCO_3$, sem vermelho de fenol, esterilizado por filtração, Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) para ajustar um volume final de 20 mL e incubar com 1 mL de alfa-amilase (240 KNU-T/g, Termamyl® 2x, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) a 37°C durante 10 min, ajustada a pH 2,0 com 1 mL de uma preparação de pepsina porcina (0,04 g de pepsina em 1 mL 0,1 M HCl) e incubou-se o conjunto a 37° C num banho de água com agitação a 90 RPM durante 1 h. Depois da fase gástrica (FG), uma alíquota de cada amostra foi armazenada a -20°C. O pH foi aumentado para 5,3 com

bicarbonato de sódio 0,9 M seguido da adição de 200 µL de sais biliares glicodesoxicolato (0,04 g em 1 mL de solução salina), taurodesoxicolato (0,025 g em 1 mL de solução salina), taurocolato (0,04 g em 1 mL de solução salina) e 100 mL de pancreatina (0,04 g em 500 mL de solução salina). O pH de cada amostra foi aumentado para 7,4 com NaOH 1M. As amostras foram incubadas num banho de água com agitação a 95 RPM a 37°C durante 2h para completar a fase duodenal (FD) do processo de digestão *in vitro*. Depois da FD, 500 µL de alíquota de cada amostra foi armazenada a -20°C. Os brancos foram preparados com produtos químicos idênticos, mas sem amostras e foram submetidos às mesmas condições.

4.3.8 Análise sensorial

As características sensoriais do GB (amostra B) foram comparadas com o SB (amostra A). Essa comparação foi efetuada visto que o consumo de SB tem sido amplamente utilizado em estudos de ensaios clínicos. Para a análise sensorial, os consumidores foram selecionados sem lesões ou doenças na boca, bem como os participantes que não usaram qualquer droga que afetam sensação sensorial, principalmente, gosto e cheiro. Teste hedônico sensorial das amostras foi realizado de acordo com Stone & Sidel (1998) por um grupo de 41 consumidores não treinados (31 do sexo feminino, 10 do sexo masculino) com idade entre 21 e 87 anos (40,3 ± 18,6 anos). Os consumidores avaliaram os atributos: aroma, cor, sabor e aceitação global de cada amostra com base na escala hedônica de 9 pontos (1 = “desgostei extremamente”; 9 = “gostei extremamente”). A intenção de compra também foi avaliada pelos consumidores, utilizando uma escala hedônica de 5 pontos (1 = “certamente não compraria”; 5 = “certamente compraria”). Os testes sensoriais foram realizados em cabines individuais na parte da manhã (09:00-10:30 da manhã), sob luz branca. Para verificar a aceitabilidade das amostras testadas, um fator de aceitação (AF) (DUTCOSKY, 1996) usando critérios padronizados foi calculado para avaliar cada atributo sensorial analisado:

$$AF = A \times 100 \times B^{-1}$$

Onde A é o valor médio obtido para cada atributo e B é o valor médio máximo para cada atributo. Todos os testes sensoriais foram realizados de acordo com os padrões éticos da Declaração de Helsinque e foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé (protocolo #51853315.1.0000.5699), Macaé - RJ, Brasil.

4.3.9 Análise estatística

Os dados foram expressos como médias ± desvio padrão (SD). Um teste t não pareado foi utilizado para identificar diferenças no conteúdo de análise proximal e açúcares entre GB e SB. Um teste t pareado foi utilizado para identificar diferenças nas diferenças percentuais nas FG e FD em relação ao ND em nitrato, potássio, teor de FT e CAT no GB e SB. Um teste two-way ANOVA com medidas repetidas foi utilizado para identificar as diferenças em nitrato, sódio, potássio, CAT e FT entre GB e SB nas fases não digerido (ND), gástrica (FG) e duodenal (FD). One-way ANOVA foi utilizado para identificar diferenças nos atributos sensoriais avaliados (aroma, cor, sabor e aceitação global) e nos escores de intenções de compra entre GB e SB. Quando um F significativo foi encontrado, foram realizados testes post-hoc adicionais com ajuste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em nível de confiança 0,05. Todas as análises foram realizadas usando um pacote estatístico disponível no mercado (IBM SPSS Estatísticas versão 22 para Mac, Chicago, IL).

4.4 Resultados e discussão

Estudo original anteriormente publicado: *Development of a beetroot-based nutritional gel containing high content of bioaccessible dietary nitrate and antioxidants*. Referência da publicação: *Int J Food Sci Nutr, 67(2), 153-160, 2016* (**Anexo A**).

4.5 Conclusão

Ainda que tenham sido vastamente explorados os estudos que avaliam o consumo de suco de beterraba na saúde humana, os resultados decorrentes do presente trabalho sugerem que o gel a base de beterraba pode ser empregado como uma nova estratégia nutricional para aumentar a ingestão dietética de nitrato e que possui boa bioacessibilidade de antioxidantes e potássio. Além disso, o novo produto elaborado representa uma alternativa conveniente para o consumo de beterraba, visto que apresentou valor nutricional melhorado, boa aceitação sensorial e intenção de compra.

5 Capítulo 2. O consumo de beterraba melhora a oxigenação do músculo do antebraço, volume sanguíneo e força em idosos

5.1 Objetivos gerais

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da ingestão de um gel à base de beterraba sobre a oxigenação muscular, força muscular e pressão arterial de idosos.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da ingestão do gel de beterraba sobre alterações da oxigenação muscular e volume sanguíneo através da espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS);
- Avaliar o efeito da ingestão do gel de beterraba sobre a força muscular através do teste de contração voluntária máxima (CVM);
- Avaliar o efeito da ingestão do gel de beterraba sobre alterações na pressão arterial sistólica e diastólica;
- Determinar os metabólitos da síntese do óxido nítrico na urina dos voluntários após a ingestão do gel de beterraba.

5.3 Metodologia

5.3.1 Voluntários

Foram recrutados 120 voluntários através de eventos comunitários e cartazes distribuídos em todo o campus da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé – e do Centro de Convivência do Idoso da Prefeitura de Macaé. Os voluntários foram previamente selecionados por consulta telefônica e as visitas foram agendadas. Todos os participantes foram informados da natureza e da finalidade da pesquisa e forneceram consentimento por escrito para participar, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo B**).

Os critérios de inclusão abrangiam homens e mulheres com idade superior a 60 anos. Os critérios de exclusão incluíram: ser fumante, alérgico à beterraba, com glicemia em jejum elevada (> 100 mg/dL) e portador de doenças renal, hepática ou outras doenças agudas. Dessa forma, 94 voluntários foram excluídos. 28 por motivos pessoais, 13 por serem diabéticos, 7 por possuírem doenças pulmonares, 4 por apresentarem doenças hepáticas e 42 por possuírem menos que 60 anos de vida. Dessa forma, 26 voluntários iniciaram as visitas e foram randomizados.

Análises bioquímicas foram mensuradas em jejum de 8h para caracterização da população de estudo na visita de triagem. Coletas capilares foram realizadas com o auxílio de uma lanceta para análise de glicose, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicerídeos, uréia, creatinina, fosfatase alcalina, ácido úrico, amilase, bilirrubina, gama glutamil transferase, transaminase glutâmica oxalacética e transaminase glutâmica pirúvica. Para a mensuração desses indicadores foi utilizado um analisador bioquímico portátil por química seca com sistema de medição reflectométrica (Reflotron Plus®, Roche), utilizando tiras reativas específicas para cada analito.

Coleta de informações antropométricas também foi realizada para caracterização dos voluntários. Foram mensurados altura, por estadiômetro convencional; peso, percentual de massa magra e de gordura por balança de bioimpedância Omrom® e circunferência de cintura, por fita métrica convencional. A espessura da camada adiposa do antebraço – dobra cutânea (DC) – foi medida utilizando plicômetro (Lange, Beta Tecnologia, Santa Cruz, Califórnia).

Este estudo foi realizado de acordo com as orientações definidas na Declaração de Helsinki e todos os procedimentos que envolvem seres humanos foram aprovados pelo comitê de ética institucional da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé (protocolo # 51853315.1.0000.5699), Macaé - RJ, Brasil.

5.3.2 Desenho experimental

Trata-se de um estudo randomizado, duplo-cego, cruzado e controlado por placebo, onde todos os voluntários realizaram três visitas ao laboratório, no período entre 7 e 12 horas, com intervalo de uma semana entre elas.

Os voluntários foram orientados a realizar jejum de 8 horas, evitar o consumo de alimentos ricos em nitrato e nitrito (mais informações no item 5.3.6 e ANEXO C) e não utilizar antisséptico bucal. As etapas foram realizadas em um ambiente silencioso com temperatura controlada (22 a 25 °C). Após o término de cada visita, todos receberam lanche, composto por biscoitos, torrada, requeijão, café, frutas e suco.

Na primeira visita os voluntários foram informados sobre os procedimentos experimentais do estudo. Além disso, foram coletados dados antropométricos e clínicos com posterior familiarização com o protocolo de exercício de preensão manual.

Conforme mostra a **Figura 1**, nas duas visitas subsequentes, após repouso de 10 min foram realizadas as medidas de base (T0) de PA e frequência cardíaca (FC). Posteriormente, para avaliar a força, foi medida a CVM e a urina foi coletada para realizar a determinação dos

teores de nitrato e nitrito. Em seguida, os voluntários foram randomizados entre as intervenções: (1) Ingestão de um gel à base da beterraba rico em nitrato ou (2) Ingestão de um gel controle pobre em nitrato (PLA).

Novas medições de PA e FC foram realizadas após 90 min (T90) e 180 min (T180) da intervenção, e coletas de urina em T90, 150 min (T150) e em T180. Medições da CVM foram realizadas em T150 e T180. O exercício rítmico de preensão manual começou aproximadamente em T150 e durou cerca de 10 min.

A coleta de urina em T0 tem por objetivo confirmar se os voluntários seguiram as orientações de jejum e alimentação pobre em nitrato e nitrito 24h antes da visita, possibilitando o controle de vieses no estudo. Através dos dados de pressão arterial, força e urina pré e pós-consumo dos géis torna-se possível comparar alterações dos analitos mensurados e consequentemente os efeitos do consumo dos géis. As análises em T90 foram realizadas para acompanhamento. Em T150 foram realizadas analises de oxigenação, força e urina. Em T150 e T180 eram esperados aumentos da oxigenação e produção de força devido aos picos urinários de nitrato e nitrito, que variam entre 2 e 3h após o consumo de produtos à base de beterraba (Hobbs et al., 2012; Oliveira et al., 2016), sugerindo a absorção e bioconversão do nitrato dietético presente no BG. Por fim, em T180 era esperada recuperação de PCr aumentando a produção de força, assim como redução da pressão arterial no grupo que consumiu GB.

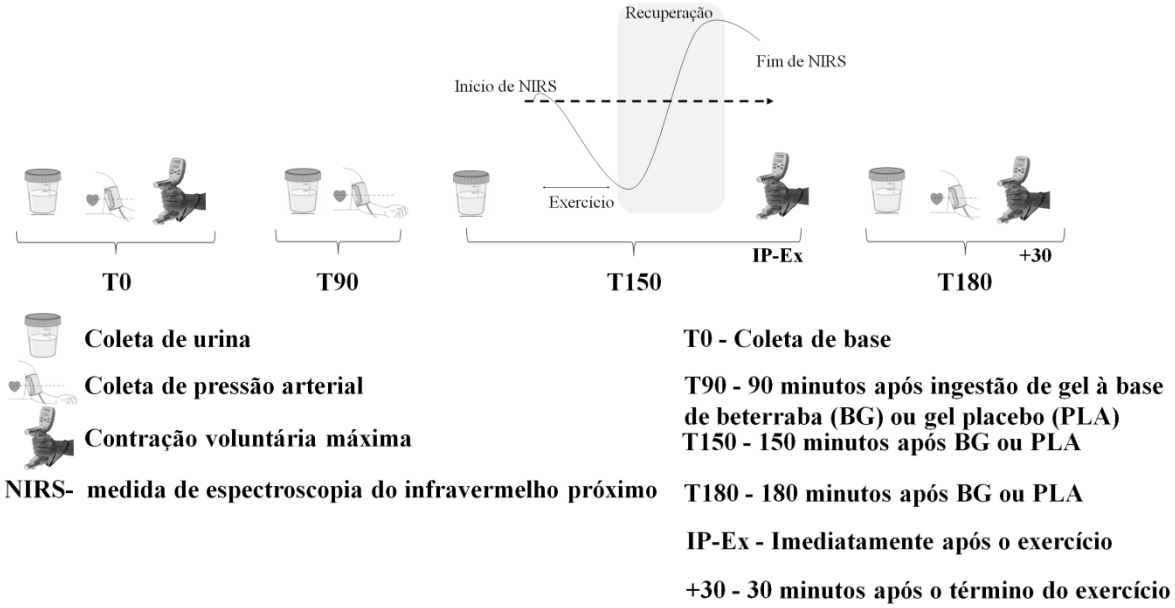


Figura 1. Desenho experimental utilizado no estudo.

5.3.3 Preparo do gel à base de beterraba

O preparo do gel a base de beterraba foi descrito no primeiro capítulo da dissertação, tópico 4.3.1, página 18.

5.3.4 Preparo do gel placebo

O gel PLA foi elaborado utilizando polpa de maçã ralada, da variedade Fugi, como componente principal. As maçãs foram adquiridas na cidade do Rio de Janeiro (Sudeste do Brasil - 22° 54'S 43° 10'W). Dois quilos de maçã foram lavados em água corrente, higienizados com uma solução de cloro 80 ppm por 20 min e separados para retirada manual da casca e posterior maceração por ralador. A fim de produzir SB, as beterrabas foram colocadas em um liquidificador centrífuga (Modelo CE700, Black & Decker, Baltimore, MD). O sumo resultante foi misturado com resina de troca iônica (Purolite®, Bala Cynwyd, PA) e mantido sob agitação durante 2 horas, a fim de empobrecer o SB de nitrato. Para produzir 100 g de gel PLA, ~75,5 g de maçã ralada foram misturadas com ~21 mL de SB resinado, 2,3 g de carboximetilcelulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0,55 mL de essência de laranja (Arcolor, São Paulo, Brasil) e 0,63 mL de corante líquido carmim (Corantec, São Paulo, Brasil). Os ingredientes foram misturados até ser obtida a consistência desejada, afim de parecer em cor, sabor e textura com o gel à base de beterraba, para que suas diferenças sensoriais não fossem percebidas entre os voluntários.

5.3.5 Intervenção nutricional

Todos os indivíduos ingeriram 100 g do GB ou 100 g do gel PLA, pobre em nitrato, em formas idênticas acompanhados de 400 mL de água deionizada. O conteúdo de nitrato do GB e do gel PLA consumidos pelos voluntários do presente estudo foi, respectivamente, 12,2 ± 0,18 mmol/100 g e 0,02 ± 0,02 mmol/100 g.

5.3.6 Controle dietético

No dia anterior às visitas os voluntários foram orientados a evitar alimentos ricos em nitrato e nitrito. Foi distribuída uma lista (**Anexo C**) com os alimentos a serem evitados durante esse período, como beterraba, espinafre, aipo, couve, abóbora, rúcula e alface, carnes

vermelhas (porco, cordeiro, carneiro e fígado), queijos maturados, embutidos, feijões e peixes (GANGOLLI *et al.*, 1994). Bebidas alcoólicas, refrigerantes à base de cola e chás com cafeína como os de folhas de *Camelia sinensis* (preto, verde, branco e *oolong*) e *Ilex paraguariensis* (chá mate) (HECK; MEJIA, 2009) foram incluídos na lista para evitar alterações na PA.

