



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FABIANA CRISTINA BARREIROS DA CUNHA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO
COM FLAVONOIDE DIOSMINA NA DOR
MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO EM HUMANOS**

Londrina
2024

FABIANA CRISTINA BARREIROS DA CUNHA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO
COM FLAVONOIDE DIOSMINA NA DOR
MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO EM HUMANOS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Estadual de Londrina – UEL
como requisito para obtenção de título de
Mestre em Ciências Da Saúde.

Orientador: Prof.º Dr. Sergio M. Borghi

LONDRINA 2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F118a Cunha, Fabiana Cristina Barreiros.
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FLAVONOIDE DIOSMINA NA DOR MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO EM HUMANOS / Fabiana Cristina Barreiros Cunha. - Londrina, 2024.
61 f. : il.

Orientador: Sergio Marques Borghi.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2024.
Inclui bibliografia.

1. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FLAVONOIDE DIOSMINA NA DOR MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO EM HUMANOS - Tese. I. Borghi, Sergio Marques. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO
COM FLAVONOIDE DIOSMINA NA DOR
MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO EM HUMANOS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Estadual de Londrina – UEL
como requisito para obtenção de título de
Mestre em Ciências Da Saúde .

Dr. Sergio Marques Borghi
Universidade Estadual de Londrina

Dra. Mariana Marques Bertozzi
Universidade Estadual de Londrina

Dr. André Wilson de Oliveira Gil
Universidade Norte do Paraná

Londrina, ____ de ____ de ____.

AGRADECIMENTOS

Durante essa fase de dedicação ao mestrado contei com o apoio de algumas pessoas essenciais, que acreditaram que meus sonhos podem ser alcançados, estas na quais não posso deixar de expressar gratidão.

Primeiramente a Deus, por me proporcionar a oportunidade de cumprir essa jornada.

Agradeço aos meus familiares, principalmente ao meu esposo e filhos pela compreensão, apoio e cuidados durante esse período.

Ao meu orientador, professor Dr. Sergio Marques Borghi, agradeço a oportunidade, paciência e conhecimentos, não seria possível concluir essa jornada sem seus ensinamentos e orientação, também agradeço aos Professores Eros e Jayne, por todo apoio, colaboração e conhecimento durante a realização dos testes.

Aos meus colegas de que contribuíram no laboratório, pela contribuição que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, estendo o agradecimento a minha amiga Nathalia Antunes por me envolver ao mundo científico, através do grupo de pesquisa de exercício físico na promoção e prevenção da saúde, ampliando meu interesse em pesquisa.

Ao time de futsal feminino de Londrina, pela participação e colaboração com a pesquisa. Aos membros da banca, Dra. Mariana Marques Bertozzi e Dr. André Wilson de Oliveira Gil, pelo aceite ao convite de participação na banca examinadora.

Foi um imenso privilégio e realização de um sonho, a imersão em pesquisa na Universidade Estadual de Londrina, em especial no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, foi uma jornada desafiadora, complexa e valiosa, que esse estudo possa contribuir para sociedade, e crescimento da ciência, e que ao fim dessa jornada venham o início da realização de novos sonhos e desafios.

RESUMO

Cunha, Fabiana Cristina Barreiros. **Avaliação dos efeitos da suplementação com flavonoide diosmina na dor muscular de início tardio em humanos**. 2024. 61 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

Os benefícios do exercício físico para a prevenção e o tratamento de algumas doenças metabólicas, cardiovasculares, neurológicas, inflamatórias crônicas e psiquiátricas, têm sido citados e documentados na literatura científica, impactando na qualidade de vida e saúde da população. Devido aos resultados proporcionados pelo exercício físico, esse teria a possibilidade de alterar o desenvolvimento de algumas doenças e seu desfecho. Órgãos governamentais e profissionais de saúde, orientam a prática de atividade e exercício físico para prevenção e tratamento de doenças. No entanto, a prática habitual pode ser prejudicada por alguns fatores, como a dor. Nesse sentido, a dor muscular de início tardio (DMIT), presente no período de recuperação pós-exercício, essa manifestação dolorosa desta condição pode representar um impedimento na população em geral para prática de atividade física e dificultar alto desempenho em atletas profissionais. Verificamos os efeitos do flavonoide diosmina no tratamento na DMIT em atletas de futsal feminino. Os grupos receberam diosmina 750 mg e placebo (cápsula de amido de milho) via oral, passaram por modalidade de exercício dinâmico intenso proposto até a falha, foram realizadas as avaliações de dor através da escala visual analógica (EVA) realizando as seguintes atividades, palpação do quadríceps, sentar e levantar da cadeira, subir e descer escada, teste de recuperação muscular em cadeira extensora com isometria, avaliação do equilíbrio postural, postura bipodal e unipodal direito e esquerdo, coleta de sangue para verificação de marcadores de lesão muscular e capacidade antioxidante, todos os testes foram realizados nos períodos basal (antes da intervenção), 24 e 48 horas da realização de exercício dinâmico intenso. Embora o DSM não tenha tido um efeito maior do que o placebo no desempenho atlético, apresentou efeitos de pequeno a moderado, contendo danos oxidativos (através da redução da peroxidação lipídica) e efeitos analgésicos triviais a moderados sobre a dor muscular, dependendo da condição. Além disso, o DSM forneceu efeitos pequenos a moderados na prevenção da força muscular reduzida e na melhoria do equilíbrio postural.

Palavras-chave: Dor muscular de início tardio, exercício dinâmico intenso, DOMS, esportes, atletas de futsal, estresse oxidativo e diosmina.

ABSTRACT

Cunha, Fabiana Cristina Barreiros. Evaluation of the effects of supplementation with flavonoid diosmine on late onset muscle pain in humans. 2024. 61 pages. Dissertation (MSc in Health Sciences) – Londrina State University, Londrina, 2024.

The benefits of physical exercise for the prevention and treatment of some metabolic, cardiovascular, neurological, chronic inflammatory, and psychiatric diseases have been cited and documented in the scientific literature, impacting on the quality of life and health of the population. Due to the results provided by physical exercise, it could alter the development of some diseases and their outcome. Government agencies and health professionals guide the practice of activity and physical exercise for the prevention and treatment of diseases. However, the usual practice may be impaired by some factors, such as pain. In this sense, late-onset muscle pain (DMIT), present in the post-exercise recovery period. This painful manifestation of this condition can represent an impediment in the general population to practice physical activity and hinder high performance in professional athletes. We checked the effects of flavonoid diosmine on DMIT treatment in female futsal athletes. The groups received diosmine 750 mg and placebo (capsule of corn starch) orally, passed the proposed intensive dynamic exercise modality until the failure, pain assessments were performed through the analogue visual scale (EVA) performing the following activities, quadriceps palpation, sitting and raising from the chair, climbing and descending stairs, muscle recovery test in extendable chair with isometria, assessment of postural balance, bipodal and unipodal right and left posture, blood collection for checking markers of muscle injury and antioxidant capacity, all the tests were carried out in the baseline periods (before the intervention), 24 and 48 hours of the intensive exercise. Although DSM did not have a greater effect than placebo on athletic performance, it showed effects from small to moderate, containing oxidative damage (through reduction of lipid peroxidation) and trivial to moderately analgesic effects on muscle pain, depending on the condition. In addition, DSM provided small to moderate effects in preventing reduced muscle strength and improving postural balance.

Keywords: Late onset muscle pain, intensive dynamic exercise, DOMS, sports, futsal athletes, oxidative stress and diosmin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos envolvidos na dor muscular de início tardio	13
Figura 2 – Estrutura Diosmina	16
Figura 3 – Metodologia	21
Figura 4 – Escala visual analógica	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ATP	Trifosfato de adenosina
CDP	Centro de pressão
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK	Creatina quinase
DMIT	Dor muscular de início tardio
DSM	Diosmina
DOMS	Dor muscular tórdio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EVA	Escala visual analógica
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
GSH	Glutationa reduzida
IL-6	Interleucina-6
LPS	Lipopolisacarideo
LDH	Lactato desidrogenase
MDA	Malondialdeído
NBT	Tetrazólio nitroazul
NF-κB	Fator nuclear kappa b
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Proteína C reativa
PTX-3	Pentraxin-3
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TEAC	Atividade antioxidante equivalente ao Trolox

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 EXERCÍCIO FÍSICO E DOR MUSCULAR TARDIA	11
1.2 EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA DOR MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO	14
1.3 FLAVONOIDES	15
1.4 DIOSMINA	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES	17
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	18
3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO	18
3.4 AVALIAÇÃO DA DOR MUSCULAR	22
3.5 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE SANGUE E AVALIAÇÃO DOS MARCADORES PLASMÁTICOS	23
3.6 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	23
3.7 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO FÉRRICA	24
3.8 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NITROAZUL DE TETRAZÓLIO	24
3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO ABTS	24
3.10 QUANTIFICAÇÃO DO COMPONENTE ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICO GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	25
3.11 TESTES DE DESEMPENHO DE RECUPERAÇÃO MUSCULAR	25
3.12 AVALIAÇÃO DO EQUILÍBRIO POSTURAL	26
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	28
5. CONCLUSÃO	56
6. REFERÊNCIAS	57
7. ANEXO	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 EXERCÍCIO FÍSICO E DOR MUSCULAR TARDIA

Nas últimas décadas a expectativa de vida da população em geral aumentou substancialmente, devido a redução da mortalidade infantil e a conscientização proveniente de políticas públicas, melhoria do saneamento e redução do uso de tabaco. Com o aumento da longevidade é possível observar também o aparecimento de doenças inflamatórias crônicas, como doença de Alzheimer, diabetes, hipertensão, artrite, doenças pulmonares obstrutivas crônicas, dor crônica generalizada, dores na coluna e outras (PEDERSEN; SALTIN, 2015, RICE et al., 2019). Essas originadas pelo processo natural do envelhecimento. Sendo assim, faz necessário medidas que possam prevenir, ou amenizar prejuízos decorrentes da alteração do perfil populacional observado nas últimas décadas.

Atualmente, estão sendo feitos diversos esforços para incentivar a prática de atividade física habitual, considerando que esta proporciona diversos benefícios à saúde (VINA et al., 2012, STRATH et al., 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS), orienta a realização de 150 minutos de atividade física aeróbica de intensidade moderada e atividades de fortalecimento muscular por semana. A atividade e exercício físico possuem efeitos profiláticos e terapêuticos em doenças inflamatórias crônicas (PEDERSEN; SALTIN, 2015, RICE et al., 2019).

Os mecanismos celulares e moleculares regulados pelo exercício são comparados aos alcançados pelos farmacológicos, considerando o exercício potencial capacidade terapêutica para ser usada no tratamento de diversas condições patológicas (VINA et al., 2012, PEDERSEN; SALTIN, 2015), sem os efeitos adversos esperados, observados após a uso de drogas sintéticas. Infelizmente, a habitualidade dos indivíduos à atividade física e exercícios pode ser gravemente comprometida pelo aparecimento da dor muscular de início tardio (LIMA; ABNER; SLUKA, 2017).