5.3.7 Análise de nitrato e nitrito na urina

Nitrato e nitrito urinários foram determinados como descrito por Croitoru (2012), usando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método utilizado determina nitrito utilizando a reação de Griess e detecta nitrato diretamente utilizando sua absorbância UV. Ambos os ânions podem ser detectados na mesma corrida através de dois diferentes comprimentos de onda.

Nitrito é um produto final derivado da oxidação metabólica de NO e foi utilizado no presente estudo como um indicador de bioconversão a NO. As medições foram feitas em T0, T90, T150 e T180 após a ingestão de um dos géis. Nitrito de sódio e nitrato de sódio foram usados para a quantificação, e os resultados foram expressos em $mmol.mmol^{-1}$ de creatinina para nitrato e $\mu mol.mmol^{-1}$ de creatinina para nitrito.

A separação cromatográfica dos analitos foi obtida utilizando-se uma coluna de CLAE de fase reversa C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm, Discovery®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) acoplada a uma coluna de guarda de fase reversa C18 (5 µm, 50mm x 4,6 mm, Ascentis®, Sigma-Aldrich), fase móvel foi composta de brometo de 2,5 mm de tetrabulilamônio (pH 2,0) e acetonitrila utilizando fluxo isocrático a 1 mL/min e monitorado por detector de fotodiodos (absorbância 222 nm nitrato e 520 nm nitrito).

Para o preparo da fase móvel (2,5 mM de brometo de tetrabutilamônio) foi preparada uma solução estoque de 1M. Para isso, 3,22g de brometo de tetrabutilamônio foram adicionados em tubo tipo *Falcon* (15mL), que posteriormente foi avolumado em 10 mL com H_2O deionizada. 2,5 mL da solução estoque foram passados para balão volumétrico de 1L e o pH foi ajustado para 2,5 com ~60µL de ácido sulfúrico. H_2O deionizada foi utilizada para avolumar.

Para curva padrão de nitrato, foi preparada solução estoque 200 mM. 0,68g de nitrato de sódio foram pesados em tubo tipo *Falcon* (50mL) e esse foi avolumado em 40 mL com H_2O deionizada. 200 µL dessa solução estoque foram pipetados em 9,8mL de H_2O deionizada para formar uma segunda solução estoque de 4mM. Diluições foram realizadas até alcançar

solução com concentração de 0mM. Cada solução estoque preparada teve 100 µL adicionados em *vial* e identificados.

Para curva padrão de nitrito, foi preparada solução estoque de 200 mM. 0,55g de nitrito de sódio foram pesados em tubo tipo *Falcon* (50 mL) e esse foi avolumado com H_2O deionizada até a marcação dos 40 mL. 50µL dessa solução foram diluídos em 9,950 µL de H_2O deionizada. Diluições foram realizadas até alcançar solução com concentração de 0mM. Cada solução estoque preparada teve 100 µL adicionados em *vial* e identificados.

Em seguida, a amostra foi preparada para ser analisada. 100 µL de urina foram pipetados em tubo e 900 µL de H_2O deionizada foram adicionados. Em outro tubo (1,5 mL), 200 µL de amostra diluída foram adicionados de 200 µL de acetonitrila e centrifugados por 10 minutos a ~19700 *g* para desproteinização.

Para análise do nitrato, 150 µL do sobrenadante da amostra e de fase móvel foram levados ao Vortex, tiveram 100 µL adicionados em *vial* e depois levados ao CLAE.

Para análise do nitrito, o ambiente foi escurecido e tubos cor âmbar foram utilizados. 1mL do reagente de Griess A e B foram colocados em diferentes tubos e identificados para evitar contaminação com solução estoque.

Foi pipetado 150µL de sobrenadante da amostra e de fase móvel em tubo, adicionado de 30 µL de solução estoque Griess A com intervalo de 1 min para adição da solução B. 100 mL da solução resultante foram postos no *vial* e foram injetados em CLAE.

Os coeficientes de variação (n=5, em duplicata) dos métodos de análise de nitrato e nitrito foram, respectivamente, 1,1%, 1,7%, intra-ensaio e 2,7% e 3,6% interensaio.

5.3.8 Análise da oxigenação e volume sanguíneo muscular

Para análise da oxigenação muscular, foi utilizada a técnica da espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS), um sistema de ondas contínuas que usa ambos os métodos de espectroscopia espacialmente resolvida e a lei de Lambert-Beer modificada. O dispositivo foi posicionado na face anterior do antebraço, no músculo flexor radial do carpo, e envolvido por uma faixa elástica de modo a prevenir o deslocamento e a distorção do sinal causada pela luz ambiente. Como NIRS pode ser influenciado pela gordura corporal, o ponto foi identificado para garantir a mesma localização do sensor em todos os testes. A média das dobras cutâneas dos idosos (9,0 ± 5,1 mm) foi menor que a capacidade de penetração das ondas do dispositivo (aproximadamente 25 mm), garantindo que os dados fossem gravados corretamente.

O equipamento foi calibrado de acordo com as especificações do fabricante antes de cada teste. NIRS foi ligado a um computador através de Bluetooth para aquisição de dados (10 Hz), conversão de dados e posterior análise. Os dados foram analisados usando o software original (Oxysoft version 2.1.6; Artinis Medical Systems), que pode calcular mudanças na absorção de luz em diferentes cumprimentos de onda (750 a 850 nm), e converte estes dados a concentrações de oxi/desoxi hemoglobina e oxi/desoxi mioglobina utilizando a lei de Lambert-Beer modificada para corrigir a dispersão da luz nos tecidos. O pico de absorbância para hHb (desoxi-hemoglobina) + mHb (desoxi-mioglobina) ocorre a 760 nm, enquanto que para a O_2Hb + O_2Mb ocorre a 850 nm. A diferença de absorbância entre os comprimentos de onda indica o balanço entre a distribuição e a remoção de oxigênio nos vasos sanguíneos locais. O coeficiente de variação interensaio foi de 2,11±2,93% e intraensaio foi de 1,82±1,58%, aferidos em mensurações basais.

As variáveis do NIRS analisadas foram:

1) Saturação de oxigênio muscular (SmO_2): medida absoluta correspondente à saturação de oxigênio no tecido muscular, proveniente do equilíbrio dinâmico entre a oferta e consumo de O_2 no volume muscular investigado (FERRARI; MUTHALIB; QUARESIMA, 2011), foi calculado através da equação $SmO_2 = (O_2Hb/tHb)*100$ e mensurada em 0 (baseline), 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 s de exercício e de recuperação do exercício.

2) Amplitude da saturação de oxigênio muscular mínima (ΔSmO_{2min}): corresponde à diferença entre o mínimo de SmO_2 durante o exercício até a média de SmO_2 do baseline (30 últimos segundos precedentes ao exercício).

3) Amplitude da saturação de oxigênio muscular máximo (ΔSmO_{2max}): corresponde à diferença entre o máximo de SmO_2 durante a recuperação do exercício até a média de SmO_2 do baseline.

4) Amplitude da saturação de oxigênio muscular em metade do tempo de desoxigenação ($SmO_{2½DT}$): corresponde ao tempo necessário para SmO_2 atingir 50% da diferença entre o máximo de saturação muscular (baseline) e o mínimo (SmO_{2min}). Refere-se ao período do tempo do início das contrações musculares até o valor mínimo de saturação de oxigênio nos tecidos, dividido por dois, somado à saturação mínima de oxigênio, calculado através da fórmula $SmO_{2½DT} = (Sm_{O2max} – SmO_{2min})/2 + SmO_{2min}$.

5) Amplitude da saturação de oxigênio muscular em metade do tempo de reoxigenação ($\Delta SmO_{21/2RT}$): corresponde ao tempo necessário para SmO_2 atingir 50% da diferença entre o início da recuperação (relaxamento) até a saturação máxima dos tecidos (SmO_{2max}) do período de recuperação (ROBERTS *et al*, 2015; FERRARI; MUTHALIB; QUARESIMA, 2011).

$\Delta SmO_{2½RT}$ corresponde ao período de tempo desde o início do relaxamento até o máximo de saturação de oxigênio, dividido por dois e somados à saturação mínima de oxigênio. É calculado através da fórmula $\Delta SmO_{21/2RT} = (SmO_{2max} - SmO_{2min})/2 + SmO_{2min}$.

6) Volume sanguíneo (tHb): corresponde ao balanço de volume sanguíneo formado pela soma das HHb e O_2Hb. Foi mensurado no baseline, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 segundos de exercício e de recuperação do exercício. Adicionar no período de exercício e no período de recuperação.

7) Amplitude do volume sanguíneo em exercício (ΔtHb_{Ex}): Diferença entre o máximo e o mínimo de tHb no período de exercício.

8) Amplitude do volume sanguíneo em recuperação do exercício (ΔtHb_{Rec}): Diferença entre o máximo e o mínimo de tHb no período de recuperação do exercício.

5.3.9 Teste de força

Para essa avaliação foi utilizado dinamômetro de preensão manual digital (JAMAR, modelo 5030J1, Sammons Preston Roylan, Bolingbrook, IL, EUA), que afere a CVM do braço dominante dos voluntários. Os indivíduos foram avaliados sentados com o ombro levemente aduzido, a cabeça em posição média em relação ao corpo e virada para frente. O cotovelo fletido a 90°, o antebraço e o punho em posição neutra, com o tamanho da pegada definido através da formação do ângulo reto na porção média do dedo médio, conforme preconiza a Beam and Adams (2014). A medida foi registrada para padronização nos futuros testes.

Os participantes realizaram três CVM com 30 s de descanso entre elas, em três diferentes tempos de coleta de dados: baseline, 1 minuto após o protocolo de exercício (IP-Ex) e aproximadamente 30 min após o exercício (+30). A maior medida das três CVM de cada tempo de coleta foi selecionada. A força foi registrada em kg e convertida em newtons multiplicando o valor em kg por 9.8067. Os valores de resistência foram expressos em newtons e ajustados pelo peso corporal de cada indivíduo. Os voluntários foram orientados a não bloquear a respiração durante a execução do exercício e a realizar o máximo de força após ouvir as instruções do operador.

5.3.10 Protocolo de exercício

Anteriormente ao teste, a CVM de cada indivíduo foi determinada utilizando aparelho de preensão manual descrito anteriormente no item 5.3.9. O exercício foi realizado pelos músculos do antebraço dominante de cada voluntário. Esses se posicionaram deitados na posição supina em maca hospitalar e realizaram exercício dinâmico por 1 minuto seguido de 1 minuto de recuperação (120 contrações/min, 0,5/s contraído e 0,5/s relaxado), utilizando aparelho de preensão manual hidráulico em 30% da CVM. Os voluntários foram orientados a não parar de fazer o exercício até o comando oral do operador.

5.3.11 Mensuração da pressão arterial sistêmica e frequência cardíaca

As variáveis hemodinâmicas (FC, PAS e PAD) foram avaliadas após 10 minutos de repouso em todas as três visitas ao laboratório em T0, T90, e T180. A PA foi monitorada utilizando um monitor de pressão arterial automático (Bp791it, Omron Co., Tokyo, Japan).

5.3.12 Análise estatística

A normalidade, homogeneidade das variâncias e esfericidade dos dados foram examinadas com os testes de Shapiro-Wilk, Levene e Mauchly, respectivamente. O teste t pareado foi utilizado para identificar diferenças nos parâmetros de oxigenação muscular (ΔSmO_{2min}, ΔSmO_{2max}, $\Delta SmO_{2½DT}$, $\Delta SmO_{2½RT}$) entre as intervenções GB e PLA. Utilizou-se teste two-way ANOVA com medidas repetidas para identificar diferenças de SmO_2, tHb, força muscular do antebraço, nitrito e nitrato urinários, PAS e PAD entre intervenção (GB e PLA) *vs* tempo. Quando foi encontrado um F significativo, foram realizados testes post-hoc adicionais com ajuste de Bonferroni. A significância estatística foi estabelecida no nível de confiança de 0,05. Todas as análises foram realizadas utilizando um pacote estatístico comercialmente disponível (IBM SPSS Statistics versão 23 para Mac, Chicago, IL), e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (SD).

5.4 Resultados e discussão

Estudo original anteriormente submetido à publicação no *Journal of nutrition, health & aging (under review): Beetroot consumption improves forearm muscle oxygenation, blood volume and strength in older adults* (**Anexo D**).

5.5 Conclusão

Esse é o primeiro trabalho que investigou os efeitos de uma única dose de um gel nutricional à base de beterraba rico em nitrato dietético, na oxigenação muscular, no volume sanguíneo e força em idosos. Os resultados do presente estudo sugerem que o consumo do gel de beterraba melhora o estado de oxigenação muscular em idosos ao aumentar a extração de O_2 muscular durante o exercício de preensão manual e acelera o tempo de oxigenação muscular durante a recuperação do exercício, revertendo o prolongamento da reoxigenação relacionado à idade, assim como prevenindo o declínio da força. Além disso, o gel à base de beterraba apresentado aqui pode ser uma boa estratégia nutricional para incentivar o consumo de vegetais em idosos, a fim de melhorar a bioconversão a NO.

6 Conclusão Geral

O gel à base de beterraba apresentado nesse estudo é uma alternativa conveniente para o aumento do consumo de nitrato dietético a partir de vegetais, melhorando o valor nutricional da beterraba. Além de ser fonte de nitrato, o gel apresenta boa bioacessibilidade de seus principais constituintes, como nitrato, potássio, fenólicos totais e antioxidantes, assim como possui boa aceitação e intenção de compra. Os dados indicam melhora da biodisponibilidade do metabolismo do NO a partir da ingestão do gel e sugerem atenuação da disfunção endotelial ocasionada pelo envelhecimento, mostrados a partir do aumento da excreção de nitrato e nitrito na urina. Por conta disso, foi observada melhora da oxigenação, menor tempo para recuperação da oxigenação muscular pós-exercício de antebraço e redução da queda de força pós-exercício, podendo contribuir para a execução de atividades diárias e ocupacionais e melhorando a qualidade de vida de idosos.

7 Referências Bibliográficas

AOAC International. Official methods of analysis of AOAC. Association of Official Analytica Chemists International. 2012.19th ed.

AUCOUTURIER, Julien *et al*. Effect of dietary nitrate supplementation on tolerance to supramaximal intensity intermittent exercise. **Nitric Oxide**, v. 49, p. 16-25, 2015.

BAILEY, Stephen J. *et al*. Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. **Journal of applied physiology**, v. 109, n. 1, p. 135-148, 2010.

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

BARRETO, Ricardo de L.; CORREIA, Carlos Roque D.; MUSCARÁ, Marcelo N. Nitric oxide: properties and therapeutic use. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.

BEAM, William; ADAMS, Gene. **Exercise physiology laboratory manual**. McGraw-Hill Higher Education, 2013.

BODE-BÖGER, Stefanie M.; SCALERA, Fortunato; IGNARRO, Louis J. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. **Pharmacology & therapeutics**, v. 114, n. 3, p. 295-306, 2007.

BOUSHEL, Robert *et al*. Muscle metabolism from near infrared spectroscopy during rhythmic handgrip in humans. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 79, n. 1, p. 41-48, 1998.

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

BRIZENDINE, Jared Todd *et al*. Skeletal muscle metabolism in endurance athletes with near-infrared spectroscopy. **Med Sci Sports Exerc**, v. 45, n. 5, p. 869-75, 2013.

CASEY, Darren P. *et al*. Acute dietary nitrate supplementation enhances compensatory vasodilation during hypoxic exercise in older adults. **Journal of Applied Physiology**, v. 118, n. 2, p. 178-186, 2015.

CASEY, Darren P. *et al*. Nitric oxide contributes to the augmented vasodilatation during hypoxic exercise. **The Journal of physiology**, v. 588, n. 2, p. 373-385, 2010.

CHANCE, Britton *et al*. Recovery from exercise-induced desaturation in the quadriceps muscles of elite competitive rowers. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 262, n. 3, p. C766-C775, 1992.

CONLEY, Kevin E. *et al*. Ageing, muscle properties and maximal O2 uptake rate in humans. **The Journal of Physiology**, v. 526, n. 1, p. 211-217, 2000.

CROITORU, Mircea Dumitru. Nitrite and nitrate can be accurately measured in samples of vegetal and animal origin using an HPLC-UV/VIS technique. **Journal of Chromatography B**, v. 911, p. 154-161, 2012.

CURTIS, Katrina J. *et al*. Acute dietary nitrate supplementation and exercise performance in COPD: a double-blind, placebo-controlled, randomised controlled pilot study. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0144504, 2015.

DA SILVA, Davi Vieira Teixeira *et al*. Physicochemical, nutritional, and sensory analyses of a nitrate-enriched beetroot gel and its effects on plasmatic nitric oxide and blood pressure. **Food & nutrition research**, v. 60, 2016.

DE OLIVEIRA, Gustavo Vieira *et al*. A single dose of a beetroot-based nutritional gel improves endothelial function in the elderly with cardiovascular risk factors. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 301-308, 2016.

DELOREY, Darren S.; PATERSON, Donald H.; KOWALCHUK, John M. Effects of ageing on muscle O2 utilization and muscle oxygenation during the transition to moderate-intensity exercise. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, n. 6, p. 1251-1262, 2007.

DENG, Gui-Fang *et al*. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. **Journal of functional foods**, v. 5, n. 1, p. 260-266, 2013.

DONATO, Anthony J. *et al*. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 89, p. 122-135, 2015.

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

DUTCOSKY, S. D. Métodos sensoriais. **DUTCOSKY, SA Análise sensorial de**, 1996.

FERGUSON, Scott K. *et al*. Impact of dietary nitrate supplementation via beetroot juice on exercising muscle vascular control in rats. **The Journal of physiology**, v. 591, n. 2, p. 547-557, 2013.

FERRARI, Marco; MUTHALIB, Makii; QUARESIMA, Valentina. The use of near-infrared spectroscopy in understanding skeletal muscle physiology: recent developments. **Phil. Trans. R. Soc. A**, v. 369, n. 1955, p. 4577-4590, 2011.

GANGOLLI, Sharat D. *et al*. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. **European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 292, n. 1, p. 1-38, 1994.

GILCHRIST, Mark *et al*. Effect of dietary nitrate on blood pressure, endothelial function, and insulin sensitivity in type 2 diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 89-97, 2013.

L, H. Jonathan *et al*. Perfusion pressure and movement-induced hyperemia: evidence of limited vascular function and vasodilatory reserve with age. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 304, n. 4, p. H610-H619, 2013.

HAMAOKA, Takafum *et al*. A new method for the evaluation of muscle aerobic capacity in relation to physical activity measured by near-infrared spectroscopy. In: **Integration of medical and sports sciences**. Karger Publishers, 1992. p. 421-429.

HANADA, A. *et al*. Dissociation between muscle metabolism and oxygen kinetics during recovery from exercise in patients with chronic heart failure. **Heart**, v. 83, n. 2, p. 161-166, 2000.

HEARON, Christopher M.; DINENNO, Frank A. Regulation of skeletal muscle blood flow during exercise in ageing humans. **The Journal of physiology**, 2015.

HECK, C. I. *et al*. Teas and tea-based functional beverages. **Functional and speciality beverage technology**, p. 396, 2009.

HERNÁNDEZ, JF Martirena *et al*. Use of wastes of the sugar industry as pozzolana in lime-pozzolana binders: study of the reaction. **Cement and Concrete Research**, v. 28, n. 11, p. 1525-1536, 1998.

HOBBS, D. A. *et al*. The consumer acceptance of novel vegetable-enriched bread products as a potential vehicle to increase vegetable consumption. **Food Research International**, v. 58, p. 15-22, 2014.

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

ICHIMURA, Shiro *et al*. Age and activity status affect muscle reoxygenation time after maximal cycling exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 38, n. 7, p. 1277, 2006.

IGNARRO, Louis J.; NAPOLI, Claudio; LOSCALZO, Joseph. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide. **Circulation research**, v. 90, n. 1, p. 21-28, 2002.

KAPIL, Vikas *et al*. Dietary Nitrate Provides Sustained Blood Pressure Lowering in Hypertensive PatientsNovelty and Significance. **Hypertension**, v. 65, n. 2, p. 320-327, 2015.

KENJALE, Aarti A. *et al*. Dietary nitrate supplementation enhances exercise performance in peripheral arterial disease. **Journal of applied physiology**, v. 110, n. 6, p. 1582-1591, 2011.

KIRBY, Brett S. *et al*. Impaired Skeletal Muscle Blood Flow Control With Advancing Age in HumansNovelty and Significance. **Circulation research**, v. 111, n. 2, p. 220-230, 2012.

KUTSUZAWA, Tomoko *et al*. Effects of age on muscle energy metabolism and oxygenation in the forearm muscles. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 33, n. 6, p. 901-906, 2001.

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

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

LUNDBERG, Jon O.; WEITZBERG, Eddie; GLADWIN, Mark T. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature reviews Drug discovery**, v. 7, n. 2, p. 156-167, 2008.

LYNCH, N. A. *et al*. Muscle quality. I. Age-associated differences between arm and leg muscle groups. **Journal of Applied Physiology**, v. 86, n. 1, p. 188-194, 1999.

MASSCHELEIN, Evi *et al*. Dietary nitrate improves muscle but not cerebral oxygenation status during exercise in hypoxia. **Journal of applied physiology**, v. 113, n. 5, p. 736-745, 2012.

MCCULLY, K. K. *et al*. Relationships between in vivo and in vitro measurements of metabolism in young and old human calf muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 2, p. 813-819, 1993.

MCCULLY, K. K. *et al*. Simultaneous in vivo measurements of HbO2 saturation and PCr kinetics after exercise in normal humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 1, p. 5-10, 1994.

MCCULLY, Kevin K. *et al*. Identification of peripheral vascular disease in elderly subjects using optical spectroscopy. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 52, n. 3, p. B159-B165, 1997.

MCCULLY, Kevin K.; HALBER, Christopher; POSNER, Joel D. Exercise-induced changes in oxygen saturation in the calf muscles of elderly subjects with peripheral vascular disease. **Journal of gerontology**, v. 49, n. 3, p. B128-B134, 1994.

MENDES, Romeu; BARATA, JL Themudo. Envelhecimento e pressão arterial. **Acta Med Port**, v. 21, n. 2, p. 193-8, 2008.

MORGADO, Marina *et al*. Development of a beetroot-based nutritional gel containing high content of bioaccessible dietary nitrate and antioxidants. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 67, n. 2, p. 153-160, 2016.

NISOLI, Enzo *et al*. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 47, p. 16507-16512, 2004.

NISOLI, Enzo; CARRUBA, Michele O. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. **J cell sci**, v. 119, n. 14, p. 2855-2862, 2006.

NYBERG, Michael *et al*. Lifelong physical activity prevents an age-related reduction in arterial and skeletal muscle nitric oxide bioavailability in humans. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 21, p. 5361-5370, 2012.

ORNELAS, Ana Paula Rodrigues de Castro. Factors that affect the aged people food intake e a nutrição do idoso. **Revista de Nutricao**, v. 13, n. 3, p. 157-165, 2000.

PARK, Song-Young *et al*. The Impact of Age on the Vasodilatory Function of Human Skeletal Muscle Feed Arteries. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, p. ajpheart. 00716.2015, 2015.

PETERSEN, Annette; STOLTZE, Soren. Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market: content and intake. **Food Additives & Contaminants**, v. 16, n. 7, p. 291-299, 1999.

RAMMOS, Christos *et al*. Dietary nitrate reverses vascular dysfunction in older adults with moderately increased cardiovascular risk. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 15, p. 1584-1585, 2014.

RIKITAKE, Yoshiyuki; LIAO, James K. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. **Circulation research**, v. 97, n. 12, p. 1232-1235, 2005.

ROBERTS, Llion A. *et al*. Effects of cold water immersion and active recovery on hemodynamics and recovery of muscle strength following resistance exercise. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 4, p. R389-R398, 2015.

SMITH, Sinclair A. *et al*. Creatine supplementation and age influence muscle metabolism during exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 85, n. 4, p. 1349-1356, 1998.

STONE, Herbert; SIDEL, Joel L. Quantitative descriptive analysis: developments, applications and the future. **Food technology (USA)**, 1998.

TRANI, Paulo E.; CANTARELLA, Heitor; TIVELLI, Sebastião W. Produtividade de beterraba em função de doses de sulfato de amônio em cobertura. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 726-730, 2005.

UFLAND, Pierre *et al*. Muscle force recovery in relation to muscle oxygenation. **Clinical physiology and functional imaging**, v. 32, n. 5, p. 380-387, 2012.

VANAJAKSHI, V. *et al*. Optimization of a probiotic beverage based on Moringa leaves and beetroot. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1268-1273, 2015.

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

VAUGHAN, Roger A.; GANNON, Nicholas P.; CARRIKER, Colin R. Nitrate-containing beetroot enhances myocyte metabolism and mitochondrial content. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 6, n. 1, p. 17-22, 2016.

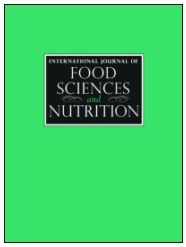
WEBB, Andrew J. *et al*. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. **Hypertension**, v. 51, n. 3, p. 784-790, 2008.

WEBER, Annemarie; MURRAY, John M. Molecular control mechanisms in muscle contraction. **Physiological reviews**, v. 53, n. 3, p. 612-673, 1973.

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

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

ANEXO A



International Journal of Food Sciences and Nutrition

ISSN: 0963-7486 (Print) 1465-3478 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/iijf20

Development of a beetroot-based nutritional gel containing high content of bioaccessible dietary nitrate and antioxidants

Marina Morgado, Gustavo Vieira de Oliveira, Julia Vasconcellos, Maria Lucia Monteiro, Carlos Conte-Junior, Anna Paola Trindade Rocha Pierucci & Thiago Silveira Alvares

To cite this article: Marina Morgado, Gustavo Vieira de Oliveira, Julia Vasconcellos, Maria Lucia Monteiro, Carlos Conte-Junior, Anna Paola Trindade Rocha Pierucci & Thiago Silveira Alvares (2016): Development of a beetroot-based nutritional gel containing high content of bioaccessible dietary nitrate and antioxidants, International Journal of Food Sciences and Nutrition

To link to this article: http://dx.doi.org/10.3109/09637486.2016.1147531

Published online: 17 Feb 2016.

Submit your article to this journal

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iijf20

Download by: [University of California Santa Barbara] Date: 18 February 2016, At: 05:03

INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCES AND NUTRITION, 2016
http://dx.doi.org/10.3109/09637486.2016.1147531

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

RESEARCH ARTICLE

Development of a beetroot-based nutritional gel containing high content of bioaccessible dietary nitrate and antioxidants

Marina Morgado[a], Gustavo Vieira de Oliveira[a], Julia Vasconcellos[b], Maria Lucia Monteiro[c], Carlos Conte-Junior[c], Anna Paola Trindade Rocha Pierucci[a] and Thiago Silveira Alvares[a]

[a]Nutrition Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, [b]Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, [c]Department of Food Technology, Fluminense Federal University, Niterói, Brazil

ABSTRACT
Beetroot, a food rich in nitrate and antioxidants has gained attention because of its potential effect on improving cardiovascular health and exercise performance. This work had the purpose of developing a beetroot-based nutritional gel (BG) and estimating the *in vitro* bioaccessibility of the nitrate, total antioxidant capacity (TAC), total phenolic (TP) and potassium content, as compared to beetroot juice (BJ). Nitrate was assessed by a high-performance liquid chromatography system, TAC was assessed using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay and TP was measured using the Folin–Ciocalteu method before and after an *in vitro* digestion. Significantly higher values of nitrate, TEAC, TP and potassium before and after digestion were observed in BG as compared to BJ. The results suggest a new nutritional strategy to give high contents of bioaccessible nutrients (nitrate, antioxidants and potassium) that are potentially relevant to improve cardiovascular health and exercise performance.

ARTICLE HISTORY
Received 7 October 2015
Revised 9 January 2016
Accepted 25 January 2016
Published online
18 February 2016

KEYWORDS
Bioaccessibility; dietary nitrate; functional food; supplements; vegetables

Downloaded by [University of California Santa Barbara] at 05:03 18 February 2016

Introduction

Beetroot is a vegetable of the Chenopodiaceae family, widely consumed in traditional western cooking. Recently, the consumption of beetroot juice (BJ), a food rich in nitrate and antioxidant, has gained attention in scientific literature because of the functional properties that are associated with this food, including its potential effect on improving cardiovascular health (Kapil et al. 2014,2015) and exercise performance (Jones 2014). This fact may be explained due to the possible effect of the nutrients present in beetroot that stimulate the synthesis of nitric oxide (Baião et al. 2015) but also may provide protection against oxidative cell damage (Sakihama et al. 2012).

Previous studies (Wootton-Beard & Ryan 2011; Wootton-Beard et al. 2011) have shown that BJ contains a high level of biologically accessible antioxidants as well as others nutrients such as sugars (mainly sucrose) and potassium. However, no data on nitrate bioaccessibility of beetroot-based nutritional gel (BG) has been published in the literature.

Foods in gel form tend to have higher concentrations of nutrients in a reduced volume, which favors greater access of the dietary nutrients to the cells. Furthermore, foods in gel form have the technological advantages of being easy to store at room temperature, easy to carry and easy to ingest and tolerate. Thereby, it is important to point out that convenience is a relevant marketing strategy in the food industry; thus, food manufacturers are looking for ways to make alternative, acceptable and healthy foods for the population from fruits and vegetables that are more convenient to consume.

Although the consumption of BJ has been widely explored, a BG is an innovative matrix for the population. Therefore, knowledge on the bioaccessibility of nitrate and antioxidants from BG is important to provide valuable information about the potential bioavailability of these nutrients for *in vivo* absorption. This work had the dual purpose of developing an innovative BG and estimating the *in vitro* bioaccessibility with simulated gastric (GP) and duodenal (DP) phases of the nitrate, total antioxidant capacity (TAC), total phenolics (TP) content and potassium that are present in the product, as compared with BJ. The nutritional composition, as well as sensorial evaluation (acceptance) of the BG, was also addressed.

CONTACT Thiago Silveira Alvares alvares@macae.ufrj.br Nutrition Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Estrada do Imburro, s/n 27979-000 Macaé, Rio de Janeiro, Brazil
© 2016 Taylor & Francis

Downloaded by [University of California Santa Barbara] at 05:03 18 February 2016

Materials and methods

Preparation of beetroot-based nutritional gel

All the beetroot used in the present study belongs to the Chenopodiaceae family and the *Beta vulgaris* L. species. Conventional beetroot was acquired in the city of Rio de Janeiro (Southeast of Brazil – 22° 54′ S 43° 10′ W). Two kilograms of raw beetroots were thoroughly washed in tap water, sanitized with a chlorine solution and separated in four different batches (500 g each batch), each batch comprised from three raw beetroots. Each batch was then put into a centrifuge blender (Model CE700, Black & Decker®, Baltimore, MD). The resulting juice (229.89 ml from each batch; 45.98% yield) was centrifuged to remove solid particles, filtered and passed into a spray-dryer (Büchi 190, Büchi Laboratoriums – Technik AG, Flawil, Switzerland) to make a beetroot powder (27.86 g from each batch; 5.57% yield). To produce 100 g of the beetroot-based gel, ≈16.2 g of the beetroot powder was mixed with ≈80 ml of BJ, ≈2.8 g of carboxymethylcellulose (C4888 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and ≈1 ml of artificial orange flavor. The mixture was mixed until obtaining the consistency of a gel. To perform all analyses described below, four different samples from each batch were separated and analyzed in triplicate.