A DMIT caracteriza-se pela sensação desconfortável no tecido muscular, que ocorre frequentemente 24 a 72 horas após a realização de exercícios com

predominância de ações excêntricas, de longa duração, ou de alta intensidade. Ela está associada à resposta inflamatória com aumento da produção dos níveis de mediadores inflamatórios como citocinas e radicais livres (MACINTYRE; REID; MCKENZIE, 1995, HAYASHI et al., 2019). Podendo essa persistir por até 7 dias, em atletas de alto nível a DMIT ocorre em decorrência de sobrecarga durante os treinamentos, ou ritmo intenso de trabalho, sendo um fator complicador para conquista de metas de rendimento durante as mais variadas modalidades esportivas, para atletas de elite, a prevalência de DMIT é mais pronunciada no início da época desportiva quando regressam à realidade dos treinos após um período de inatividade, podendo assim ter um impacto negativo sobre o desempenho. (ALVES; COSTA; SAMULSKI, 2006, TANSKANEN; ATALAY; UUSITALO, 2010, KREHER; SCHWARTZ, 2012).

Os sintomas da DMIT incluem sensibilidade a palpação (toque), principalmente na junção musculotendínea, localização esta que pode ser atribuída a uma alta concentração de receptores de dor muscular no tecido conjuntivo da região miotendínea. Além disso, outros sintomas incluem edema muscular, perda da amplitude de movimento, da flexibilidade, e da produção de força, assim como comprometimento proprioceptivo (CHEUNG; HUME; MAXWELL, 2012; LUQUE ET AL., 2023).

Diversos mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento da DMIT. Sendo assim a hipótese de que o mecanismo da DMIT é iniciado no momento da prática do exercício, com tensões no sarcômero, resultando em acúmulo intracelular de cálcio, inibindo a respiração celular e consequentemente prejudicando a produção de trifosfato de adenosina (ATP), causando uma maior degradação da unidade funcional do músculo. Causando danos tecidual ao músculo, ocorrendo a liberação de ATP para o meio extracelular, o qual se liga a receptores P2X3 promovendo ativações neuronais, aumentando a secreção de neuropeptídeos, modificando as propriedades micro vasculatura do local, causando edema e inflamação (LUQUE et al., 2023).

Esse microtrauma inicial é seguido por um processo inflamatório, aumentando os níveis de citocinas e estresse oxidativo (LEWIS et al. 2012). Na DMIT, o estresse oxidativo aumentado gerado pelo músculo sobrecarregado é agravado por células imunes recrutadas, intensificando a ativação dos neurônios sensoriais nociceptores, contribuindo para dor, a DMIT é um grande desafio para

medicina esportiva, em indivíduos sedentários esses sintomas podem ser ainda mais significativos. A figura 1 apresenta os eventos fisiopatológicos associados à dor muscular, com foco na lesão e dor muscular induzidas pelo exercício.

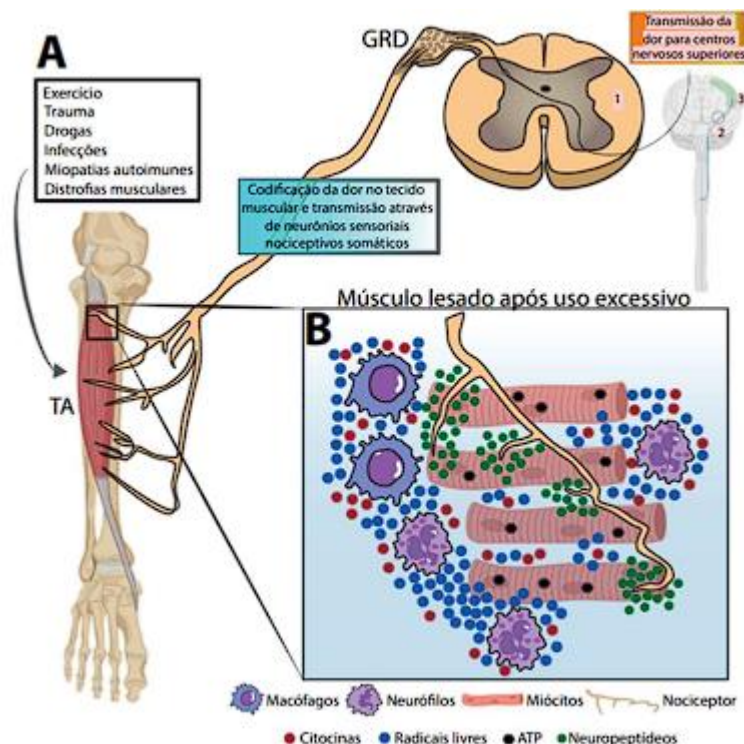


Figura 1- Mecanismos relacionados à DMIT. A: Condições que levam a percepção da dor muscular. Neurônios sensoriais nociceptores no músculo são ativados por estímulos nocivos e transmitem estas informações para a medula espinal (1), que age como estrutura de integração entre a periférica e centros nervoso superiores, como o tálamo (2) e o córtex sensorial (3). B: Painel com aumento para demonstração dos eventos que ocorrem durante a condição da lesão. Lesões no tecido muscular esquelético liberam ATP para o meio extracelular, o qual se liga aos receptores P2X3 e promovem a ativação neuronal, que por sua vez aumenta a secreção de neuropeptídeos que modificam as propriedades da microvasculatura local, causando edema e inflamação; A resposta inflamatória com aumento dos níveis de citocinas e estresse oxidativo é agravada com o recrutamento de leucócitos, intensificando a ativação dos neurônios sensoriais nociceptores, contribuindo para a dor. TA: tibial anterior. GRD: gânglio da raiz dorsal. Fonte: Borghi, Luque et al. 2022.

Sendo assim, o manejo do período de recuperação pós-exercício é indispensável para o sucesso dos programas de exercício físico, que envolvem praticantes em geral e atletas, é de extrema importância encurtar o tempo de recuperação pós-exercício dos atletas e praticantes afetados, para que a compromisso da prática regular de atividade física e desempenho dessas atividades não seja comprometido, a DMIT pode deixar os atletas mais vulneráveis ao risco de lesões secundárias. (SILVA, M.F.M. et al. 2013).

Dessa forma a utilização de condutas terapêuticas e profiláticas para aprimorar o processo de recuperação pós-exercício, minimizando condições desagradáveis ocasionadas pelo exercício, passam a ser benéfico (SILVA, M.F.M. et al. 2013).

1.2 EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA DOR MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO

Os dados epidemiológicos precisos sobre DMIT estão em falta, devido ao elevado número de casos não avaliados e ausência de clareza para o diagnóstico da DMIT. Desta forma, uma anamnese e um exame clínico composto por inspeção, palpação (toque) e testes funcionais dos grupos musculares afetados podem fornecer informações importantes sobre a extensão e gravidade de uma lesão muscular.

Diversos biomarcadores podem ser avaliados por métodos moleculares para confirmar o exame clínico, como creatina quinase (CK), proteína C reativa (PCR), interleucina 6 (IL-6), pentraxin-3 (PTX-3) e lactato desidrogenase (LDH). Apesar da diversa lista de alvos moleculares, eles são considerados inespecíficos para o diagnóstico, por serem marcadores envolvidos em vários processos fisiológicos.

Foram realizadas diversas estratégias de tratamento, e avaliadas para promover alívio para a DMIT e recuperação rápida dos indivíduos afetados. Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) demonstram eficácia em alguns estudos, porém possuem efeitos adversos relacionados ao uso prolongado, desde úlceras estomacais, danos renais e hepáticos, pode levar a uma pior recuperação e adaptação muscular pós-treino, piora no desempenho e maior risco de lesões, por isso o uso crônico não é recomendado (SILVA, M.F.M. et al. 2013). Outra preocupação associada considera, que o encorajamento do uso de anti-inflamatórios para tais finalidades pode favorecer o uso indiscriminado de substâncias para outros propósitos, que por sua vez podem contribuir para danos à saúde do usuário (SILVA, M.F.M. et al. 2013).

Outros tratamentos como alongamento e eletroestimulação não se mostraram eficazes como terapia para a dor muscular tardia. A habitualidade na

prática de exercício representa a melhor opção para aliviar a dor muscular tardia, porém, com efeito transitório (CHEUNG; HUME; MAXWELL, 2012).

Desta forma, a avaliação de compostos naturais com comprovados efeitos biológicos benéficos (FERRAZ, CARVALHO et al. 2020), efeitos adversos reduzidos, como os flavonoides, podem representar uma interessante alternativa para controle da dor muscular tardia induzida pelo exercício, consequentemente, melhores índices de adesão e permanência em programas de exercício, aperfeiçoando resultados na performance esportiva.

De fato, compostos antioxidantes surgem como moléculas promissoras, sugerindo melhor eficácia no tratamento da DMIT, considerando que a produção de radicais livres parece ter papel importante nos mecanismos fisiopatológicos relacionados à dor induzida pelo exercício (MACINTYRE et al. 1995, BUSSULO; FERRAZ, 2021). Uma revisão sistemática com meta-análise fornece evidências para recomendar a inclusão de alimentos ricos em flavonoides na dieta diária de atletas e indivíduos ativos dias antes da competição, visto que a ingestão de flavonoides pode melhorar a recuperação da força muscular e reduzir a dor muscular (CAREY; LUCEY; DOYLE, 2021).

1.3 FLAVONOIDES

Os flavonoides são substâncias naturais com estrutura fenólica variável, onde a síntese não ocorre na espécie humana. Geralmente encontrados em plantas, provenientes principalmente de folhas, frutas, flores e caules, apresentam diversas propriedades biológicas com possíveis aplicações médicas, que incluem ações protetoras para o fígado, antitumorais, antimicrobianas, antioxidantes, antialérgicas, anti-inflamatórias e analgésicas, contribuindo para melhor recuperação e adaptação muscular. De acordo com a sua estrutura, os flavonoides podem ser divididos em classes, sendo elas flavonóis, flavanonas, flavonas, chalconas, isoflavonas, flavonóis e antocianinas (HOHMANN et al. 2015, FERRAZ et al. 2020).

As flavanonas que tem como principais representantes a hesperidina e a naringenina, são encontradas exclusivamente em frutas cítricas (LUQUE et al. 2022).

1.4 DIOSMINA

O flavonoide diosmina (diosmetina-7-O-rutinosídeo) é um glicosídeo cítrico da classe das flavonas de ocorrência natural, que é obtido a partir da desidrogenação da hesperidina, a diosmina oral é hidrolisado no intestino, realizando o metabolismo ativo da glicona diosmetina, e posteriormente absorvido. Entre as recomendações para uso clínico no Brasil com autorização da Anvisa, a diosmina é utilizada em combinação com outro flavonoide da classe das flavanonas.

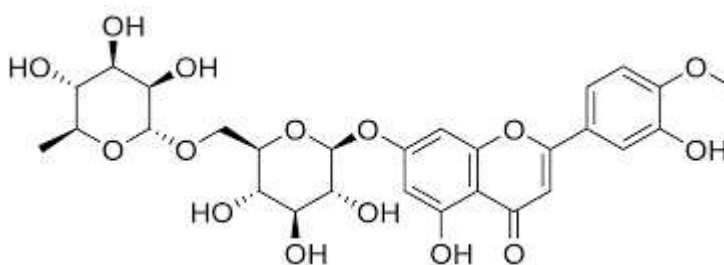


Figura 2 – Estrutura Diosmina – Fonte: Pires-Leonardo et al.,2019

Adicionalmente, daflon (500 mg) é um fármaco composto de 90% diosmina e 10% hesperidina, amplamente utilizado na clínica para o tratamento de doença venosa crônica, uma condição acompanhada por uma resposta inflamatória proeminente e dor membros inferiores, sendo muito bem aceito, e apresentando baixa porcentagem de efeitos colaterais adversos (STREFEZZA, 2010).

Desta maneira, o presente estudo tem como proposta avaliar o potencial terapêutico da diosmina em modelo de DMIT no período de pré-temporada de uma equipe de futsal do campeonato brasileiro feminino, já que este flavonoide ainda não foi testado para tal finalidade em humanos, sendo um potencial estudo para ser conduzido na intenção de proporcionar avanços no controle desta condição. A identificação de ferramentas que possam controlar efeitos indesejáveis proporcionados pela atividade física não habitual, como a dor, favorecem a promoção do exercício, e consequentemente, seu uso para o tratamento de diversas doenças, também aperfeiçoamento do desempenho das

práticas nos treinos e evitar ausências em dias de treinos e competições oficiais. (PEDERSEN; SALTIN, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Analisar os potenciais efeitos da suplementação com o flavonoide diosmina na DMIT em humanos (mulheres, atletas de futsal), utilizando o protocolo de exercício dinâmico intenso proposto.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se o tratamento com o flavonoide diosmina reduz a dor muscular induzida pelo protocolo de exercício dinâmico intenso;

Avaliar se o tratamento com o flavonoide diosmina reduz os níveis de estresse oxidativo (peroxidação lipídica e capacidade antioxidante) induzidos pelo protocolo de exercício dinâmico intenso;

Avaliar se o tratamento com o flavonoide diosmina é capaz de melhorar a redução do desempenho muscular e prejuízo do equilíbrio induzidos pelo protocolo de exercício dinâmico intenso.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES

O presente projeto foi realizado através de ensaio clínico cruzado randomizado, duplo-cego (voluntários e avaliadores) e controlado por placebo, projetos cruzados são estatisticamente eficientes e requerem menos participantes do que projetos paralelos, o processo de randomização foi realizado por meio de uma tabela de números aleatórios ([https:// www. aleatório. org](https://www.aleatório.org)). Um N de 15 mulheres atletas de futsal, idades entre 17 e 30 anos, 80%, (n

= 12) dominante perna direita e 20%, (n = 3) dominante perna esquerda, recrutadas para o estudo. Os critérios avaliados para inclusão das participantes voluntários no projeto eram, ser atleta do time de futsal feminino, e estarem aptas a realizar o protocolo de exercício dinâmico intenso proposto. Os testes foram realizados entre janeiro de 2024 e março de 2024. Durante o período experimental procedimentos, as atletas da seleção feminina de futsal da cidade de Londrina (Londrina Esporte Clube), Paraná, Brasil, em período de pré-temporada antes de disputar a liga nacional de futsal feminino.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Nos estudos que envolvem a participação de seres humanos, a pesquisa decorreu de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto desenvolveu-se devidamente submetido para avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) para Seres Humanos/Plataforma Brasil, a aprovação ética foi concedida pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Universidade do Norte do Paraná (protocolo de aceitação número 5.809.085, de 12 dezembro de 2022).

As participantes selecionadas foram informadas sobre os objetivos e metodologia do estudo, e quando houve concordância com o delineamento proposto, o acordo de participação voluntária no estudo foi registrado por Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE). O TCLE das participantes que não obtiveram 18 anos completos, foi registrado e assinado pela responsável, no TCLE a total ciência e autorização do campus Piza da Universidade Norte do Paraná para realização do presente estudo.

3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo foi realizado em duas fases, cada fase contemplou o período de 5 dias, segunda-feira realização dos testes basais no laboratório de exercício

físico e administração das cápsulas pela preparadora física do time, terça-feira as participantes ingeriram as cápsulas conforme randomização na supervisão da preparadora física, quarta-feira aplicação de exercício dinâmico intenso e ingestão da cápsula, quinta-feira realização dos testes parâmetro 24 horas, sexta- feira realização dos testes parâmetro 48 horas), foi realizado intervalo de 15 dias entre a primeira e segunda fase, para limpeza do composto.

As participantes foram randomizadas em dois grupos experimentais, e utilizaram as cápsulas, conforme se segue: Grupo 1 - controle que recebeu suplementação com placebo (750 mg, amido de milho, formulado por Phloraceae Farmácia de Manipulação, Londrina, Paraná, Brasil). Grupo 2 - intervenção que recebeu suplementação com cápsulas de diosmina (750 mg, adquiridas em Nutrição Greenlife, EUA), as cápsulas foram administradas por via oral com água, as cápsulas eram opacas, os dois grupos realizaram o protocolo de exercício dinâmico intenso. Após a conclusão dos testes da primeira fase, e o intervalo de 15 dias, foi realizado a conversão entre os grupos 1 e 2, e repetição da semana de testes. Cada grupo experimental sucedeu-se na composição de um n aproximado de 15 participantes, o software G*Power (versão 3.0.1; Dusseldorf, Alemanha) foi utilizado para a determinação de um tamanho de amostra adequado.

A modalidade de exercício dinâmico intenso proposto (contrações concêntricas e excêntricas) para o estudo seguiu a seguinte abordagem: As participantes realizaram protocolo padronizado de lesão muscular, que consistiu em uma sequência de três séries de repetições até a fadiga de contrações musculares bilateral em aparelho de leg-press com angulação de 45° (NICOL et al. 2015), esse instalado em espaço físico de academia do laboratório de Fisiologia do Exercício, do Programa de Pós-Graduação em Mestrado e Doutorado Profissional em Exercício Físico na Promoção da Saúde. Cada participante teve sua carga definida previamente através do teste de 1 repetição máxima (1RM), e 70% do peso definido foi utilizado durante o protocolo de exercício dinâmico intenso. Durante cada ação, a carga utilizada resistida com as pernas alocadas no apoiador do leg-press desde a extensão total do joelho até a angulação de 90° de flexão de joelho, com duração aproximada de 3-5 segundos. Entre cada série, as participantes puderam realizar um período de

descanso com duração de dois minutos, o teste de repetição máxima foi realizado no sábado antecedente ao início da semana de teste, na primeira e segunda fase.

O protocolo de exercício dinâmico intenso realizado por todas as participantes, foi supervisionado pelo responsável e colaboradores do projeto devidamente capacitados para tais avaliações. Durante as atividades não houve desconforto, O protocolo de exercícios foi sempre precedido por uma fase de aquecimento de 10 minutos, a pontuação do esforço percebido foi registrada imediatamente após cada série de exercício utilizando a OMNI Escala, durante os testes, os atletas foram orientados a relatar a percepção pontuação de esforço indicando um número na escala (em que 0 significa “não esforço” e 10 significa “esforço máximo”). Verificou-se as análises de parâmetros clínicos e sanguíneos realizadas antes do início (basal) e após o término do protocolo de exercício dinâmico intenso proposto (24 e 48 horas) para investigação dos possíveis efeitos da diosmina sobre a DMIT e eventos patológicos relacionados, conforme figura 3.

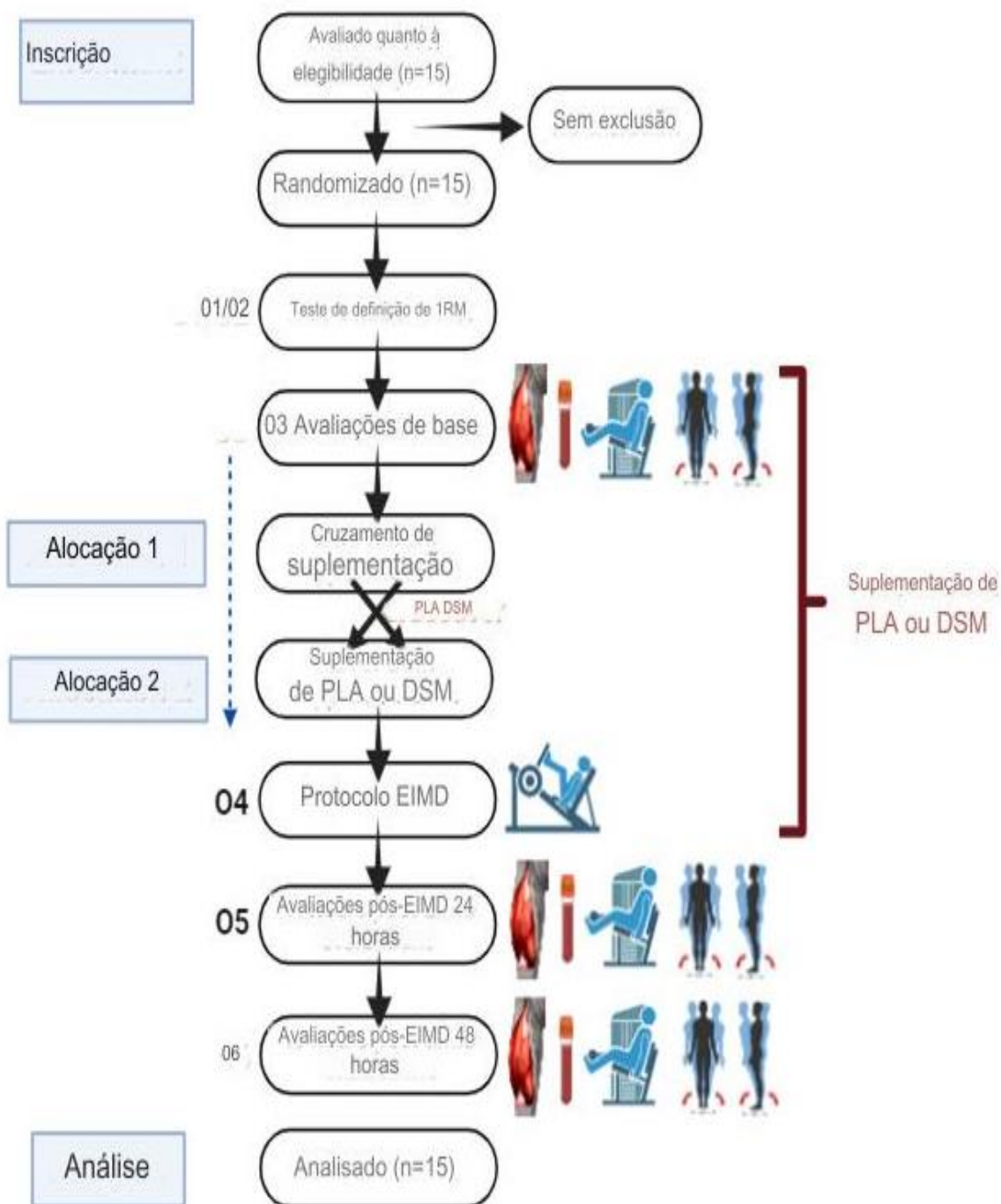


Figura 3 – Delineamento experimental.