Proximate analysis

The moisture content, total fat, crude protein and ash content were determined for BG samples as described by AOAC (2012). All proximate analyses were expressed as g/100 g (dry and wet weight basis).

Sugar analysis

The content of sucrose, fructose and glucose of the BG were analyzed as previously described by Hernández et al. (1998) with some modifications. The samples were diluted and centrifuged at 10 000g for 10 min. After centrifugation, the supernatant was collected and 20 µl of each sample was immediately injected into a high-performance liquid chromatography (HPLC) system. The total sugar content was the sum of the individual values. The sucrose, fructose and glucose content of the BG were quantified by using external calibration curve spiked into the sample matrix with sucrose (0–10 mg/ml), fructose (0–1 mg/ml) and glucose (0–0.5 mg/ml) standards at minimum of six levels of concentration. Each concentration was injected into the HPLC and the linear regression equation was acquired by plotting the quantity of standard injected against the peak area. Good correlation was obtained (sucrose: $R^2 = 0.999$, fructose: $R^2 = 0.998$ and glucose: $R^2 = 0.997$). The HPLC analysis of sucrose, fructose and glucose and samples were performed in triplicate. The results were expressed as g/100 g.

Potassium analysis

The content of potassium was analyzed by using a photoelectric flame photometer (910MS, Analyser®, São Paulo, Brazil). The samples were diluted and centrifuged at 10 000g for 10 min. After centrifugation, the supernatant was collected and immediately aspirated by the photoelectric flame photometer. The concentration of potassium present in the BG sample was compared against a standard solution of potassium chloride.

Nitrate analysis

Nitrate analysis was performed as previously described by Croitoru (2012), with some modifications. In brief, samples were diluted in purified and deionized water and centrifuged at 14 000 rpm for 10 min. After centrifugation, the supernatant was collected and 10 µl of each sample was immediately injected into an HPLC system. The HPLC system was equipped with a reverse-phase C18 analytical column (5-µm, 250 × 4.6 mm I.D. Discovery®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), a reverse-phase C18 guard column (5-µm, 50 × 4.6 mm, I.D. Ascentis®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and a photodiode array detector monitoring absorbance at 222 nm. The run was performed by using a mobile phase solution that consisted of 2.5 mm tetrabutylammonium bromide (pH 2.0) and acetonitrile (90:10; v/v) at an isocratic flow rate of 1.5 ml/min for 15 min. The nitrate was quantified by using external calibration curve spike into the sample matrix with sodium nitrate (0–4 mmol/l), at a minimum of six levels of concentration. Each concentration was injected into the HPLC and the linear regression equation was acquired by plotting the quantity of standard injected against the peak area. Good correlation was obtained ($R^2 = 0.999$). The HPLC analysis of nitrate and samples were performed in triplicate. The results were expressed as mmol/100 g.

In order to test the recovery of the analyte after the extraction procedures, a series of various concentrations of 0.5 and 10 mmol/l of standard solutions were spiked into the sample. Each spiked concentration was analyzed in triplicate, including a blank test to evaluate the average recoveries.

Total antioxidant capacity and total phenolic content analysis

The Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay described by Deng et al. (2013) was used to

Downloaded by [University of California Santa Barbara] at 05:03 18 February 2016

determine the TAC. The The ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) stock solution was prepared from 7 mmol/l ABTS and 2.45 mmol/l potassium persulfate in a volume ratio of 1:1, and then incubated in the dark at room temperature for 16 h and used within 2 d. A 100 µl of the sample was mixed with 3.8 ml ABTS working solution and the absorbance was taken at 734 nm after 6 min of incubation at room temperature. The percent of inhibition of absorbance at 734 nm was calculated and the results were expressed as µmol of Trolox equivalents per 100 g (µmol TE/100 g). The analysis of TP content was performed by using the Folin–Ciocalteu (F-C) reagent, as described previously (Singleton & Rossi 1965) with some modifications. Briefly, samples (5 g) were homogenized with 20 ml of methanol and centrifuged (10 000g, 15 min at 4 °C). Before analysis, 500 µl of the supernatant was mixed with 300 µl of 1.5M hydrogen peroxide to oxidize the interfering compounds. The mixture was vortexed and subjected to the F-C assay. For this, 15 µl of the sample mixture was diluted with 240 µl of distilled water in a 96-well microplate well and 15 µl of 0.25N F-C reagent and 30 µl of 1N sodium carbonate was added. The mixture was incubated for 2 h and absorbance values were determined at 765 nm using a plate reader. Gallic acid was used for calibration, and the results were expressed as mg of gallic acid equivalents per 100 g (mg GAE/100 g).

In vitro *digestion procedure*

Analysis of nitrate, potassium, TEAC and phenolics in the BG and BJ were repeated following *in vitro* digestion in order to estimate and compare bioaccessibility. The *in vitro* digestion model was performed according to Wootton-Beard & Ryan (2011) with some modifications. Briefly, 5 g of BG or 5 ml of BJ sample was mixed with Hanks' balanced salt solution (with $NaCO_3$, without phenol red, sterile filtered, Sigma-Aldrich, Poole, UK) to adjust a final volume of 20 ml and incubated with 1 ml of alpha-amylase (240 KNU-T/g, Termamyl® 2×, Novozymes, Bagsværd, Denmark) at 37 °C for 10 min, adjusted to pH 2.0 with 1 ml of a porcine pepsin preparation (0.04 g pepsin in 1 ml 0.1 M HCl) and incubated at 37 °C in a shaking water bath at 90 rpm for 1 h. After GP, an aliquot of each sample was stored at −20 °C. The pH was then increased to 5.3 with 0.9 M sodium bicarbonate followed by the addition of 200 µl of bile salts glycodeoxycholate (0.04 g in 1 ml saline), taurodeoxycholate (0.025 g in 1 ml saline), taurocholate (0.04 g in 1 ml saline) and 100 µl of pancreatin (0.04 g in 500 µl saline solution). The pH of each sample was increased to 7.4 with 1M NaOH. Samples were incubated in a shaking water bath (95 rpm) at 37 °C for 2 h to complete the DP of the *in vitro* digestion process. After the DP, a 500 µl aliquot of each sample was stored at −20 °C. The blank was prepared with identical chemicals but without a sample and underwent the same conditions.

Sensory evaluation

Sensory characteristics of the BG (sample B) were compared with the BJ (sample A). This comparison was made because the consumption of BJ has been widely used in clinical trials studies. For this sensory study, consumers were selected without mouth disease and oral lesion as well as participants that did not use any drugs that affect sensory feeling, mainly taste and smell. Sensory hedonic testing of the samples was carried out according to Stone & Sidel (1998) by a group of 41 non-trained consumers (31 female, 10 male) ranging from 21 to 87 years old (40.26 ± 18.58 years). The consumers evaluated the aroma, color, taste and overall acceptability of each sample based on 9-point category scale (1 = dislike extremely to 9 = like extremely). Purchase intention was also evaluated by consumers using a 5-point scale ranging from 1 = certainly would not buy to 5 = certainly would buy. The sensory tests were performed in individual booths in the morning (9:00 a.m.–10:30 a.m.) under white light. To verify the acceptability of the tested samples, an acceptability factor (AF) (Dutcosky 1996) using standardized criteria was calculated to evaluate each sensorial analyzed attribute:

$$AF = A \times 100 \times B^{-1}$$

where A is the mean value obtained for each attribute and B is the maximum mean value for each attribute. All sensorial procedures were performed in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki and were approved by the Institutional Ethics Committee.

Statistical analysis

A two-way ANOVA with repeated measures was used to identify differences in nitrate, sodium, potassium, TEAC and TP between BG and BJ at non-digestive (ND), GP and DP phases. One-way ANOVA was used to identify differences in the sensory acceptance scores (aroma, color, taste and overall acceptability) and in the purchase intention scores between BG and BJ. When a significant F was found, additional *post-hoc* tests with Bonferroni adjustment were performed. A paired t-test was used to identify differences in the percentage difference at the GP and DP relative to ND in nitrate, potassium, TP content and TAC at BG and BJ. An unpaired t-test was

used to identify differences in the proximate analysis and sugar content between BG and BJ. Statistical significance was set at the 0.05 level of confidence. Data are expressed as the means ± standard deviation (SD). All analyses were performed using a commercially available statistical package (IBM SPSS® Statistics version 22 for Mac, Chicago, IL).

Results and discussion

Nutritional composition of BG

The content of moisture, total fat, crude protein, ash, fructose, glucose, sucrose and total sugars of the BG and BJ are depicted in Table 1. It is important to observe that the BG and BJ displayed lower lipid content and higher sugars in sucrose form, which is an interesting composition to be used by athletes and physically active individuals immediately before or after exercise training because the sugars are the main energy substrate used during the high-moderate-intensity exercise.

Table 1. Proximate analysis and sugar content (g/100 g) of the beetroot-based nutritional gel (BG) and beetroot juice (BJ).

	BG	BJ
Moisture	76.14 ± 0.48*	89.57 ± 0.03
Protein	3.24 ± 0.27	2.96 ± 0.10
Ash	2.14 ± 0.18*	1.30 ± 0.26
Fat	0.52 ± 0.05*	0.40 ± 0.02
Total sugars	9.07 ± 0.70	8.54 ± 0.60
Fructose	0.32 ± 0.01*	0.16 ± 0.01
Glucose	0.35 ± 0.01*	0.14 ± 0.01
Sucrose	8.41 ± 0.72	8.25 ± 0.59

The values are mean ± SD. The symbol *($p < 0.05$) denotes significantly different from BJ.

In vitro *bioaccessibility*

Nitrate

The content of nitrate of BG and BJ before and after simulated GP and DP digestion are depicted in Figure 1. The nitrate content of BG was statistically higher as compared with BJ in the ND (BG: 9.57 ± 0.84 versus BJ: 5.61 ± 0.36 mmol/100 g), GP (BG: 10.37 ± 0.67 versus BJ: 5.88 ± 0.08 mmol/100 g) and DP (BG: 10.27 ± 1.33 versus BJ: 5.24 ± 0.32 mmol/100 g) of the *in vitro* digestion process. Furthermore, no significant losses in the nitrate content of BG and BJ after the *in vitro* digestion was observed. However, the percentage differences at the DP relative to ND in nitrate at BJ demonstrate a significant reduction as compared with the percentage difference at the GP relative to ND (−5.12 ± 9.81 versus 5.16 ± 7.26%, respectively) (Figure 2), which may indicate losses of nitrate after the *in vitro* digestion. Regarding BG, no significant difference was observed on the percentage differences at the GP and DP relative to ND (9.05 ± 12.42 versus 7.87 ± 16.22%, respectively), which indicate that the nitrate was 100% bioaccessible.

Previous studies have demonstrated that dietary nitrate supplementation from vegetal sources (for example, beetroot) have a beneficial effect on cardiovascular health (Kapil et al. 2015) and exercise performance (Bailey et al. 2010). Kapil et al. (2015) observed that daily dietary supplementation for 4 weeks with 0.25 l of BJ (containing ≈6.4 mmol nitrate) was associated with significant reduction in blood pressure and arterial stiffness, and improved endothelial function in hypertensive patients. Bailey et al. (2010) observed that the consumption 500 ml of BJ was needed to obtain the sufficient amount of inorganic nitrate (≈5–6 mmol nitrate) to improve exercise performance.

The consumption of dietary nitrate has been enhanced by the recent commercialization of BJ concentrates in products such as Beet it® (James White Drinks) with the purpose of reducing the need to ingest a large volume of homemade BJ. Wylie et al. (2013) demonstrated that the consumption of 140 ml of Beet it®, which contain a dose of 8.4 mmol of nitrate is suitable to improve exercise performance.

The product described here (BG) was formulated to provide an alternative source of concentrated dietary nitrate that contains more nitrate (approximately 10 mmol nitrate) in a mass of 100 g than in the volume of BJ cited in the previous studies (which ranged between 5 and 8.4 mmol of nitrate), including the commercial BJ concentrate Beet it® (James White Drinks) (Bailey et al. 2010; Wylie et al. 2013; Kapil et al. 2015).

It is important to point out that products in gel form provide more options to combat the issues of supplement digestibility and portability (Campbell et al. 2008). Furthermore, James et al. (2015) observed that nitrate-containing gel appear to exhibit an earlier nitrate plasma peak (∼1 h) when compared with BJ at a similar loading dose; suggesting that different forms of nitrate delivery (e.g. a gel or liquid) may in itself modulate plasma pharmacokinetics. Therefore, the use of the BG may have important implications for physically active individuals that perform high-intensity and short- and/or long-term exercise.

The recoveries of nitrate spiked with two concentrations (0.5 and 10 mmol/l) into the samples were in the range of 97.4–101.7%. The average recoveries of nitrate were 99.5%, indicating that the method is quite accurate.

Total antioxidant capacity and total phenolics

The values of TAC (as measured by TEAC) and TP content of BG and BJ before and after simulated GP and DP digestion are depicted in Figure 1. The TAC and TP

Downloaded by [University of California Santa Barbara] at 05:03 18 February 2016

Downloaded by [University of California Santa Barbara] at 05:03 18 February 2016

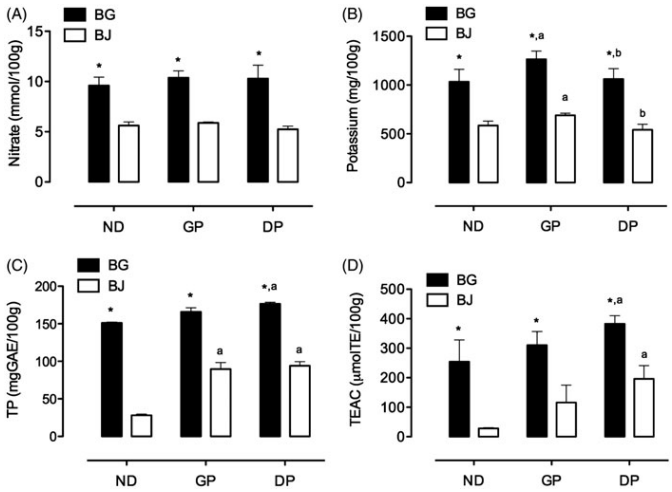


Figure 1. Values of (A) nitrate (mmol/100 g), (B) potassium (mg/100 g), (C) total phenolic content (mg GAE/100 g) and (D) total antioxidant capacity (µmolTE/100 g) of the beetroot-based nutritional gel (BG) and beetroot juice (BJ) before and after *in vitro* digestion. ND, non-digested; GP, gastric phase; DP, duodenal phase; TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity; TE, Trolox equivalents; TP, total phenolics; GAE, gallic acid equivalents. The symbol *($p < 0.05$) denotes significantly different from BJ; [a]($p < 0.05$) denotes significantly different from ND; [b]($p < 0.05$) denotes significantly different from GP.

content of BG were statistically higher as compared with BJ in ND (BG: 253.9 ± 74.13 versus BJ: 28.12 ± 2.79 µmol TE/100 g and BG: 151.2 ± 1.0 versus BJ: 28.08 ± 1.6 mg GAE/100 g, respectively), GP (BG: 310.2 ± 46.53 versus BJ: 115.7 ± 59.14 µmol TE/100 g and BG: 165.9 ± 5.3 versus BJ: 89.62 ± 8.7 mg GAE/100 g) and DP (BG: 382.9 ± 27.33 versus BJ: 196.1 ± 44.71 µmol TE/100 g and BG: 176.5 ± 2.1 versus BJ: 94.17 ± 5.2 mg GAE/100 g, respectively) of the *in vitro* digestion process. There was a significant increase in TAC and TP content of BG after DP as compared with ND. Regarding BJ, there was a significant increase in TAC and TP content after GP and DP as compared with ND. The percentage differences at the GP and DP relative to non-digested at BG was statistically significant in TP (7.90 ± 2.82 versus 17.19 ± 3.08%, respectively) but not in TAP (32.94 ± 57.34 versus 60.07 ± 43.59%, respectively) (Figure 2). The percentage differences at the GP and DP relative to non-digested at BJ was not statistically significant in TP (220.21 ± 38.90 versus 235.67 ± 16.70%, respectively) and TAP (308.27 ± 194.17 versus 591.34 ± 88.72%, respectively).