3.4 AVALIAÇÃO DA DOR MUSCULAR

A dor muscular foi avaliada no músculo quadríceps usando a escala visual analógica (EVA, em milímetros). As medidas ocorrerão antes (representando os dados basais), e depois (24 e 48 horas) do protocolo de exercício dinâmico intenso. As avaliações de dor seguiram os seguintes parâmetros: subir e descer escadas(10 degraus para ambos), sentar-se e levantar-se de uma cadeira a (com a ação iniciando na postura sentada com os braços cruzados sobre o tronco, em pé e sentado novamente), e palpação manual do músculo quadríceps (digital pressão com a ponta dos dedos em direção aos tecidos mais profundos por aproximadamente 3 s, usando movimentos circulares no sentido anti-horário, com o participante na posição supina), sempre realizadas por um experimentador cego para os tratamentos utilizados do estudo. A ferramenta VAS consistiu em uma linha de 10 cm cujos pontos finais foram rotulados com “sem dor” no lado esquerdo e “dor insuportável” no lado direito. Durante as avaliações dos parâmetros de dor, um experimentador cego aos tratamentos solicitou as participantes que sinalizassem uma linha vertical em um ponto da escala que melhor represente sua classificação de dor momentânea. As pontuações individuais finais foram a distância (em centímetros) do lado esquerdo da escala até o ponto marcado (ROVERATTI; JACINTO, 2019). Para padronizar as avaliações, utilizado o quadríceps do membro inferior direito nas medidas.

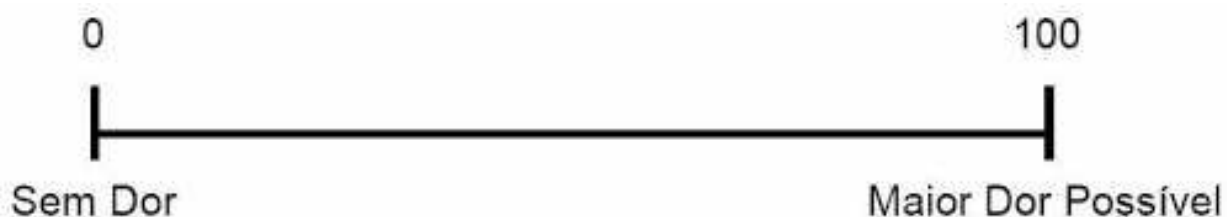


Figura 4 - Escala visual analógica de dor - Fonte: Fortunato, Furtado, Hirabae, de Oliveira et al. 2013.

3.5 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE SANGUE E AVALIAÇÃO DOS MARCADORES PLASMÁTICOS

O sangue foi coletado através de punção veia basílica, localizada na fossa cubital dos membros superiores, nos períodos representados basal (antes da intervenção), 24 e 48 horas após o protocolo de dano induzido por exercício dinâmico, visando avaliar os níveis de GSH, ânion superóxido, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante (FRAP e ABTS). Os resultados foram determinados usando-se um método espectrofotométrico. Os ensaios para dosagem dos parâmetros avaliados foram corrigidos de acordo com a concentração total de proteínas.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e deixadas coagular em temperatura ambiente por aproximadamente 60 minutos. As amostras de plasma então removidas após centrifugação 5000RPM em 10 minutos, permaneceram armazenadas a -80 °C até a análise, realizada posteriormente.

3.6 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica foi determinada através da avaliação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando metodologia adaptada descrita anteriormente (LUQUE et al. 2023). Para este método, foi utilizado amostra do plasma sanguíneo nos períodos basal (antes da intervenção), 24 e 48 horas após o protocolo de dano induzido por exercício dinâmico, foi colocado na placa e adicionado FeCl₃, ácido ascórbico, ácido tricloroacético (TCA; 2,8%) e ácido tiobarbitúrico (TBA; 1,0%), seguido de incubação de aproximadamente 15 min em banho-maria fervente (95 °C) para posterior transferência para banho de gelo. Um produto intermediário da peroxidação lipídica, denominado malondialdeído (MDA), foi então quantificado a amostras, pela diferença entre a absorbância obtida espectrofotometricamente (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia).

3.7 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO FÉRRICA

A capacidade antioxidante endógena de se opor a condições de estresse oxidativo foi verificada espectrofotometricamente pelo teste de quantificação de redução férrica (FRAP) (BORGHI et al. 2018). Para este método, foi utilizado amostra do plasma sanguíneo nos períodos basal (antes da intervenção), 24 e 48 horas após o protocolo de dano induzido por exercício dinâmico. As propriedades de redução do íon ferro (ensaio de FRAP) reagentes específicos para cada reação foram utilizados e os resultados equacionados por meio de uma curva padrão utilizando o reagente Trolox.

3.8 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NITROAZUL DE TETRAZÓLIO

A produção do ânion superóxido foi determinada pela redução do Nitroblue tetrazólio (NBT) (BORGHI et al. 2022). A densidade óptica foi medida usando um leitor de espectrofotômetro de 24 microplacas (Espectrofotômetro de microplacas Multikan GO; Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finlândia).

3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO ABTS

A habilidade das amostras de plasma resistirem ao dano oxidativo por meio da eliminação de radicais livres (ensaio de ABTS). O método ABTS utilizado foi descrito por (RE et al. 1999) e modificado por (KUSKOSKI et al. 2004). A absorbância foi medida em espectrofotômetro modelo Hewlett-Packard 8452 A. Os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

3.10 QUANTIFICAÇÃO DO COMPONENTE ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICO GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A Quantificação do componente antioxidante não enzimático glutathione reduzida (GSH) foi realizada em amostras de plasma (mg/dL) por meio de ensaio cinético-colorimétrico utilizando reagentes específicos e uma curva padrão de GSH. As análises foram realizadas por espectrofotometria (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer; Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia), e os dados apresentados como, micromolar por decilitro ($\mu\text{M/dL}$) de plasma para os parâmetros de estresse oxidativo.

3.11 TESTES DE DESEMPENHO DE RECUPERAÇÃO MUSCULAR

Os torques médio e máximo de extensão do joelho foram avaliados por meio de um dinamômetro isométrico (cadeira flexora/extensora; Cefise Biotecnologia Esportiva, Nova Odessa, SP, Brasil) para determinação da força do quadríceps (contração isométrica voluntária máxima; CIVM). As avaliações seguiram realizadas nos períodos, antes (basal), 24 e 48 horas após o protocolo de exercício dinâmico intenso. Utilizamos a angulação de 90° das articulações do joelho durante os testes. Durante as avaliações, as curvas de força são transmitidas diretamente pela máquina para um software de computador (N2000 Pro) que quantifica os valores de cada uma das ações. Três séries de extensão de joelho com força máxima mantidas por 5 segundos, com intervalo de descanso de 5 segundos entre cada série. Três repetições para cada participante utilizadas para coleta e análise de dados, e o melhor valor (maior) foi escolhido para representar os dados individuais.

Os dados estão apresentados como torque isométrico de extensão do joelho em quilogramas força metro por quilograma (kgfm/kg) e newton por metro (N/m), para torque médio e máximo, respectivamente. Além disso, a altura de salto vertical também utilizada como avaliação de potência usando dados de uma plataforma de força (BIOMEC400-412, EMG System do Brasil Ltda, São

Paulo, SP, Brasil). Os participantes realizaram três saltos verticais de contramovimento para a altura máxima, e o mais alto deles será utilizado para análise de dados (MOIR et al. 2008). O sinal analógico gerado pela plataforma de força durante os saltos é convertido em sinal digital em um computador conectado. Cada participante foi instruída a manter as mãos no quadril durante a posição inicial de cada salto, para remover a influência dos braços, foi realizado 30 segundos de descanso entre os saltos. Antes de cada sessão de teste, foi realizado a calibração da plataforma de força usando cargas de peso conhecidos. Os dados estão apresentados como duração do voo em milissegundos (ms).

3.12 AVALIAÇÃO DO EQUILÍBRIO POSTURAL

Durante a avaliação do equilíbrio postural, os participantes do estudo iniciaram a familiarização com o equipamento, posteriormente, realizaram 3 séries do teste de postura em sala silenciosa, tanto bipodal e unipodal (direita e esquerda) mantendo por 30 segundos em plataforma de força (BIOMECH400-412, EMG System do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), com intervalo de 30 segundos entre cada avaliação. A média de 3 séries de cada medida foi utilizada para coleta e análise dos dados.

As avaliações foram realizadas antes (basal), 24 e 48 horas após o protocolo de exercício dinâmico intenso. Durante todas as séries, a sequência de avaliação do equilíbrio postural foi randomizada manualmente para todas as participantes. As participantes foram orientadas a manter-se em pé na sequência padronizada e nas seguintes condições: descalças, olhos abertos e olhando para um alvo (círculo) colocado em uma parede na altura dos olhos a 2,5 m de distância e braços paralelos ao tronco.

Na intenção de evitar quedas nos testes, um experimentador permanecerá próximo aos indivíduos durante todas as tarefas experimentais. Os dados de força de reação vertical da plataforma de força estão apresentados a 100 Hz. Todos os sinais de força foram filtrados com um filtro de 35 Hz (filtro Butterworth). Os sinais dos 4 sensores da plataforma de força então se

convertem em dados de centro de pressão (CDP) usando estabilografia computadorizada, realizado tratamento utilizando software especializado para tal (MATLAB; The Mathworks, Natick, Massachusetts). A análise estabilográfica do CDP foi utilizada para calcular os seguintes parâmetros de equilíbrio: área do CDP, velocidade anteroposterior (vel. AP) e velocidade mediolateral (vel. ML). Existe uma relação inversa entre essas variáveis e o equilíbrio postural; ou seja, um valor menor indica maior equilíbrio postural (Roveratti, Jacinto et al. 2019). Os dados serão apresentados como velocidades AP e ML bipodal e unipodal, em centímetros por segundo (cm/s).

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis independentes incluíram os grupos experimentais (placebo e diosmina) e períodos (basal, 24 e 48 horas). As variáveis dependentes incluíram pontuação de dor muscular, marcadores plasmáticos (parâmetros de estresse oxidativo), testes de desempenho de recuperação muscular (extensão isométrica do joelho e duração do voo) e parâmetros de equilíbrio postural analisados (velocidades AP e ML bipodal e unipodal [direita e esquerda]). A análise de variância (ANOVA) de duas vias (tratamento x tempo) com medidas repetidas foi utilizada para avaliar as mudanças ao longo do tempo e entre os grupos para todas as variáveis dependentes. As análises verificadas entre dois grupos, foi aplicado o teste t não pareado. Essas análises foram realizadas através de o software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, EUA), e os dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Resultados com valores de $p \leq 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

O presente trabalho segue as normas da revista *Journal of Dietary Supplements*, fator de impacto 1.9, qualis A3. Os resultados parciais estão descritos no artigo intitulado “A randomized, double-blinded, and placebo-controlled crossover study to evaluate the effects of supplementation with the flavonoid diosmin on delayed-onset muscle soreness in female futsal athletes”.

A randomized, double-blind, and placebo-controlled crossover study on the effects of diosmin supplementation on delayed-onset muscle soreness in female futsal athletes

Fabiana C. B. da Cunha,^a Giovana B. Cortez,^{a,b} Isabela M. Pucci,^c Mariana M. Silva,^c Jayne M. Borim,^c Mariana M. Bertozzi,^b Jeferson L. Jacinto,^c Thacyana T. Carvalho,^d Andreo F. Aguiar,^c Juliano Casonatto,^c Eros O. Júnior,^c Waldiceu A. Verri Jr,^b and Sergio M. Borghi^{a,c,*}

^aCenter of Health Science, Londrina State University, 86038-350, Londrina, PR, Brazil.

^bDepartment of Pathology, Biological Sciences Center, Londrina State University, 86057-970, Londrina, Paraná State, Brazil.

^cCenter for Research in Health Sciences, University of Northern Paraná, 86041-140, Londrina, Paraná, Brazil.

^dDepartment of Pediatrics, Division of Infectious Diseases and Immunology, Guerin Children's at Cedars-Sinai Medical Center, 90048, Los Angeles, CA, USA.

*Correspondence to: Prof. Sergio M. Borghi, Center of Health Science, Londrina State University. Avenida Robert Koch, 60, Vila Operária, Londrina, Paraná, Brazil. 86038-350. Phone: + 55 43 3371-4979, e-mail addresses: sborghi@uel.br and sergio_borghi@yahoo.com.br.

ABSTRACT

Delayed-onset muscle soreness (DOMS) is hypothesized to be due to reversible ultrastructural damage at the cellular level, affecting both recreational and professional athletes. For elite athletes, the prevalence of DOMS is more pronounced during the beginning of the sports season, when they return to the reality of training after a period of inactivity, thus potentially having a negative impact on performance. We evaluated the effects of supplementation with the flavonoid diosmin in the pre-season of a futsal team from the Brazilian women's league. A randomized, double-blind and placebo-controlled crossover trial was conducted in 15 professional futsal female athletes. They received one daily capsule of diosmin (DSM) or placebo (750 mg) for 3 days as a preventive regimen during the pre-season period, and an intense dynamic exercise protocol (concentric/eccentric actions) was applied to the lower limbs. Evaluations on the effects of DSM on athletic performance and DOMS-related muscle soreness, blood oxidative stress, recovery of strength capacity, and postural balance were performed during a 48 hour-period. Although DSM had no greater effect than placebo on athletic performance, it presented small-to-moderate effects in containing oxidative damage (through reduction in lipid peroxidation) and trivial-to-moderate analgesic effects on muscle soreness, depending on the condition. Furthermore, DSM provided small-to-moderate effects in preventing reduced muscle strength and improving postural balance parameters. The DSM seems effective for futsal athletes in preventing muscle soreness, oxidative stress, and impairment of muscle strength and postural balance postexercise, which is desirable to promote better results in sporting terms.

KEYWORDS: DOMS, athletes, futsal, oxidative stress, flavonoids, and diosmin.

Introduction

Delayed onset muscle soreness (DOMS) is considered a common experience after eccentric, high-intensity or long-duration exercise, both for individuals unfamiliar with regular physical activity and for athletes, as it can affect their performance (Smith 1992; Cheung et al. 2003). Mechanistically, the physiopathology of DOMS is currently thought to involve several complex cellular and tissue events (exercise-induced muscle damage; EIMD).

Ultrastructural injuries due to mechanical forces imposed on elements of skeletal muscle tissue occur initially followed by protein degradation and autophagy, which ultimately results in local inflammation, which is followed by systemic repercussions. Compartmental swelling is enriched in immune cells that produce pro-inflammatory molecules, leading to increased muscle nociceptor neuron activation and soreness (Hotfiel et al. 2018; Bussulo et al. 2021). Additionally, pathological levels of oxidative stress can contribute to muscle contractile defects, weakness and fatigue (Powers and Jackson 2008), highlighting reactive oxygen species (ROS) as potential targets in DOMS.

DOMS is clinically diagnosed by tenderness or stiffness to muscle passive movement or palpation or reduced strength capacity upon manual testing. Laboratory blood tests and muscle tissue imaging are also crucial to determine the degree of severity of the injury (Hotfiel et al. 2018; Luque et al. 2023). Symptoms are typically delayed reaching its peak at 48-72 hours after the EIMD, due to local and systemic physiological responses, may vary between those affected, and may include localized muscle soreness with increased painful restriction of movement, reductions in strength and power, swelling, dysfunctional biomechanics of adjacent joints, and altered proprioceptive activity (Cheung et al. 2003; Hotfiel et al. 2018; Luque et al. 2023).

Skeletal muscle overload and injuries are relatively frequent in sport, with an estimated prevalence between 10-60% of all sports-related injuries (Hotfiel et al. 2018; Goes et al. 2020; Romero-Morales et al. 2024). EIMD/DOMS may leave athletes more vulnerable to the risk of secondary injuries (Smith 1992; Cheung et al. 2003; Hughes et al. 2018). Soccer athletes are likely to present EIMD/DOMS due to great physical and competitive demands (Hughes et al. 2018; Goes et al. 2020). As a five-a-side indoor soccer modality, futsal can also

involve high physical demands and can induce increased levels of muscle damage and oxidative stress markers in the blood and DOMS (Souglis et al. 2023). Thus, the proper and quick identification of EIMD/DOMS in high-intensity sports, including futsal, as well as the discovery of new and viable options of recovery interventions, are fundamental to avoid absence in training days and official competitions.

As natural products, flavonoids have received attention in recent decades due to their remarkable biological properties, ranging from analgesic to antioxidant effects (Ferraz et al. 2020). Diosmin (DSM) is a flavone glycoside compound derived from hesperitin; a flavanone abundantly found in citrus fruits. Oral DSM is hydrolyzed in the intestine to the active aglycone metabolite diosmetin, and subsequently absorbed (Gerges et al. 2022). It is produced from citrus fruit peels as a phlebotonic and is commercially available in Europe and the United States as an over-the counter dietary supplement used to treat venous diseases (Fahmy et al. 2021). Daflon® (500 mg) is a commercially available medicine that combines DSM with hesperidin (in a proportion of 9:1), referred to as micronized purified flavonoid fraction (MPFF) (Ramelet 2001; Kirienko and Radak 2016). Overall, the efficacy and safety profile for the human use of DSM in the treatment of chronic venous insufficiency and hemorrhoids have been provided by randomized trials and systematic reviews (Perera et al. 2012; Kirienko and Radak 2016; Gerges et al. 2022).

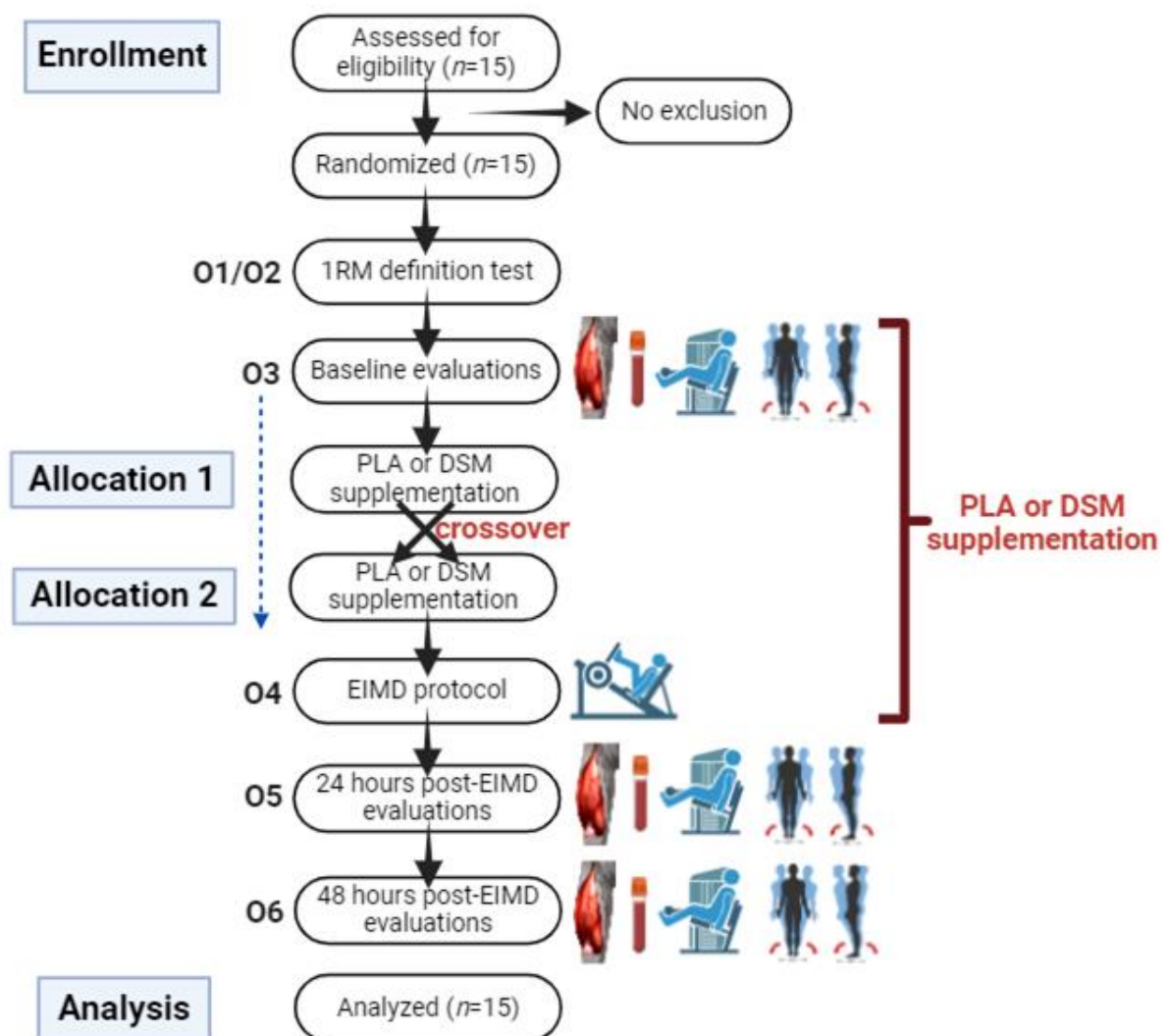
Previous clinical studies have evaluated the effects of flavonoid supplementation on DOMS outcomes, highlighting positive results (Carey et al. 2021; Luque et al. 2023). However, the effects of pure DSM formulations on DOMS in athletes have not yet been investigated. The present study tested the effects of DSM supplementation on DOMS-related muscle soreness, oxidative stress, impaired muscle strength, and postural balance after EIMD in female futsal athletes in the pre-season period.

Methods

Study design

A prospective randomized, double-blind (volunteers and evaluators), placebo (PLA)-controlled crossover study was conducted to investigate the effects of oral pure DSM supplementation in professional female futsal athletes

experiencing DOMS. Assessment of muscle soreness was the primary outcome. The evaluation of blood oxidative stress parameters, recovery of muscle performance (quadriceps muscle), and postural balance (bipedal and bilateral one-legged) were considered secondary outcomes. The trial was conducted between January 2024 and March 2024. During the experimental procedures, athletes from the women's futsal team from the city of Londrina (Londrina Esporte Clube), Paraná State, Brazil, in a pre-season period before competing in the national women's futsal league, visited the laboratory on six occasions (O1-O6). The experimental design is presented in Figure 1.