The increases of TAC and TP observed in the present study in BG and BJ after the digestion process is in agreement with the increases observed in TAC and TP in BJ of a previous study (Wootton-Beard & Ryan 2011; Wootton-Beard et al. 2011). Wootton-Beard and Ryan (2011) sought six of the more convenient vegetable juice products created to try to increase consumption of polyphenol nutrient. The authors found that the product with more TP compounds were the commercial BJ and shot (101.5 ± 2.9 and 68.4 ± 0.3 mg GAE, respectively). The authors suggest that the possible explanation for these phenomena may be related to the biotransformation of antioxidants caused by interaction with the enzymes present in the system or by the heat treatment also may induce the formation of new structural groups on the antioxidant molecule (Ryan & Prescott 2010). Additionally, a significant increase of TP was observed after GP as compared with ND condition in BJ, but not in BG. It is suggested that differences in the processing conditions of food between the two products may create a positive interaction or a physical barrier that increase or decreases the bioaccessibility of intracellular nutrients (Ellis et al. 2004; Palafox-Carlos et al. 2011). For example, interaction with intestinal enzymes may lead to increase the TP content in BG and BJ after DP. In the other hand, the polyphenols present in BG may interact with the carboxymethylcellulose (a water-soluble polymer) contained in the BG product promoting resistance to gastric enzymes, which has been the responsible for no significant increases observed between ND and GP of the *in vitro* digestion. However, besides this interaction, TAC and TP content of BG were 95% and 87% higher when compared BJ after digestion, respectively. It is very relevant because the BG offers an opportunity of

Downloaded by [University of California Santa Barbara] at 05:03 18 February 2016

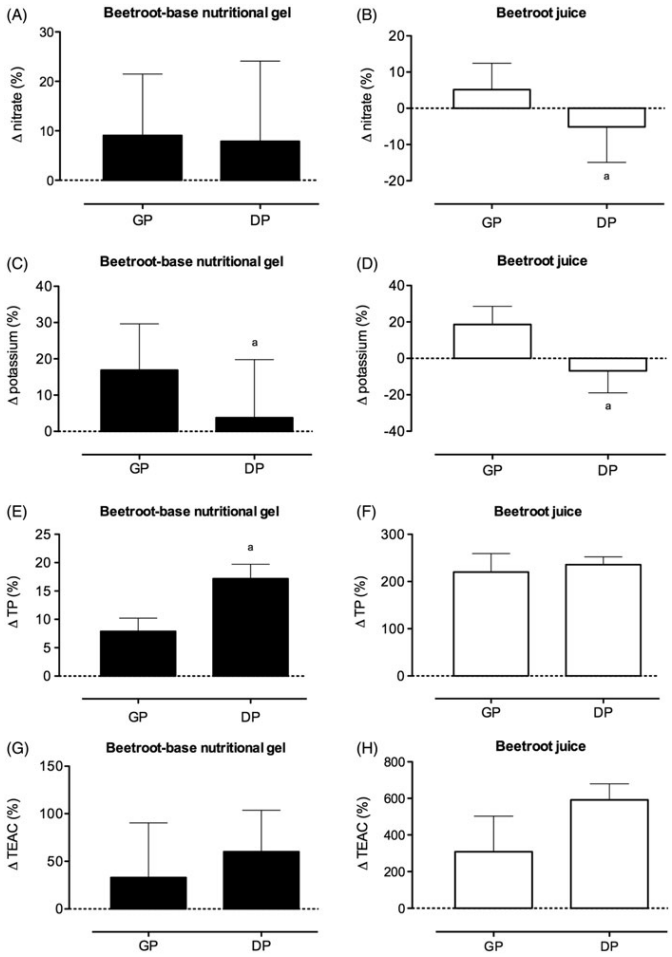


Figure 2. The percentage differences at the gastric phase (GP) relative to non-digested and at the duodenal phase (DP) relative to non-digested in nitrate at (A) BG and (B) BJ; potassium at (C) BG and (D) BJ; total phenolic content at (E) BG and (F) BJ; total antioxidant capacity at (G) BG and (H) BJ. BG, beetroot-based nutritional gel; BJ, beetroot juice; TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity; TE, Trolox equivalents; TP, total phenolics; GAE, gallic acid equivalents. The symbol [a]($p < 0.05$) denotes significantly different from GP.

polyphenol-rich food to be consumed with ease and convenience by the population.

Potassium

The content of potassium of BG and BJ before and after simulated GP and DP digestion are depicted in Figure 1. The potassium content of BG was higher as compared with BJ in ND (BG: 1034 ± 127.0 versus BJ: 585.0 ± 44.90 mg/100 g), GP (BG: 1264 ± 84.87 versus BJ: 690.3 ± 21.66 mg/100 g) and DP (BG: 1061 ± 108.4 versus BJ: 542.1 ± 57.01 mg/100 g) of the *in vitro* digestion process. There was a significant increase of potassium in both BG and BJ from ND to GP (BG: 1034 ± 127.0 versus 1264 ± 84.87 mg/100 g and BJ: 585.0 ± 44.90 versus 690.3 ± 21.66 mg/100 g, respectively). However, a significant reduction was observed from GP to DP in both BG and BJ (BG: 1264 ± 84.87

Downloaded by [University of California Santa Barbara] at 05:03 18 February 2016

Table 2. Acceptance and acceptability factor for the beetroot-based nutritional gel (BG) and beetroot juice (BJ).

Attributes	BG	BJ
Aroma	7.12 ± 1.88 (79)	6.64 ± 2.30 (74)
Color	7.27 ± 2.27 (81)	6.87 ± 2.48 (76)
Taste	6.41 ± 2.55 (71)	6.38 ± 2.67 (71)
Overall acceptability	6.66 ± 2.32 (74)	6.82 ± 2.43 (76)
[a]Purchase intention	3.69 ± 1.47 (74)	3.87 ± 1.26 (77)

The values are mean ± SD for acceptance. No significant differences were observed between BG and BJ in all attributes investigated.
[a]Purchase intention was evaluated in a structured 5-point hedonic scale whereas acceptance attributes (aroma, color, taste and overall acceptability) were assessed in a structured 9-point hedonic scale.

versus 1061 ± 108.4 mg/100 g and BJ: 690.3 ± 21.66 versus 542.1 ± 57.01 mg/100 g, respectively). The percentage differences at the DP relative to ND in potassium demonstrate a significant reduction as compared with the percentage difference at the GP relative to ND at BG (16.88 ± 12.78 versus 3.77 ± 16.01%, respectively) and BJ (18.62 ± 9.94 versus −6.87 ± 12.07%, respectively) (Figure 2), which may indicate losses of the potassium after the *in vitro* digestion.

The increase of potassium content observed in GP *in vitro* digestion may be related to the enzymatic interaction of the digestion process, since it has a role in increasing the bioavailability of potassium. However, the verified reduction in DP in *in vitro* digestion may have occurred after pH was increased, since it inhibits gastric enzymes (Rao et al. 2007). The BG described here may be considered a nutritional strategy for maintaining normal potassium status among athletes during high-intensity exercise where plasma potassium concentrations tend to decline to a lesser degree than sodium (American College of Sports Medicine 2007). Therefore, the BG described here may be considered a nutritional strategy for maintaining normal potassium status among athletes during high-intensity exercise.

It is important to point out that great differences were observed in the quantitative evaluation of nitrate, TEAC, TP and potassium before digestion. These differences were most probably due to the amount of beetroot processed to obtain the gel and the juice.

Sensory evaluation

The sensory scores regarding acceptance and purchase intention tests for the BG (sample A) and BJ (sample B) are exhibited in Table 2. No differences ($p > 0.05$) were observed in the aroma, color, taste and overall acceptability of BG and BJ samples. Nonetheless, all these acceptance attributes were positively scored between like slightly and like moderately (6–7), indicating that both BG and BJ products were accepted by consumers. Furthermore, no significant difference was detected in purchase intention scores on BG and BJ samples which were rated between maybe/maybe not buy and probably would buy (3–4). At present, there is no information regarding sensory studies for beetroot gel. However, recent experiments have focused on the addition of BJ into products already commercialized such as probiotic beverage (Vanajakshi et al. 2015). In the present study, consumers positively evaluated the sensory attributes of the innovative gel product. Our findings indicate the great potential of beetroot gel, which can be considered an easy and convenient alternative for promoting health and sports benefits taking into account the overall acceptance and purchase intention by consumers.

Conclusion

Although the studies investigating the consumption of BJ in human health and exercise performance has been widely explored, the results of the present study may suggest a new nutritional strategy to increase dietary nitrate ingestion and the bioaccessibility of antioxidants and potassium. Furthermore, the new product represents an alternative and convenient source for consuming beetroot in a gel form, improving the nutritional value of this vegetable, as well as having positive acceptance and purchase intention.

Acknowledgements

The authors would thank Ricky Toledano for preparing the English version of the manuscript and the LNF Latino Americana for the donation of alpha-amylase enzyme used in the present study.

Disclosure statement

The authors declare no conflicts of interest.

Funding information

The Research Foundation of the State of Rio de Janeiro – FAPERJ (Process # E-26/111.297/2013 and E-26/110.309/2014), the National Counsel of Technological and Scientific Development – CNPq (Process # 442 977/2014–0) and the Coordination for the perfecting of high education personnel – CAPES (Process # E-26/101.403/2014 - CAPES/FAPERJ E-45 - PAPDRJ/2013) provided financial support for the study.

References

American College of Sports Medicine, Sawka MN, Burke LM, Eichner ER, Maughan RJ, Montain SJ, Stachenfeld NS. 2007. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and fluid replacement. Med Sci Sports Exerc. 39:377–390.

AOAC International 2012. Official methods of analysis of AOAC. Association of Official Analytical Chemists International. 19th ed. Arlington, TX: AOAC International.

Baião D, Conte-Junior CA, Paschoalin VM, Alvares TS. 2015. Beetroot juice increase nitric oxide metabolites in both men and women regardless of body mass. Int J Food Sci Nutr. 67:40–46

Bailey SJ, Fulford J, Vanhatalo A, Winyard PG, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, Benjamin N, Jones AM. 2010. Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. J Appl Physiol. 109:135–148.

Campbell C, Prince D, Braun M, Applegate E, Casazza GA. 2008. Carbohydrate-supplement form and exercise performance. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 18:179–190.

Croitoru MD. 2012. Nitrite and nitrate can be accurately measured in samples of vegetal and animal origin using an HPLC-UV/VIS technique. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 911:154–161.

Deng G, Lin X, Xu X, Gao L, Xie J, Li H. 2013. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. J Funct Food. 5:260–266.

Dutcosky SD. 1996. Análise sensorial de alimentos. Curitiba, Brazil: Champagnat.

Ellis PR, Kendall CW, Ren Y, Parker C, Pacy JF, Waldron KW, Jenkins DJ. 2004. Role of cell walls in the bioaccessibility of lipids in almond seeds. Am J Clin Nutr. 80:604–613.

Hernández JL, González-Castro MJ, Alba NI, García CC. 1998. High-performance liquid chromatographic determination of mono- and oligosaccharides in vegetables with evaporative light-scattering detection and refractive index detection. J Chromatogr Sci. 36:293–298.

James PE, Willis GR, Allen JD, Winyard PG, Jones AM. 2015. Nitrate pharmacokinetics: taking note of the difference. Nitric Oxide. 48:44–50.

Jones AM. 2014. Dietary nitrate supplementation and exercise performance. Sports Med. 44:S35–S45.

Kapil V, Weitzberg E, Lundberg JO, Ahluwalia A. 2014. Clinical evidence demonstrating the utility of inorganic nitrate in cardiovascular health. Nitric Oxide. 38:45–57.

Kapil V, Khambata RS, Robertson A, Caulfield MJ, Ahluwalia A. 2015. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase .2, double-blind, placebo-controlled study. Hypertension. 65:320–327.

Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. 2011. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. J Food Sci. 76:R6–R15.

Rao LG, Khan T, Gluck G. 2007. Calcium from LactoCalcium milk mineral after digestion with pepsin stimulates mineralized bone nodule formation in human osteoblast-like SaOS-2 cells *in vitro* and may be rendered bioavailable *in vivo*. Biosci Biotechnol Biochem. 71:336–342.

Ryan L, Prescott SL. 2010. Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an *in vitro* digestion. Int J Food Sci Technol. 45:1191–1197.

Sakihama Y, Maeda M, Hashimoto M, Tahara S, Hashidoko Y. 2012. Beetroot betalain inhibits peroxynitrite-mediated tyrosine nitration and DNA strand cleavage. Free Radic Res. 46:93–99.

Singleton VI, Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid agents. Am J Enol Vitic. 16:144–158.

Stone H, Sidel JL. 1998. Quantitative descriptive analysis: developments, applications, and the future. Food Technol. 52:48–52.

Vanajakshi V, Vijayendra SVN, Varadaraj MC, Venkateswaran G, Agrawal R. 2015. Optimization of a probiotic beverage based on Moringa leaves and beetroot. LWT Food Sci Technol. 63:1268–1273.

Wootton-Beard PC, Ryan L. 2011. A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants. J Funct Food. 3:329–334.

Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L. 2011. Stability of the antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable jucies before and after *in vitro* digestion as measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. Food Res Int. 44:217–224.

Wylie LJ, Kelly J, Bailey SJ, Blackwell JR, Skiba PF, Winyard PG, Jeukendrup AE, Vanhatalo A, Jones AM. 2013. Beetroot juice and exercise: pharmacodynamic and dose-response relationships. J Appl Physiol. 115:325–336.

Downloaded by [University of California Santa Barbara] at 05:03 18 February 2016

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde

Você está convidado a participar do estudo intitulado **"Efeito da ingestão de um Gel Energético a Base da Beterraba sobre a Produção de Óxido Nítrico, Oxigenação, Volume Sanguíneo e Função Muscular em Idosos."** Essas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária nesse estudo, que tem como objetivo investigar os possíveis efeitos do consumo do gel de beterraba sobre indicadores de saúde. Este estudo justifica-se pela necessidade de melhorar a qualidade de vida dos idosos, com base na possível melhora da função muscular provocado pela ingestão do gel a base da beterraba.

O presente documento se fundamenta nas principais regras internacionais sobre pesquisas que envolvem seres humanos, a saber, o Código de Nuremberg, de 1947, a Declaração Universal dos Direitos Humanos, de 1948, a Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos, de 2005, e outros documentos relacionados. Cumpre as disposições da Constituição da República Federativa do Brasil de 1988 e da legislação brasileira. Este documento reúne informações sobre os direitos e deveres dos participantes da pesquisa, da comunidade científica e do Estado, bem como as responsabilidades dos pesquisadores com relação à segurança e a ações que levem a efeitos benéficos para os voluntários, justiça, igualdade, dentre outros. É importante lembrar, ainda, que cada área de investigação e cada modalidade (categoria) de pesquisa, além de respeitar os princípios relatados neste texto, devem atender as normas de cada setor e conjunto de regras específicas.