The first step involved the phase in which participants underwent the 1RM definition test. The athletes were submitted to the 1RM test (three leg-

press sessions), to determine of the precision of the 1RM load (no observation of increased load when compared to previous sessions), conducted two days before the start of the study's experimental protocol (visit O1 and O2). On the first day of the experimental protocol (visit O3), athletes were properly informed about the dose (but not the content of the capsules they received), as well as the frequency and duration of the proposed supplementation protocol, and were submitted to assessment of muscle soreness, blood collection, and muscle strength performance and postural balance evaluations in the baseline period. On day 2, participants did not attend the laboratory, since no activities were required. On day 3 (visit O4), athletes were exposed the EIMD protocol using 70% of the previously determined 1RM load. On the fifth and sixth visits (O5 and O6), carried out on the days 4 and 5 of the experimental protocol, the evaluations (same data collection as for the baseline period) were repeated to indicate the 24-hours and 48-hours post-EIMD responses, respectively (Luque et al. 2023).

Ethics statement

Ethical approval was granted from the Ethics Committee in Human Research at the University of Northern Paraná (acceptance protocol number 5.809.085, from 12 December 2022). Procedures were performed following the institutional and governmental guidelines and regulations, as well as the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. All participants were detailed informed about the purpose and procedures of the research and signed an informed consent declaration. This clinical trial was registered at ClinicalTrials.gov platform, under the registration number NCT06125002.

Sample size calculation

G*Power software (version 3.0.1; Dusseldorf, Germany) was used to determine the appropriate sample size. No previous clinical trials investigating the effects of pure DSM (alone or in combination with other compounds) on DOMS condition have been found in the literature. For this reason, the sample size was estimated based on previous studies that reported Cohen's effect sizes (ES) of ~ 0.7 (between-group differences) for DOMS reduction following other

polyphenols' treatment (Nicol et al. 2015; Ammar et al. 2016; Morgan et al. 2018; Luque et al. 2023). Repeated measures analysis of variance (ANOVA) (within between interaction, $ES = 0.7$, $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.80$, number of groups = 2, and number of measurements = 3) pointed to at least 22 participants ($n = 11$ per group), required to achieve a statistical power of 80% to exclude the null hypothesis. Fifteen participants per group were enrolled aiming to increase statistical power and avoid reducing the sample size due to possible dropouts.

Participants and randomization

A total of 15 athletes from the adult professional team were recruited, aged between 17 and 30 years old. Eighty percent ($n=12$) were dominant in the right leg and 20% ($n=3$) were dominant in the left leg during sports practice. Exclusion criteria included athletes using ergogenic supplementation and/or anti-inflammatory, antidepressant, and analgesic treatment, as well as orthopedic injuries in the lower limbs or spine. An athlete's performance can vary according to several factors inherent to everyone (including genetics, lifestyle, physical fitness, motivation, etc.), which can increase the sample heterogeneity (inter-subject variability), potentially masking the effects of the intervention proposed. Therefore, a crossover design (opposed to a parallel design) was used in the present study to avoid the influence of intersubject variability. Additionally, crossover designs are statistically efficient and require fewer participants than parallel designs, in addition to allowing the experiment to be carried out in less time, thus increasing participant compliance (Lim and In 2021). None of the athletes used alcohol or tobacco or had symptoms of infections at the time of the study. It was not necessary to exclude any of the athletes from the study. The baseline characteristics of the participants are described in Table 1.

Table 1. Baseline characteristics of the athletes participating in the study ($n=15$).

Age (y)	21.06 (3.01)
Weight (kg)	60.86 (7.34)
Height (m)	1.61 (0.06)
BMI (kg/m ²)	23.40 (2.57)
1RM	212.66 (39.90)
70% 1RM	148.40 (27.52)

Data expressed as mean (SD). y: years. kg: kilogram. m: meters. BMI: body mass index. 1RM: one-repetition maximum. Kg/m²: kilogram squared (unpaired *t* test).

No athlete needed to be removed from the study considering the exclusion criteria. Athletes were randomized and allocated to PLA and DSM groups (final $n=15$ for both). All participants reported to the laboratory for two cycles of the crossover experimental protocol, separated by a 2-week washout period. The randomization process was performed using a random number table ([https:// www. random. org](https://www.random.org)), and the randomization schedule was concealed in opaque envelopes from all investigators (except the statistician) and data collectors. Allocations were performed through sequentially numbered tested compounds. Both, the investigators and participants, were blinded to the tested compounds during all stages of evaluation by a member who did not participate in data collection and analysis of the outcomes, according with the randomization protocol (Luque et al. 2023). A Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow diagram showing the progress through the phases (O1 to O6) of the crossover randomized controlled trial of two experimental groups is presented together with the experimental design in Figure 1.

Intervention protocol

The athletes were instructed to take three opaque capsules orally per day, always in the morning, individually in a room, containing PLA (750 mg; corn starch; Phloraceae Farmácia de Manipulação, Londrina, Paraná, Brazil) or DSM (750 mg; Nutrition Greenlife, USA). The consumption of capsules during the three days was monitored by the investigators on days 1 and 3, and by the team's technical committee, on day 2, since in the latter the athletes were not present in the laboratory. At the end of the study, participants were asked

whether they thought they could identify what type of substance they were taking during the study and reported that they could not differentiate between the treatment compound and the placebo. No adverse effects were described by the athletes for either PLA or DSM consumption during the study.

Intense dynamic exercise protocol (IDEP) for inducing EIMD

For the experimental protocol, athletes were exposed to EIMD consisting of three sets of high-IDEP (composed by both concentric and eccentric muscle actions, equally distributed at runtime over the series) bilateral repetitions on a leg-press machine as described previously (Luque et al. 2023). The data obtained from protocol application were plotted for comparative evaluation of the effects of supplementation with the two compounds (PLA and DSM) in the test.

The perceived exertion score was recorded immediately after each series (1-3) of resistance exercise on the leg-press machine during the EIMD protocol, using the OMNI-RES scale (Robertson et al. 2003). During the tests, the athletes were instructed to report the perceived exertion score by indicating a number on the OMNI-RES scale (in which 0 means “no effort” and 10 means “maximal effort”) that best represented their overall muscular effort in that action. Scores plotted the value (0–10) reported in OMNI-RES scale. The athletes were familiarized with the OMNI-RES scale before starting the tests (Luque et al. 2023). Additionally, the fatigue index was calculated by dividing the difference between the highest value and the lowest value by the highest value from a series of repetitions done until failure, and then multiplying by 100 to determine the percentage (%) (Luque et al. 2023).

Outcome measures

Parameter analysis for plasma oxidative stress

Peripheral blood samples (~4 ml) were collected from the median cubital vein into K2 tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), aiming to determine plasma oxidative stress levels. Samples were maintained at room temperature for approximately 60 minutes for plasma separation, followed by additional centrifugation for 10 minutes (5000 rpm), and storage at –80 °C until

analysis. Oxidative stress parameters (1:4 dilution) analyzed included superoxide anion [$O_2^{\cdot-}$; nitroblue tetrazolium (NBT) reduction test] production, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) levels, reduced glutathione (GSH) levels, ferric-reducing ability potential (FRAP), and 2,20-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) radical cation assays (Misra 1974; Katerji et al. 2019).

Muscle soreness assessment

Muscle soreness was evaluated in the quadriceps muscle after EIMD protocol using the visual analog scale (VAS) tool. Muscle soreness was rated for four parameters as follows, going up and down stairs (10 steps for both), sitting down and getting up from a chair (with the action starting in the sitting posture with arms crossed over the torso, standing, and sitting again), and manual muscle palpation (in the belly; using digital pressure with the fingertips toward the deeper tissues for approximately 3 s, using circular movements in a counterclockwise direction, with the participant in a supine position) by an experimenter blinded to the treatment groups (always the same experimenter for this analysis) (Ohrbach and Gale 1989; Luque et al. 2023). The manual pressure applied by investigators was always of moderate intensity, with the same person always conducting the evaluations. VAS consists of a 10 cm horizontal line whose ends were labeled with “no pain” in the left side and “unbearable pain” on the right side. For pain scoring, an experimenter blind to the treatments asked the participants to mark a vertical line at a point on the scale that best characterized their momentary soreness with a focus restricted to the quadriceps muscle. The final individual score was the distance (in centimeters) from the left side of the scale to the point marked by participant. Aiming to standardize the measurements, the right quadriceps muscle was always used in the tests.

Muscle strength recovery assessment

The average and maximum torque of the knee extension were assessed after EIMD to investigate quadriceps strength recovery (maximum voluntary isometric contraction; MVIC) by an isometric dynamometer (flexor/extensor chair; Cefise Biotecnologia Esportiva, Nova Odessa, SP, Brazil). An angulation of 120° of the

knee joints was applied for isometric contractions tests. The force executed by the athletes were directly transmitted by the dynamometer to a computer software (N2000 Pro) that properly quantifies the values of each of the actions performed. Three sets of knee extension with maximum force were maintained by athletes for 5 seconds, with a 5 second rest interval between each set. Three sets for each participant were used for data collection and analysis, and the higher value was chosen to represent the result. The data are presented as isometric knee extension torque in Newton per meter (N/m), for average and maximum torque (Luque et al. 2023).

We also used vertical jump height as another parameter to evaluate the quadriceps strength recovery after EIMD protocol. These measurements were recorded from a force platform (BIOMECH400-412, EMG System do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brazil). The athletes conducted three countermovement vertical jumps for maximal flight duration, and the highest of which was used for data analysis. The analogue signal generated by the force platform was converted to a digital signal in a connected computer. The athletes placed their hands on their hips while in the initial position for each jump to remove the influence of their arms, and 30 seconds of rest were provided between jumps. The analyzes were carried out with participants barefoot, to avoid potential interference from the different types of footwear. Prior to each testing session, the force platform was calibrated using loads with known weights. The data are shown as flight duration in milliseconds (msec) (Luque et al. 2023).

Postural balance assessment

Postural balance assessment after EIMD protocol were conducted as previously described (Luque et al. 2023). In the first step, athletes were initially familiarized with the equipment. On the day of analyzes, they performed in a quiet room three sets of the bipedal and one-legged (right and left) stance test, maintained for 30 seconds on a force platform (BIOMECH400-412, EMG System do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brazil), with a 30-second rest interval between each series. The mean of the three series of each assessment was used for data collection and analysis. During all series, the sequence of postural balance parameters assessed were conducted according to a previous randomization performed for each athlete. They were informed to stay in standard sequence

and under the following conditions: barefoot, eyes open and looking at a target circle positioned in their fronts, placed on a wall at eye level 2.5 m away, together with arms parallel to their torso.

Vertical ground reaction force data from the force platform were sampled at 100 Hz. All force signals were filtered with a 35 Hz low-pass filter (Butterworth filter). The signals from the four sensors on the force platform were converted on center of pressure (COP) data using computerized stabilography, which was compiled with MATLAB routines (The Mathworks, Natick, Massachusetts). Stabilographic COP assessments were used to determine the following parameters: COP area and bipedal and unipedal (right and left) anteroposterior (AP) and mediolateral (ML) speeds and frequency. There is an inverse relationship between these variables and postural balance, which means, a reduced scores indicates higher postural balance control. Results are presented as area of COP in cm² and bipedal and single-legged (unipedal) AP and ML velocities in centimeters per seconds (cm/s) and frequency in hertz (Hz) (Luque et al. 2023).