Você encontrará o Grupo de Ciências Nutricionais e Alimentos na Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé - Polo Ajuda, localizado na Estrada do Imburo, s/n – Macaé, RJ no período das 07:00 às 10:00 horas. Durante este período você será submetido a 3 tratamentos diferentes com intervalo de pelo menos 1 semana, que compreenderão:

- 1° Dia: Jejum de 8h; coleta de dados antropométricos, verificação da frequência cardíaca e níveis pressóricos (PAS e PAD); consumo de gel à base de beterraba, gel à base de beterraba enriquecido ou placebo; análise sensorial do gel; teste de força dos músculos do antebraço; coleta de 7 mL de sangue e urina antes e após 90, 120 e 140 minutos do consumo do gel.

- 2° Dia: Jejum de 8h; verificação da frequência cardíaca e níveis pressóricos (PAS e PAD); consumo de gel à base de beterraba, gel à base de beterraba enriquecida ou placebo; análise sensorial do gel; teste de força dos músculos do antebraço; coleta de 7 mL de sangue e urina antes e após 90, 120 e 140 minutos do consumo do gel.

- 3° Dia: Jejum de 8h; verificação da frequência cardíaca e níveis pressóricos (PAS e PAD); consumo de gel à base de beterraba, gel à base de beterraba enriquecida ou placebo; análise sensorial do gel; teste de força dos músculos do antebraço; coleta de 7 mL de sangue e urina antes e após 90, 120 e 140 minutos do consumo do gel.

Em qualquer etapa do estudo ou em caso de dúvidas você poderá entrar em contato o Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Thiago da Silveira Álvares - Professor adjunto da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé. Telefone para contato: (21) 9 9989 6554 / (22) 2762-9313– alvares@macae.ufrj.br. E se você tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ, no seguinte endereço: R. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, n. 255 – Cidade Universitária/Ilha do Fundão/ Rio de Janeiro/RJ – Sala 01D-46/1° andar - CEP: 21941-913; Tel.: 2562-2480 / Fax: 2562-2481 – Atendimento: Seg - Sex 08h às 15h ou através do e-mail: cep@hucff.ufrj.br; CNPJ: 33.663.683/0053-47.

Para maiores informações procure e leia a Resolução 196, de 10 de Outubro de 1996 – Capítulo IV – Consentimento Livre e Esclarecido e o Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa, através do link

http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep

Além disso:

- Você deverá seguir as recomendações alimentares e registrar todos os alimentos consumidos nos dias anteriores aos testes.
- A frequência cardíaca e pressão arterial (PAS e PAD) serão realizadas em ambiente limpo e reservado através da utilização de um equipamento digital de pressão arterial.
- O material biológico (sangue) doado por você será coletado através de agulha estéril (isento de bactérias, para retirada de sangue) por um técnico em coleta de sangue, em um ambiente limpo e reservado, analisado e, em seguida, descartado. O sangue coletado na primeira visita será enviado para um laboratório particular da cidade do Rio de Janeiro para ser analisado. E as coletas de sangue realizadas nas 3 visitas seguintes serão guardadas e utilizado somente para esta pesquisa, não sendo guardado para análises futuras.

- Você poderá sentir um pequeno incomodo, que dentre esses estão: dor relacionada da utilização da agulha para as coletas de sangue, pequena perda de sangue da veia no local coleta e formação de hematoma (pequeno acumulo de sangue no local da coleta).
- Você poderá sentir algum enjoo, apresentar fezes e urinas avermelhadas após consumir o gel de beterraba.
- Trata-se de um estudo que está testando o efeito do consumo do gel de beterraba sobre a oxigenação, volume sanguíneos e função muscular em idosos. Somente no final do estudo poderemos informar a presença ou não de algum benefício relacionado ao tratamento.
- Todas as etapas do estudo são inteiramente gratuitas e a sua participação não será obrigatória até o término do estudo.
- Você não receberá qualquer tipo de remuneração (ex: pagamento em dinheiro) pela participação no estudo. As informações coletadas de sua participação na pesquisa serão guardadas com segurança, onde serão somente de conhecimento dos pesquisadores envolvidos no projeto e dos profissionais que possam vir a participar da pesquisa, garantindo uma proteção contra qualquer tipo de preconceito ou condenação. Porém, os seus resultados obtidos neste estudo (quaisquer que sejam eles) serão divulgados através de publicações em periódicos da área, revistas científicas e através de informativos de circulação interna do Instituto de Nutrição, sem que os nomes dos voluntários sejam identificados.
- Você tem o direito de receber os resultados iniciais da pesquisa.
- Você terá a direito de não participar do projeto de pesquisa ou de retirar a sua autorização a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer perda ou dano à continuidade de seu tratamento na Instituição, mas deverá notificar os pesquisadores envolvidos, seja pessoalmente, por e-mail ou telefone.
- Em caso de interrupções ou problemas durante as etapas estabelecidas neste estudo (motivo comprovado), todos os custos serão de responsabilidade da Instituição envolvida (tratamento médico e indenizações legalmente estabelecidas).

Versão atualizada em 10 de Abril de 2015.

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

Eu discuti com o (a) Dr. (a) _____, sobre a minha vontade de participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, as etapas a serem realizadas, seus incômodos e riscos, as garantias de segurança e de explicação. Ficou claro também que minha participação é gratuita e que tenho garantia do tratamento hospitalar quando necessário. Concordo em participar como voluntário desse estudo e poderei retirar minha autorização a qualquer momento, sem cobranças ou danos, sem

a perda do atendimento nessa Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, tenho conhecimento de que eu e o pesquisador responsável devemos rubricar (assinatura abreviada) todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 2015.

_____

Nome do Voluntário da Pesquisa

_____

Assinatura do Voluntário da Pesquisa

_____

Nome do Pesquisador Responsável

_____

Assinatura do Pesquisador Responsável

ANEXO C

ALIMENTOS QUE DEVEM SER EVITADOS DURANTE O PERÍODO DE 24H, ANTES DA REALIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS.

Grupo das carnes:

- Carne bovina e suína;
- Embutidos;
- Peixes;
- Cordeiro;
- Carneiro.

Grupo dos laticínios:

- Queijos em geral.

Vegetais:

- Beterraba;
- Alface;
- Aipo;
- Espinafre;
- Legumes enlatados;
- Couve;
- Abóbora;
- Rúcula;
- Feijão.

Bebidas:

- Água mineral;
- Bebidas maltadas (cerveja, uísque);
- Vinho;
- Chás (principalmente mate, verde e preto);
- Refrigerantes.

IMPORTANTE

As visitas serão marcadas previamente por telefone. Os voluntários devem fazer jejum de 8 h antes das visitas e não devem fazer uso de antisséptico bucal antes das visitas.

Responsável pela pesquisa: Nut. Marina Morgado
Contato: +55 21 97969-2437

Grupo de Pesquisa em Nutrição e Metabolismo do Exercício
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Macaé
Estrada do Imburo, s/n - Bairro Ajuda.
CEP: 27979-000 - Macaé - Rio de Janeiro
Contato: +55 22 2762-9313

ANEXO D

Beetroot consumption improves forearm muscle oxygenation, blood volume and strength in older adults

Gustavo Vieira de Oliveira[1], Marina Morgado[1], Thiago Silveira Alvares[1,2,*]

[1]Nutrition and Exercise Metabolism Research Group, Nutrition Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Macaé – RJ, Brazil.

[2]Nutrition Institute, Department of Basic Nutrition and Experimental, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, Brazil.

[*]Corresponding author:

Professor Thiago Silveira Alvares, Ph.D.

Federal University of Rio de Janeiro – Nutrition Institute.

Estrada do Imburo s/n, 27979-000, Macaé, Rio de Janeiro, Brazil

Phone: +55 22 2762 9313

E-mail: alvares@macae.ufrj.br

Abstract

Both recovery time of post-exercise muscle oxygenation and muscle strength decline with aging. Beetroot consumption has been shown to improve blood perfusion and exercise performance. The aim of the present study was to evaluate the effect of a beetroot-based gel (BG) on muscle oxygenation, blood volume (tHb) and handgrip strength in the elderly in response to handgrip exercise. In a randomized crossover double-blind design, twelve older subjects consumed BG (beetroot gel) or PLA (nitrate-depleted gel). The subjects performed a rhythmic handgrip exercise which consisted of a one 1-min set at 30% of the maximal voluntary contraction (MVC) of each subject, followed by a 1 min recovery. The muscle oxygenation parameters and tHb were continuously monitored by using near-infrared spectroscopy. MVC was evaluated at baseline, immediately after exercise, and 30 min afterwards. The time to reach 50% of maximal oxygenation during exercise recovery was faster in the BG when compared to PLA condition ($p<0.05$). Significant increase in tHb during exercise recovery and significant reduction of handgrip strength decline was observed 30 min after exercise after BG consumption. A single dose of a beetroot-based gel speeds up muscle oxygenation, increases blood volume and improves handgrip strength after handgrip exercise in older adults.

Keywords: Dietary nitrate, functional food, muscle oxygenation, nitric oxide, aging

Introduction

Aging causes numerous changes to the cardiovascular system including increased total peripheral resistance and vascular endothelial dysfunction, which has been associated with the reduced bioavailability of nitric oxide (NO) (1). Since NO may influence O_2 utilization by the cells, this suggests that O_2 delivery to the working muscle during exercise may be compromised in the elderly.

Muscle oxygenation measured by near-infrared spectroscopy reflects the balance between muscle O_2 delivery and muscle O_2 utilization during exercise and/or during the recovery time after exercise (2). Recovery time of muscle oxygenation following the completion of exercise has been used as an index of deficits of muscle O_2 delivery in relation to muscle O_2 demand (3,4). Kutsuzawa *et al*. (3) demonstrated that recovery rate of muscle oxygenation after submaximal handgrip exercise was delayed with increased age. Ichimura *et al*. (4) demonstrated that the half-recovery time of oxygenated hemoglobin/myoglobin was significantly related to age, and it was greater in the elderly subjects than in the middle-aged subjects. These data suggest that age-related prolongation in recovery time of muscle oxygenation reflects the age-related decline in muscle function, which is dependent on O_2 delivery to working muscles.

Recently, the consumption of beetroot, a food rich in nitrate, has gained popularity in scientific literature due to the possible effect of the nitrate present in this food to promote NO bioconversion (5). Furthermore, short-term beetroot consumption has been demonstrated to improve muscle oxygenation status during moderate to severe exercise in healthy adults (6,7,8,9). Thus, whether beetroot consumption has the ability to increase muscle O_2 delivery, increase the capacity of muscle to extract or utilized O_2, or both, in older adults, has not been determined. For this reason, the aim of the present work was to evaluate whether a beetroot-based nutritional gel rich in nitrate (BG) promotes changes in the muscle oxygenation

parameters, blood volume and forearm muscle strength following the completion of a handgrip exercise protocol. Analysis of arterial blood pressure, heart rate and urinary nitrate and nitrite were also addressed. We hypothesized that a single dose of the beetroot gel rich in dietary nitrate would result in increased NO bioconversion and would, consequently, promote increases in the muscle oxygenation, blood volume and forearm strength after handgrip exercise in the elderly.

Methods

Subjects

Twenty-six elderly participants were recruited through announcements in flyers and advertisements during community events. All participants were fully informed of the nature and purpose of the investigation and provided written consent to participate. Exclusion criteria included smoking, beetroot allergy, unwillingness to avoid beetroot products during the entire study, liver and kidney disease, or acutely ill. All experimental procedures were performed in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki and approved by the institutional ethics committee and the trial was registered in the ClinicalTrials.gov (NCT02772900).

Study Design

The study was conducted in a randomized, double-blind, crossover and placebo-controlled way. All subjects reported to the laboratory on three occasions, with at least 1-week interval between visits. The first visit was used to explain the experimental procedures and collect clinical and anthropometric data, as well as to ensure familiarity with the handgrip exercise protocol. In the second and third visits, arterial blood pressure measurement and urine samples were drawn at baseline (T0) after a 10-min period of quiet rest. Thereafter,

subjects were randomly divided into either a beetroot-based nutritional gel or a control nitrate-depleted gel (PLA). NIRS measurements in response to the handgrip exercise protocol began approximately 150 min after the nutritional intervention (T150) and lasted for approximately 10 min. Arterial blood pressure measurement was taken again 90 (T90) and 180 (T180) min after nutritional intervention and urine samples were drawn again at T90, T150 and T180 after nutritional intervention (**Figure 1**). The three visits were held between 07:00 and 12:00 a.m. The participants were instructed to fast for at least 8 hours before each visit, restrict carbonated mineral water, avoid the intake of foods rich in nitrate and nitrite, and not to use any mouthwash.

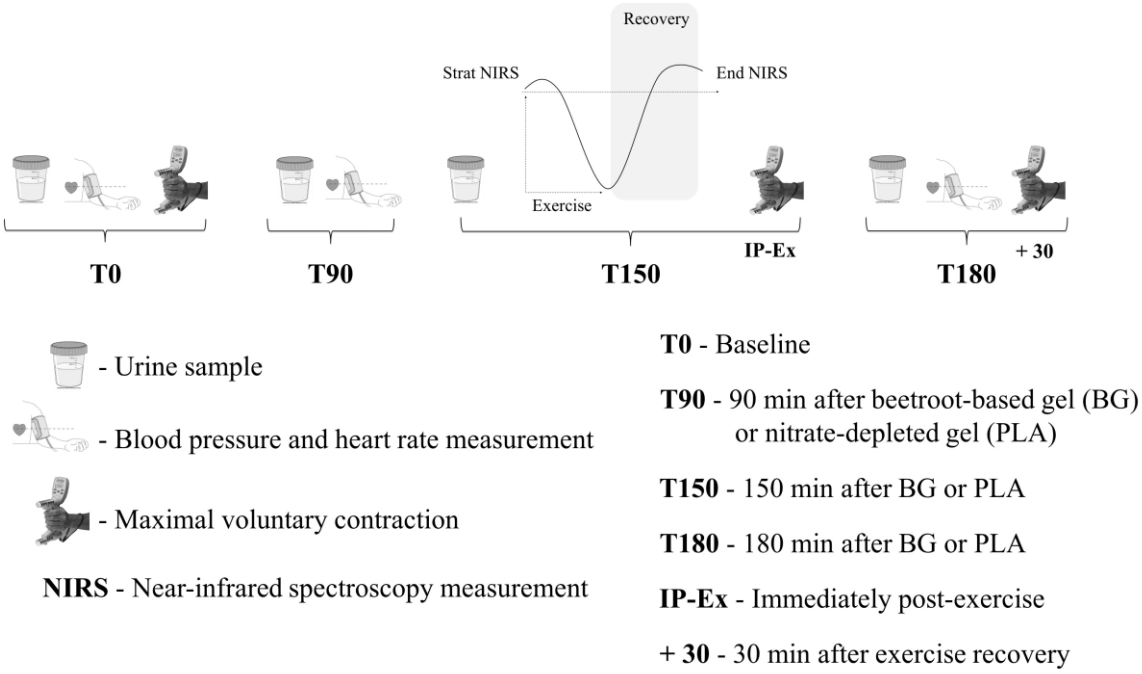


Figure 1. Experimental design of the study.

Nutritional Intervention

All subjects were orally administered either 100 g of a beetroot-based nutritional gel (BG) or a nitrate-depleted gel (PLA) in identical forms with 400 mL of deionized water in a double-blind and randomized manner. The content of nitrate of the BG and PLA consumed by

the subjects of the present study were, respectively, 12.2 ± 0.18 mmol/100 g and 0.02 ± 0.02 mmol/100 g. The BG and PLA were prepared according to Oliveira *et al*. (10) and Morgado *et al*. (11).

Urinary Nitrite and Nitrate Analysis

Nitrite and nitrate analysis in urine was performed as previously described by Croitoru (12), using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system. Nitrite is a metabolic end products derived from oxidation of NO and was used in the present study as an indicator of NO bioconversion/bioavailability. Measurements were made at T0, T90, T150 and T180. Sodium nitrite and nitrate was used for quantification, and the results were expressed as $\mu mol.mmol^{-1}$ creatinine for nitrite and $mmol.mmol^{-1}$ creatinine for nitrate. On the day before each visit, the participants were instructed to avoid foods rich in nitrate and nitrite in their diet.

Muscle Oxygenation and Blood Volume Measurements

Muscle oxygenation of the finger flexor muscle of each subject's dominant forearm was continuously monitored using a commercially available portable NIRS device (PortaMon, Artinis, Medical Systems). This device is a 2-wavelength, continuous wave system, which simultaneously uses the modified Beer-Lambert law and spatially resolved spectroscopy (SRS) methods. The portable device was placed on the skin, over the dominant forearm muscle, exactly 2 cm below of the medial epicondyle of the humerous anatomical landmarks. Since the penetration depth of the NIRS signal is influenced by skin fold thickness (13), this value was recorded on the forearm at the same site where the portable device was placed. For each subject, the half skinfold thickness (9.0 ± 8.7mm) was less than the penetration depth (approximately 25 mm) of the portable NIRS device, ensuring that

measurements were recorded from the muscle tissue. To secure the probe on the skin and minimize movement during exercise, an elastic bandage was wrapped around the subject's forearm. The wrap also helped to minimize the possibility that extraneous light could influence the signal. During all tests, the NIRS system was connected to a personal computer via Bluetooth for data acquisition (10Hz), analogue-to-digital conversion and subsequent analysis using native software (Oxysoft version 2.1.6; Artinis Medical Systems). The software calculates changes in light absorption at the different wavelengths (750 and 850 nm) and converts them to relative concentrations of oxyhaemoglobin (O_2Hb) and deoxyhemoglobin (HHb) using the modified Lambert law to correct for light scattering within the tissue. A fixed value of 4 for the differential path-length factor (DPF) was used to calculate absolute difference changes. Blood volume (tHb) was calculated as O_2Hb + HHb and muscle oxygen saturation (SmO_2) was calculated as [O_2Hb/tHb]*100 using the spatially resolved spectroscopy method.

The following NIRS parameters were considered for statistical analysis: 1) SmO_2 and tHb at baseline (Pre), 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 seconds of exercise and exercise recovery; 2) minimum SmO_2 amplitude (ΔSmO_{2min}), which corresponds to the difference between minimum SmO_2 during the exercise and the average SmO_2 baseline (30 s before to the onset of the exercise); 3) SmO_2 half-deoxygenation time ($\Delta SmO_{2½DT}$), which corresponds to the period of time between the start of the exercise until SmO_2 reaches 50% of the difference between baseline SmO_2 and the minimum SmO_2 during the exercise; 4) SmO_2 maximum amplitude (ΔSmO_{2max}) was identified as the amplitude corresponding to the maximum SmO_2 within 60 s of the exercise recovery; and 5) SmO_2 half-reoxygenation time ($\Delta SmO_{2½RT}$), which corresponds to the time required for reach 50 % of the difference between SmO_2 at the end of the contraction phase and SmO_{2max} in the exercise recovery; 6) Exercise and exercise recovery tHb amplitude (ΔtHb_{Ex} and ΔtHb_{Rec}, respectively) was identified as the

the difference between the maximum and minimum tHb values within exercise and exercise recovery period.

Forearm Muscle Strength

Dominant handgrip strength was measured by using an adjustable, hydraulic handgrip dynamometer (JAMAR, Model 5030J1, Sammons Preston Roylan, Bolingbrook, IL, USA). The procedures of the handgrip strength measurement were performed as described by Beam and Adams (14). In brief, the subjects were in the standing position with head in the midposition (facing straight ahead). The grip size was adjusted so that the middle finger's (third digit's) midportion (second phalanx) was approximately at a right angle (the grip setting was recorded and used for further tests on the same subject). The subject's forearm was placed at 90° of the upper arm and the subject's wrist and forearm were at the midprone position. The subject performed maximally and quickly after hearing the technician's instructions. Three repetitions were performed with 30 s of rest between repetitions at baseline, immediately after the handgrip exercise protocol (IP-Ex), and approximately 30 min after exercise (+30). Each attempt was terminated when force showed a clear stagnation or a decrease. The maximal voluntary contraction (MVC) force was recorded in kg and converted to newtons by multiplying the kg value by 9.8067. The strength values were expressed by the difference with baseline values (in newtons) and adjusted to each subject's body weight.

Exercise Protocol

The exercise consisted of rhythmic contractions of their forearm muscles at a controlled rate (120 contractions per minute, 0.5-s contraction/0.5-s relaxation) and range of motion (10-cm excursion of the pulley wire with each contraction). Each subject completed

one 1-min bout of exercise at 30% of the MVC of each subject, with 1 min of quiet recovery. Subjects were in a supine position and used the dominant arm to perform the exercise.

Clinical Blood Pressure and Heart Rate Measurement

Systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart rate (HR) measurements were taken in triplicate in the seated position using a validated blood pressure monitor (Bp791it, Omron Co., Tokyo, Japan) with appropriate-sized upper arm cuff after 5 minutes of rest. Measurements were made at T0, T90 and T180.

Statistical Analysis

The normality, homogeneity of variances and sphericity of the data were examined with the Shapiro-Wilk, Levene and Mauchly tests, respectively. Paired t-test was used to identify differences in the muscle oxygenation parameters (ΔSmO_{2min}, ΔSmO_{2max}, $\Delta SmO_{2½DT}$, $\Delta SmO_{2½RT}$) and blood volume (ΔtHb_{Ex} and ΔtHb_{Rec}) between BG and PLA interventions. A two-way ANOVA with repeated measures on the two factors (intervention and time) was used to identify differences in SmO_2, tHb, forearm muscle strength, urinary nitrite and nitrate, SBP and DBP between BG and PLA. When a significant *F* was found, additional post-hoc tests with Bonferroni adjustment were performed. Statistical significance was set at the 0.05 level of confidence. All analyses were performed using a commercially available statistical package (IBM SPSS Statistics version 23 for Mac, Chicago, IL), and the results were expressed as means ± standard deviation (SD).

Results

Of the twenty-six subjects in the randomization phase of the study, twelve (three men and nine women) completed the study. Eleven subjects withdrew for personal reasons and

three subjects due to illness unrelated to the study. The baseline volunteers' characteristics are shown in **Table 1**.

Table 1. Baseline characteristics of the subjects that completing the study[1].

Characteristic	Value
n (female)	12 (9)
Age, years	68.8 ± 3.5
Body mass, kg	70.4 ± 8.7
BMI, kg/m^2	29.3 ± 3.0
Waist circumference, cm	97.5 ± 9.0
MVC, N	26.5 ± 5.79

[1]Results are expressed as mean ± SD. BMI = Body Mass Index, MVC = Maximal Voluntary Contraction.

Muscle Oxygenation and Blood Volume

Values of the ΔSmO_{2min}, $\Delta SmO_{2½DT}$, ΔSmO_{2max} and $\Delta SmO_{2½RT}$, ΔtHb_{Ex} and ΔtHb_{Rec} are presented in the **Table 2**. Changes in SmO_2 and tHb during the exercise and exercise recovery are shown in **Figure 2**. When compared to PLA consumption, it was observed that BG consumption led to a faster $\Delta SmO_{2½RT}$, a decrease in SmO_2 at 20, 30, 40, 50 and 60 seconds of exercise and an increase in tHb at 30 and 40 seconds of exercise recovery (**Table 2** and **Figure 2**). No significant differences were observed in ΔSmO_{2min}, $\Delta SmO_{2½DT}$ and ΔSmO_{2max} between both BG and PLA conditions.

Table 2. Changes in muscle oxygenation and blood volume parameters[1].

Parameter	BG	PLA
ΔSmO_{2min} (%)	- 13.68 ± 6.77	- 10.70 ± 5.02
$\Delta SmO_{2½DT}$ (s)	15.92 ± 7.25	18.42 ± 7.48
ΔSmO_{2max} (%)	0.88 ± 3.69	1.27 ± 1.98
$\Delta SmO_{2½RT}$ (s)	8.29 ± 10.75*	15.75 ± 8.38
ΔtHb_{Ex} (µM)	10.48 ± 5.83	9.99 ± 3.39
ΔtHb_{Rec} (µM)	10.25 ± 5.47*	6.72 ± 4.55

[1]Results are expressed as means ± SD. SmO_2 = muscle oxygenation, tHb = blood volume. *Significantly different from PLA ($p < 0.05$).

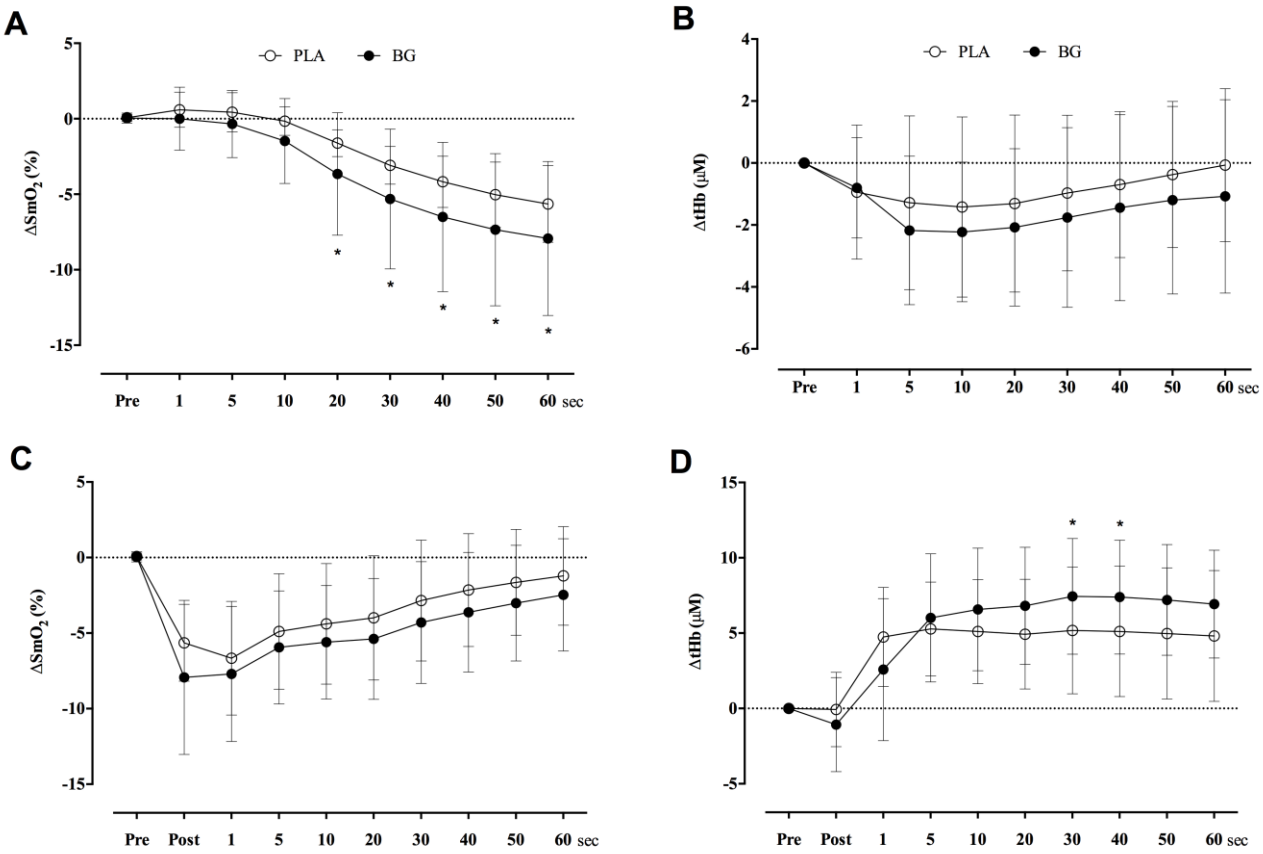


Figure 2. Muscle oxygenation (ΔSmO_2, %) and blood volume (ΔtHb, µM) during (**A** and **B**, respectively) and following (**C** and **D**, respectively) the rhythmic handgrip exercise after beetroot-based nutritional gel (BG) and nitrate-depleted gel (PLA) intervention. Pre = baseline; Post = post-exercise. *Significantly different from PLA ($p < 0.05$).

Forearm Muscle Strength

Changes in maximal voluntary contraction (MVC) of the forearm muscle immediately after exercise (IP-Ex) and 30 minutes of recovery (+30) after BG and PLA consumptions are presented in **Figure 3**. No significant difference was observed for forearm strength at IP-Ex (-0.71 ± 0.40 N *vs* -0.77 ± 0.45 N) after BG and PLA consumptions. However, BG consumption led to a reduction (-0.24 ± 0.18 N) in strength decline at +30 when compared to PLA consumption (-0.39 ± 0.20 N) **(Figure 3**).

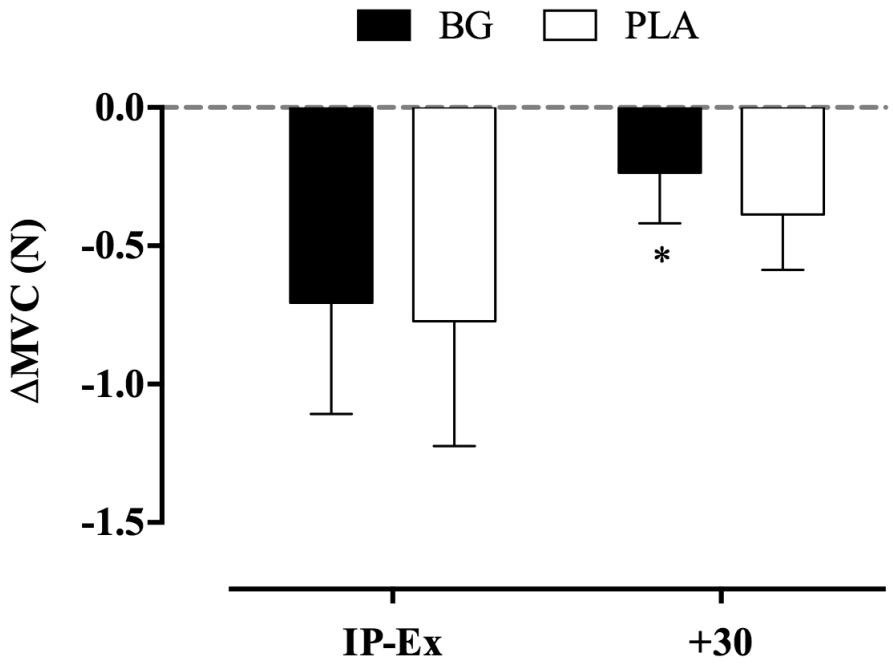


Figure 3. Changes in maximal voluntary contraction (ΔMVC, N) of the forearm muscle immediately after exercise (IP-Ex) and 30 minutes of recovery (+30) after beetroot-based nutritional gel (BG) and nitrate-depleted gel (PLA) consumption. *Significantly different from PLA ($p < 0.05$).