Statistical analyses

The independent variables included the experimental groups and time periods evaluated. Dependent variables included muscle soreness score, the number of repetitions until failure, perceived exertion rating, plasma oxidative stress parameters, muscle recovery performance parameters, and postural balance parameters. Two-way (treatment x time) analysis of variance (ANOVA) with repeated measures was used to evaluate changes over time and between groups for all dependent variables. When significant differences were confirmed with ANOVA, multiple comparisons testing were performed using Tukey's post hoc correction to identify these differences. The analyses were done applying intention-to-treat strategy. Each *p* value was adjusted to account for multiple comparisons (0.05; 95% confidential interval). When analysis was performed between two groups (i.e., outcome measures at baseline), an unpaired *t* test was applied. (Luque et al. 2023) Quantitative variables are shown as an ordinal variable (mean $\pm$ standard deviation [SD]). Results with a value of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. Row statistic (mean $\pm$ standard deviation [SD]) was used to provide mean summaries of groups at different time points in

some analysis. The analyses were performed using GraphPad Prism 7.00 software (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA). The effect size (EF) of measured outcomes was provided to describe the magnitude of intervention with the tested compound (treatment effect), aiming for a more rational interpretation for clinical applications and utility. Cohen's d EF was used to quantify the magnitude of difference between the groups (Cohen 1992).

Results

Effects of DSM preventive supplementation on EIMD protocol, fatigue index, and perceived exertion

Ergogenic properties have been described for some flavonoids (Ruiz-Iglesias et al. 2021). However, there is still no data on the potential effect of DSM supplementation on physical performance in humans. Thus, in the present preventive supplementation protocol, we evaluated the effect of DSM on performance in the repetitions until failure (RUF) test for induction of EIMD as well as related fatigue index (FI) and perceived exertion (OMNI-RES) (Table 2). We observed reductions in the number of RUF from series 1 to 3 in both PLA and DSM groups, nonetheless, with no significant data between these time-periods for both groups and between groups. Further, when the number of repetitions of the 3 series were added together, there was also no difference between the groups ($p = 0.4208$), as well as for the FI ($p = 0.9429$). A gradual equivalent increase in OMNI-RES score between the three series (Set 1-Set 3) during the EIMD protocol was observed for both groups, with significant data in the series 3 relative to series 1 for PLA group ($p = 0.0022$) and in the series 2 and 3 relative to series 1 for DSM group ($p = 0.0022$ and $p < 0.0001$, respectively) (Table 2), which is expected and characteristic for anaerobic exercise modalities. Altogether, these data indicate that DSM does not improve the athletic performance in the present regimen of preventive supplementation.

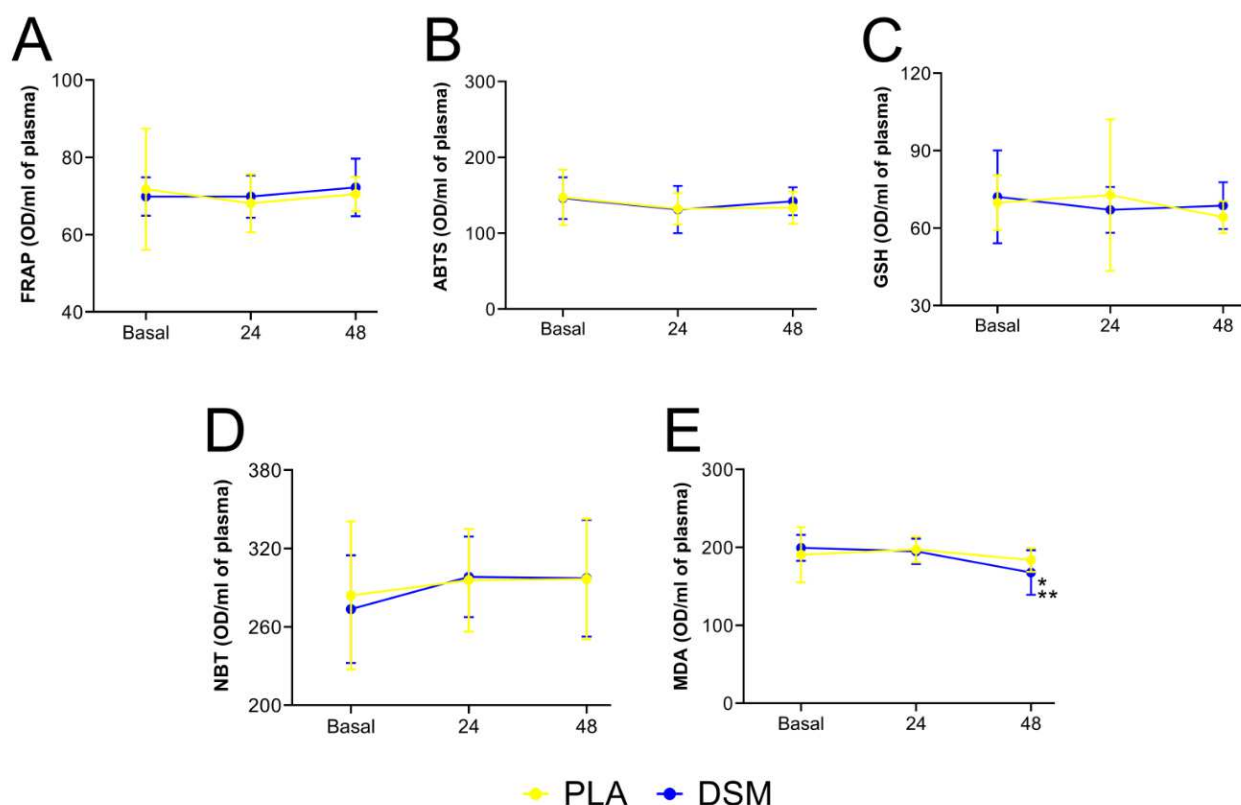
Table 2. Effects of PLA and DSM preventive supplementation on RUF, perceived exertion (OMNI-RES scale values), and FI.

Variable	PLA (n=15)			DSM (n=15)		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
RUF	27.26 (6.25)	18.20 (3.07)	15.20 (3.01)	27.06 (9.76)	15.93 (4.35)	13.26 (3.63)
OMIN-RES	8.93 (0.96)	9.66 (0.61)	10.0 (0.00)*	8.60 (1.24)	9.46 (0.64)*	9.93 (0.250)*
RUF SS (1-3)		60.66 (8.95)			56.93 (15.26)	
FI (%)		42.66 (14.80)			43.13 (20.17)	

Data expressed as mean (SD). RUF: repetitions until failure. SS (1-3): summed series. FI: fatigue index. * $p \leq 0.005$ compared with S1. Unpaired t test for between-groups analysis and two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test for between-time analysis.

Effects of DSM preventive supplementation on plasma oxidative stress parameters

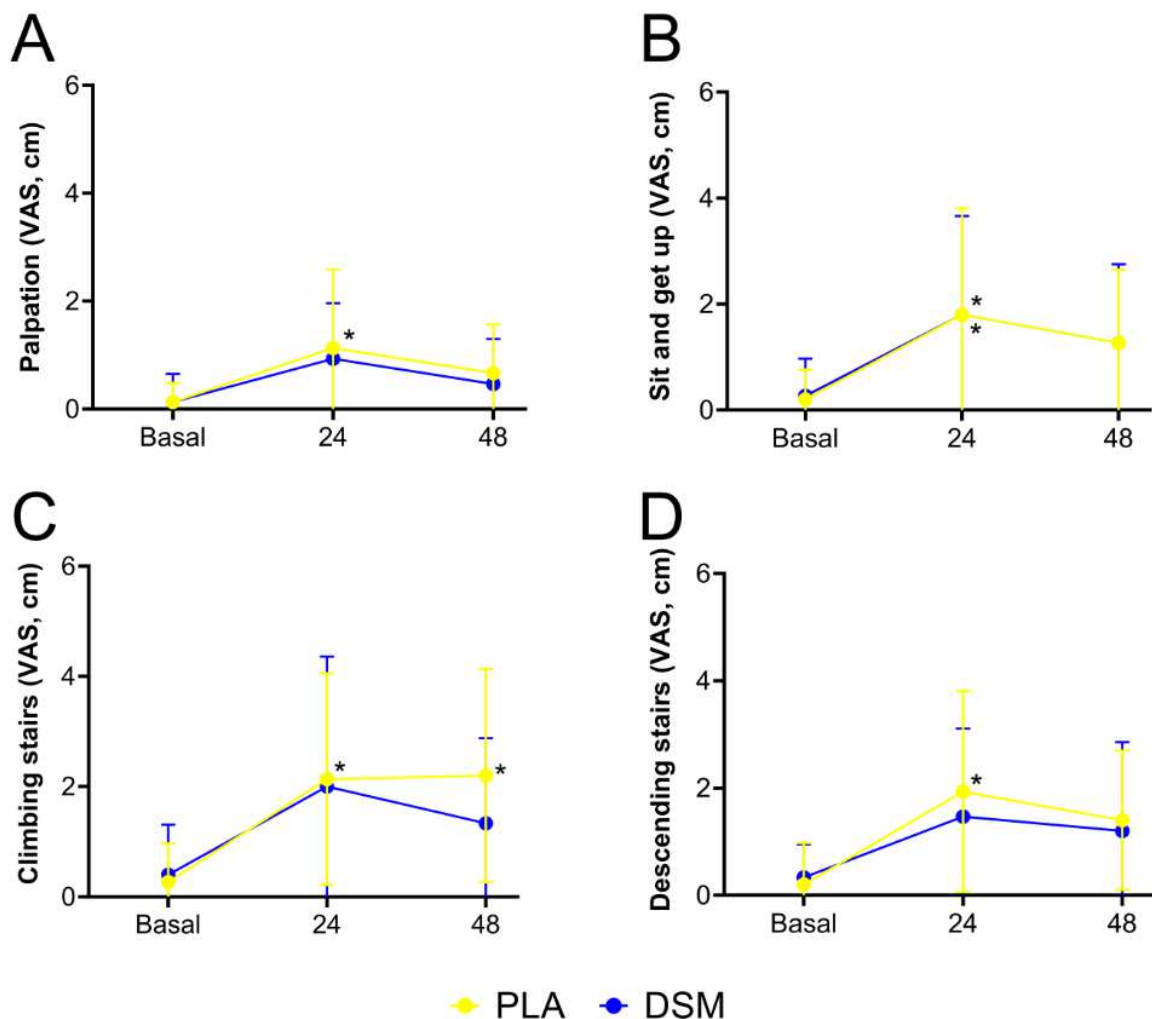
We next thought to determine whether preventive DSM supplementation would modulate the antioxidant capacity and ROS and lipid peroxidation levels in plasma samples from athletes. For both PLA and DSM groups, no significant changes were observed between times or groups for FRAP, ABTS, GSH, and NBT (Figure 2A-E), with the exception of MDA concentration (lipid peroxidation levels), which showed a tendency to reduce at the 48th hour compared to both basal and 24th hour periods for DSM group ($p = 0.0040$ and $p = 0.0246$, respectively; Figure 2E). DSM group presented small-to-moderate positive effects relative to PLA group on antioxidant capacity at the 24th and 48th hours for FRAP ($p = 0.9936$, EF = 0.28 and $p = 0.9936$, EF = 0.30, respectively) assay and at the 48th hour for ABTS ($p = 0.9551$, EF = 0.51) and GSH ($p = 0.9716$, EF = 0.61) assays (Figure 2A and B). Additionally, at the 48-hour time, between-group analysis demonstrated that the DSM intervention led to a moderate reduction of lipid peroxidation relative to PLA intervention ($p = 0.3857$, EF = 0.72; Figure 2E). These data suggest DSM may provide some improvements in total antioxidant capacity, and that although it does not reduce ROS generation after EIMD protocol (e.g., superoxide anion in the current condition, reflected by NBT levels), it may later contribute (48 hours after) to reduce the downstream oxidative stress cascade, at the level of oxidative degradation of lipids.