Urinary nitrite and nitrate analysis

The effect of consumption of BG and PLA on the urinary concentrations of nitrate and nitrite are show in **Table 3**. At T0 we observed low concentrations of nitrate and nitrite after consumption of BG and PLA, indicating that the subjects followed the diet instructions for avoid the intake of foods rich in nitrate and nitrite. Additionally, no differences were observed in urinary excretions of nitrate and nitrite between BG and PLA interventions. After 90 min

(T90), 150 min (T150) and 180 min (T180) the consumption of BG led to an increase in the urinary concentrations of nitrate (12000%, 210000% and 210000% respectively, on average) and nitrite (217,3%, 543,9% and 475,5% respectively, on average) when compared to T0. This increase was not observed after placebo consumption. Significant increases in urinary concentrations of both nitrite and nitrate were observed at T150 and T180 after BG consumption when compared to PLA consumption (**Table 3**).

Table 3. Urinary excretion of nitrate (mmol.mmol creatinine^{-1}) and nitrite (µmol.mmol creatinine^{-1}) before and after beetroot-based nutritional gel (BG) and nitrated-depleted gel (PLA) consumptions[1].

Variable	Treatment	T0	T90	T150	T180
Nitrate	BG	0.01 ± 0.01	0.12 ± 0.11	0.21 ± 0.16*	0.21 ± 0.12*
	PLA	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.04	0.02 ± 0.02
Nitrite	BG	0.98 ± 1.01	2.13 ± 1.45	5.33 ± 6.64*	4.66 ± 5.81*
	PLA	0.83 ± 0.52	1.36 ± 0.71	1.55 ± 0.89	1.10 ± 0.79

[1]Results are expressed as mean ± SD.*Significantly different from PLA ($p < 0.05$).

Clinical blood pressure measurement

The effect of consumption of BG and PLA on the SBP, DBP and HR are show in **Table 4**. At T0 we observed that all variables are similar in BG and PLA groups, suggesting that subjects started the study with the same characteristics. There were no differences ($p > 0.05$) found in SBP, DBP and HR along time independent of the intervention and between BG and PLA interventions at T0, T90 and T180.

Table 4. Values of systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart rate (HR) before and after beetroot-based nutritional gel (BG) and nitrated-depleted gel (PLA) consumptions[1].

Variable	Treatment	T0	T90	T180
SBP	BG	135.7 ± 19.2	129.1 ± 13.9	136.7 ± 21.7
(mmHg)	PLA	133.0 ± 12.1	132.4 ± 10.0	140.9 ± 15.9
DBP	BG	88.1 ± 16.6	84.3 ± 12.7	87.3 ± 12.7

(mmHg)	PLA	87.9 ± 11.4	85.5 ± 11.4	90.7 ± 8.1
HR	BG	68.3 ± 10.0	69.0 ± 9.8	62.2 ± 10.3
(bpm)	PLA	65.4 ± 10.2	62.9 ± 8.2	61.1 ± 8.1

[1]Results are expressed as mean ± SD.*Significantly different from PLA ($p < 0.05$).

Discussion

The aim of this study was to examine the effects of a single dose of a BG, which is rich in nitrate, on muscle oxygenation blood volume and forearm strength following the completion of a handgrip exercise protocol in older people. The major findings of this study are that a single dose of a BG rich in nitrate speeds up the time of muscle oxygenation during exercise recovery and reduces the decline in forearm strength after 30 minutes of exercise recovery. These results were associated with an increase in the muscle blood volume and in the urinary concentration of nitrate and nitrite. Together, these findings suggest that the BG promotes NO bioconversion, which may increase blood and oxygen delivery to active muscle and thereby prevent declines in strength.

NO bioavailability is compromised in the systemic circulation and in the musculature of sedentary ageing humans due to increased oxidative stress (15). In the current study, significant increases in the urinary concentrations of nitrate and nitrite were observed after approximately 2.5 h after BG consumption when compared to PLA consumption. These finding support the results of other study where significant increases were also observed in older people after a single dose of BG (10) and may suggest that there was absorption and a possible bioconversion of the dietary nitrate present in the BG into nitrite and, subsequently NO.

An association between ageing and reduced blood flow and O_2 delivery to the active muscle in aged subjects has been documented (16,17). The mechanisms underlying the attenuated local vasodilatory response can be explained in part by impaired NO availability

(17). NO may influence O_2 utilization by the cells, suggesting that O_2 delivery to the working muscle during exercise may be compromised in the elderly. In this scenario, improved NO bioconversion would likely increase blood flow and O_2 delivery to the contracting muscles. Ichimura *et al*. (4) observed prolongation of $\Delta SmO_{2½RT}$ in aging people, suggesting a decline in muscle oxidative capacity and impairs peripheral endothelial function in this population. In the present study, $\Delta SmO_{2½RT}$ was faster ($p < 0.05$) after BG consumption when compared to PLA consumption, along with a higher tHb, which indicates a greater O_2 delivery relative to O_2 consumption. Previous studies have also demonstrated improvements in muscle oxygenation status during moderate to severe exercise in healthy adults after beetroot consumption (6,7,8,9). This beneficial effect is probably at least partly explained by the improved bioconversion of the dietary nitrate present in the BG into NO, which have an important role in modulating vascular tone and blood perfusion. Furthermore, we recently showed that a single dose of BG improved endothelium-dependent dilation and blood flow velocity in the brachial artery after 5 minutes of ischemia in the elderly with cardiovascular risk factors (10).

Ageing has been associated with a reduced muscle oxygen extraction during exercise (15), which may limit maximal oxygen consumption and contribute to reduced muscle energy capacity (18). Although no significant difference was observed in SmO_{2min} ($p = 0.09$) in the present study, there was a significant decrease in SmO_2 during the handgrip exercise in BG as compared to PLA condition, which may indicate a greater muscle O_2 consumption of exercising muscle. This finding suggest that beetroot consumption may improve mitochondrial function in older people. Previous *in vitro* study has demonstrated that beetroot induce mitochondrial biogenesis and modestly increases basal cellular respiration without affecting respiratory capacity and proton leak (19). Larsen *et al*. (20) demonstrated that nitrate supplementation increased mitochondrial respiratory control ratio and P/O ratio during

submaximal ADP stimulation in isolated mitochondria of muscle tissue of healthy adults, indicating a better coupling between respiration and oxidative phosphorylation, and an improved mitochondrial efficiency, respectively. The effect of beetroot on the mitochondria may be mediated partially by the bioconversion of the nitrate present in this food into nitrite and NO, which has been demonstrated to be a key messenger to regulate mitochondrial number and function in various cell types (21,22).

Another important finding from this study is that BG prevented a decrease in the maximal isometric strength after handgrip exercise. Good handgrip strength in older people is important for successful performance in activities of daily living and occupational activities. The energy pathway predominantly involved in the MVC is the phosphagen system. Because the need for large amounts of adenosine triphosphate (ATP) is so urgent, the ATP and phosphocreatine (PCr) must be immediately available for the interacting muscle filaments – actin and myosin. A possible explanation for the effect of BG in preventing the decrease of handgrip strength could be increased resynthesis of PCr and ATP. Previous studies have reported a positive association between faster muscle reoxygenation measured by NIRS and faster PCr resynthesis after exercise (23,24,25,26). McCully *et al*. (27) simultaneously measured muscle oxygenation and PCr recovery after submaximal exercise in normal subjects using NIRS and phosphorus magnetic resonance spectroscopy, respectively, and found that the time constants of these indices were similar. The authors suggested that the reoxygenation is rate limiting for ATP synthesis, when evaluated as the rate of PCr recovery after submaximal exercise. Furthermore, nitrate increases the rate of human skeletal muscle PCr recovery after exercise in hypoxia, suggesting an augmented maximum rate of oxidative ATP synthesis (28), and it lowers the ATP cost of contractile force production (29). Thus, the faster $\Delta SmO_{2½RT}$ observed in the present study suggests that beetroot consumption may have improved PCr ressynthesis and, consequently, prevented force decline.

Although a single dose of BG increased urinary nitrite and promoted beneficial effects in some muscle oxygenation parameters, blood volume and handgrip strength in the present study, there were no significant changes in arterial blood pressure and HR. Previous studies also reported no significant changes in SBP, DBP and HR after a single dose of beetroot in the form of gel (10) and juice (30,31). It is important to point out that all participants of the present study made use of at least one pharmacologic agents for the treatment of hypertension (e.g.: angiotensin converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers, calcium channel blockers, and diuretics), which may have caused direct vasodilation and/or influenced the synthesis of NO (32). However, there is evidence demonstrating significant reduction in the SBP and DBP in treated hypertension patients after BJ consumption (33).

In summary, this is the first investigation into the effects of a single dose of a BG rich in dietary nitrate, on muscle oxygenation, blood volume, and strength in older adults. The results of the present study suggest that beetroot consumption improves muscle oxygenation status in older adults by increasing muscle O_2 extraction during handgrip exercise, and by speeding up the time for muscle oxygenation during exercise recovery, thereby reverting the age-related prolongation in post-exercise recovery time of muscle oxygenation and preventing the age-related decline in muscle function. Furthermore, the BG presented here may be a good nutritional strategy for encouraging vegetable consumption in older adults in order to improve NO bioconversion.

Ethical Standard

The experiments of the present work comply with the current laws of the country in which they were performed.

Conflict of Interest

The authors have no conflicts of interest that are directly relevant to the content of this manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Research Foundation of the State of Rio de Janeiro – FAPERJ (process n^{o}. E-26/111.297/2013 and E-26/110.309/2014). Funding was also provided from The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (process n°. 442977/2014-0).

References

1. Seals DR, Jablonski KL, Donato AJ (2011) Aging and vascular endothelial function in humans. Clin Sci (Lond)120(9):357-75.

2. Bhambhani YN (2004) Muscle oxygenation trends during dynamic exercise measured by near infrared spectroscopy. Can J Appl Physiol 29(4):504-523.

3. Kutsuzawa T, Shioya S, Kurita D, Haida M, Yamabayashi H (2001) Effects of age on muscle energy metabolism and oxygenation in the forearm muscles. Med Sci Sports Exerc 33(6):901-6.

4. Ichimura S, Murase N, Osada T *et al* (2006) Age and activity status affect muscle reoxygenation time after maximal cycling exercise. Med Sci Sports Exerc 38(7):1277-81.

5. Baião D, Conte-Junior CA, Paschoalin VM, Alvares TS (2016). Beetroot juice increase nitric oxide metabolites in both men and women regardless of body mass. Int J Food Sci Nutr 67(1):40-6.

6. Masschelein E, Van Thienen R, Wang X, Van Schepdael A, Thomis M, Hespel P (2012) Dietary nitrate improves muscle but not cerebral oxygenation status during exercise in hypoxia. J Appl Physiol 113(5):736-45.

7. Bailey SJ, Winyard P, Vanhatalo A, *et al* (2009). Dietary nitrate supplementation reduces the O2 cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. J Appl Physiol 107(4):1144-55.

8. Breese BC, McNarry MA, Marwood S, Blackwell JR, Bailey SJ, Jones AM (2013) Beetroot juice supplementation speeds O2 uptake kinetics and improves exercise tolerance during severe-intensity exercise initiated from an elevated metabolic rate. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 305(12):R1441-50.

9. Aucouturier J, Boissière J, Pawlak-Chaouch M, Cuvelier G, Gamelin FX (2015) Effect of dietary nitrate supplementation on tolerance to supramaximal intensity intermittent exercise. Nitric Oxide 49:16-25.

10. Oliveira GV, Morgado M, Pierucci AP, Alvares TS (2016) A single dose of a beetroot-based nutritional gel improves endothelial function in the elderly with cardiovascular risk factors. J Funct Foods 26:301.

11. Morgado M, de Oliveira GV, Vasconcellos J, *et al* (2016) Development of a beetroot-based nutritional gel containing high content of bioaccessible dietary nitrate and antioxidants. Int J Food Sci Nutr 67(2):153-60.

12. Croitoru MD (2012) Nitrite and nitrate can be accurately measured in samples of vegetal and animal origin using an HPLC-UV/VIS technique. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 911:154-161.

13. Van Beekvelt MC, Borghuis MS, van Engelen BG, Wevers RA, Colier WN (2001). Adipose tissue thickness affects in vivo quantitative near-IR spectroscopy in human skeletal muscle. Clin Sci (Lond) 101(1):21-8.

14. Beam WC, Adams GN (2014) Isometric (Static) Strength. In: Exercise Physiology Laboratory Manual, 7thedn. New York: McGrall-Hill 47-54.

15. Nyberg M, Blackwell JR, Damsgaard R, Jones AM, Hellsten Y, Mortensen SP (2012) Lifelong physical activity prevents an age-related reduction in arterial and skeletal muscle nitric oxide bioavailability in humans. J Physiol 590(21):5361-70.

16. Kirby BS, Crecelius AR, Voyles WF, Dinenno FA (2012) Impaired skeletal muscle blood flow control with advancing age in humans: attenuated ATP release and local vasodilation during erythrocyte deoxygenation. Circ Res 111(2):220-30.

17. Hearon CM Jr, Dinenno FA (2016) Regulation of skeletal muscle blood flow during exercise in ageing humans. J Physiol 594(8):2261-73.

18. Conley KE, Esselman PC, Jubrias SA, *et al* (2000) Ageing, muscle properties and maximal O2 uptake rate in humans. J Physiol 526 Pt 1:211-7.

19. Vaughan RA, Gannon NP, Carriker CR (2015) Nitrate-containing beetroot enhances myocyte metabolism and mitochondrial content. J Tradit Complement Med 6(1):17-22.

20. Larsen FJ, Schiffer TA, Borniquel S, Sahlin K, Ekblom B, Lundberg JO, Weitzberg E (2011) Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. Cell Metab 13(2):149-59.

21. Nisoli E, Falcone S, Tonello C *et al* (2004) Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. Proc Natl Acad Sci USA 101(47):16507-12.

22. Nisoli E, Carruba MO (2006). Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. J Cell Sci 119(Pt 14):2855-62.

23. Chance B, Dait MT, Zhang C, Hamaoka T, Hagerman F (1992) Recovery from exercise-induced desaturation in the quadriceps muscles of elite competitive rowers. Am J Physiol 262(3 Pt 1):C766-75.

24. Boushel R, Pott F, Madsen P *et al* (1998) Muscle metabolism from near infrared spectroscopy during rhythmic handgrip in humans. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 79(1):41-8.

25. Hanada A, Okita K, Yonezawa K *et al* 2000 Dissociation between muscle metabolism and oxygen kinetics during recovery from exercise in patients with chronic heart failure. Heart 83(2):161-6.

26. Brizendine JT, Ryan TE, Larson RD, McCully KK (2013) Skeletal muscle metabolism in endurance athletes with near-infrared spectroscopy. Med Sci Sports Exerc 45(5):869-75.

27. McCully KK, Iotti S, Kendrick K *et al* (1994) Simultaneous in vivo measurements of HbO2 saturation and PCr kinetics after exercise in normal humans. J Appl Physiol 77(1):5-10.

28. Vanhatalo A, Fulford J, Bailey SJ, Blackwell JR, Winyard PG, Jones AM (2011) Dietary nitrate reduces muscle metabolic perturbation and improves exercise tolerance in hypoxia. J Physiol 589(Pt 22):5517-28.

29. Bailey SJ, Fulford J, Vanhatalo A *et al* (2010) Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. J Appl Physiol 109(1):135-48.

30. Gilchrist M, Winyard PG, Aizawa K, Anning C, Shore A, Benjamin N (2013) Effect of dietary nitrate on blood pressure, endothelial function, and insulin sensitivity in type 2 diabetes. Free Radic Biol Med 60:89-97.

31. Bondonno CP, Liu AH, Croft KD *et al* (2015) Absence of an effect of high nitrate intake from beetroot juice on blood pressure in treated hypertensive individuals: a randomized controlled trial. Am J Clin Nutr 102(2):368-75.

32. Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J (2002) Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. Circ Res 90(1):21-8.

33. Kapil V, Khambata RS, Robertson A, Caulfield MJ, Ahluwalia A (2015). Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. Hypertension 65(2):320-7.