Effects of DSM preventive supplementation on muscle soreness

Increases in muscle soreness scores were detected in all parameters evaluated 24 hours compared to the basal values for the PLA group (Figure 3A-D), and only for the sitting and standing parameter for the DSM group (Figure 3B). For the PLA group, it was additionally observed significant persistence of muscle soreness for climbing stairs parameter up to the 48th hour compared to the baseline period (Figure 3C). No significant differences were observed between the groups at any of the times evaluated, although some downward trends for the DSM group was evident relative to the PLA group after the EIMD protocol, ranging from trivial-to-moderate effects (Figure 3A, C, and D). These include quadriceps palpation at 24 and 48 hours ($p = 0.9911$, $EF = 0.16$ and $p = 0.991$, $EF = 0.23$, respectively; Figure 3A), climbing stairs at 24 and 48 hours ($p > 0.9999$, $EF = 0.06$ and $p = 0.7136$, $EF = 0.50$, respectively; Figure 3C), and descending stairs on the 24 and 48 hours ($p = 0.9406$, $EF = 0.26$ and $p = 0.9987$, $EF = 0.14$, respectively; Figure 3D). These results suggest that DSM supplementation at the current dose and days of use can reduce the general

development of muscle soreness in this DOMS protocol, however, with varying degrees of attenuation for the different specific conditions evaluated.



Effects of DSM preventive supplementation on recovery of force capacity

No significant changes were observed for both average and maximum torques (AT and MT, respectively) between the periods evaluated, nor between the experimental groups (Table 3). However, although a non-significant reduction was detected for the PLA group at 24 hours after the EIMD protocol for AT parameter ($p = 0.7729$), in the DSM group, this reduction in the same parameter was prevented ($p = 0.8366$), conferring a moderate prevention effect on strength loss in the DSM group relative to PLA group ($EF = 0.61$). Moreover, at 48 hours after EIMD, DSM group presented increased (although not significant; $p = 0.9425$) performance for AT parameter when compared to the baseline value, which was not observed for PLA group at the same time-period ($p >$

0.9999), promoting a small effect in favor of DSM group relative to PLA group ($p = 0.9561$, $EF = 0.21$) (Table 3). Vertical jump power performance test was applied aiming to evaluate the explosive force in lower limbs, and it was demonstrated that DSM can prevent the drop in this force at hours 24 and 48 after the EIMD protocol with a small magnitude of effect ($p = 0.9983$, $EF = 0.26$ and $p = 0.9690$, $EF = 0.27$, respectively). These observations demonstrate that DSM can prevent loss of muscle strength during DOMS course after EIMD protocol, with effects ranging from small-to-moderate magnitudes, depending on the parameter evaluated, to prevent the reduction of muscle strength.

Table 3. Effects of PLA and DSM preventive supplementation on muscle recovery performance tests (isometric knee extension average torque and maximum torque) and flight duration during countermovement vertical jump.

Variable	PLA ($n=15$)			DSM ($n=15$)		
	Basal	24	48	Basal	24	48
AT (N/m)	236.20 (41.54)	215.89 (40.14)	235.20 (45.93)	234.32 (41.35)	238.64 (34.49)	248.34 (47.91)
MT (N/m)	266.99 (47.97)	264.09 (52.93)	277.37 (48.23)	261.22 (47.01)	259.14 (39.19)	271.79 (51.24)
FD (msec)	441.86 (42.07)	440.00 (31.73)	433.80 (30.13)	434.40 (32.46)	448.46 (33.20)	444.20 (44.85)

Data expressed as mean (SD). AT: average torque. MT: maximum MT torque. FD: flight duration. N/m: newton per meter. msec: milliseconds. Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test for between-time analysis.

Effects of DSM preventive supplementation on postural balance

DOMS may be related to proprioceptive disturbances during its course, which can make athletes more susceptible to sports injuries, as well as improving proprioception can enhance athletes' physical performance (Hryvniak et al. 2021; Yilmaz et al. 2024). The parameters COP area, APV, MLV, APF, and MLF parameters were not significantly modified for BI and UR for both between-times or -groups analyzes. For UR APV and MLV parameters at 48 hours after the EIMD protocol, small and moderate favorable effects ($p = 0.9848$, $EF = 0.24$ and $p = 0.5575$, $EF = 0.57$, respectively) were provided for DSM supplementation in relation to PLA supplementation (Table 4). Regarding UL values, COP area and APV also did not present significant variations for between-times or -groups analyzes. However, for MLV analysis, non-significant and significant reductions were observed at hours 24 and 48 after EIMD protocol when compared to the basal value for DSM group ($p = 0.3526$ and $p = 0.0494$, respectively), in contrast to the PLA group, in which significant reduction relative to basal period was not observed after EIMD protocol ($p =$

0.9953 for 24th hour and $p = 0.9849$ for 48th hour). These different outcomes in these two time periods (24th and 48th hours for MLV) provided small and moderate preventive effects in favor of DSM supplementation relative to PLA supplementation ($p = 0.9957$, $EF = 0.23$ and $p = 0.7935$, $EF = 0.55$, respectively) (Table 4). Additionally, for the UL APF and MLF parameters at 24 hours, non-significant and significant reductions were detected at hour 24 after EIMD, when compared to baseline for DSM group ($p = 0.1669$ and $p = 0.0341$), but not for PLA group neither for APF ($p = 0.9710$) nor for MLF ($p = 0.1181$), conferring moderate preventive effects in favor of DSM supplementation over PLA supplementation for APF ($p = 0.7446$, $EF = 0.69$), but not for MLF ($p = >0.9999$, $EF = 0.06$). These data showed that preventive use of DSM can provide some degree of improvement in postural balance during DOMS, especially for UL. Since most athletes in the present sample are right dominant for sportive gestures in futsal (e.g., kicking the ball), promoting improved stability in the contralateral limb (e.g., left leg), can be important for posture, coordination and precision during passes and kicks.

Table 4. Effects of PLA and DSM preventive supplementation on postural balance parameters.

Variable	PLA (n=15)			DSM (n=15)		
	Basal	24	48	Basal	24	48
BI COP (cm ²)	0.79 (0.42)	0.72 (0.38)	0.82 (0.45)	0.72 (0.30)	0.83 (0.54)	0.79 (0.43)
BI APV (cm/s)	0.75 (0.11)	0.75 (0.10)	0.75 (0.08)	0.76 (0.12)	0.74 (0.14)	0.73 (0.16)
BI MLV (cm/s)	0.71 (0.11)	0.70 (0.09)	0.72 (0.10)	0.75 (0.13)	0.76 (0.15)	0.72 (0.14)
BI APF (Hz)	0.25 (0.07)	0.24 (0.09)	0.24 (0.09)	0.24 (0.00)	0.23 (0.07)	0.24 (0.07)
BI MLF (Hz)	0.93 (0.31)	0.94 (0.29)	0.88 (0.31)	0.93 (0.30)	0.93 (0.28)	0.95 (0.29)
UR COP (cm ²)	5.59 (1.88)	5.67 (2.05)	5.86 (2.27)	5.65 (3.07)	5.74 (2.09)	5.91 (1.87)
UR APV (cm/s)	1.71 (0.45)	1.75 (0.34)	2.84 (0.51)	1.89 (0.60)	1.74 (0.44)	1.72 (0.48)
UR MLV (cm/s)	2.18 (0.66)	2.12 (0.38)	2.30 (0.73)	2.28 (0.55)	2.04 (0.32)	1.99 (0.25)
UR APF (Hz)	0.40 (0.11)	0.37 (0.09)	0.40 (0.13)	0.42 (0.14)	0.42 (0.09)	0.40 (0.11)
UR MLF (Hz)	0.70 (0.20)	0.62 (0.18)	0.75 (0.40)	0.64 (0.11)	0.62 (0.13)	0.62 (0.12)
UL COP (cm ²)	5.79 (1.79)	5.76 (1.47)	5.64 (2.25)	5.56 (1.35)	5.67 (1.38)	5.59 (1.26)
UL APV (cm/s)	1.80 (0.30)	1.67 (0.29)	1.70 (0.32)	1.86 (0.46)	1.76 (0.36)	1.67 (0.30)
UL MLV (cm/s)	2.28 (0.46)	2.19 (0.39)	2.17 (0.39)	2.43 (0.60)	2.11 (0.36)	1.97 (0.35)*
UL APF (Hz)	0.40 (0.13)	0.35 (0.13)	0.47 (0.29)	0.42 (0.11)	0.27 (0.10)	0.38 (0.10)
UL MLF (Hz)	0.71 (0.16)	0.56 (0.15)	0.65 (0.12)	0.73 (0.17)	0.55 (0.19)*	0.61 (0.13)

Data expressed as mean (SD). BI: bipedal. UR: unipedal right leg. UL: unipedal left leg. COP: center of pressure. APV: anteroposterior velocity. MLV: mediolateral velocity. APF: anteroposterior frequency. MLF: mediolateral frequency. * $p \leq 0.005$ compared with basal. Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test for between-time analysis.

Discussion

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are routinely prescribed to alleviate post-exercise muscle pain and improve recovery of muscle function related to DOMS (Schoenfeld 2012; Luque et al. 2023). Nonetheless, NSAIDs are known to induce several adverse effects on the stomach, kidneys, and liver, as well as its chronic use/high dosage may contribute to cause abuse of NSAIDs and other substances, such as performance enhancers (Cheung et al. 2003; Luque et al. 2023). Moreover, its chronic use is related to impairments in the adaptation of muscle tissue in response to exercise (Cheung et al. 2003; Schoenfeld 2012; Luque et al. 2023). Further reinforcing the contraindication of NSAID use, recent systematic reviews with meta-analysis and randomized placebo-controlled studies also demonstrated NSAIDs are not superior to control drugs and/or placebos in effectively controlling DOMS-related symptoms, including muscle pain and recovery from decrements in muscle strength (Nahon et al. 2021; Roberts et al. 2024).

Therefore, investigating new compounds that can act as substances that improve performance and attenuate negative symptoms related to the post-exercise recovery period proves to be essential for high-level performance in professional athletes. In preclinical studies, DSM has shown anti-inflammatory and analgesic effects in models of pain, with suggested mechanisms that range from inhibition of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines/transcription factors such as nuclear factor κ B (NF κ B) to reduced spinal glial activity and opioidergic pathways induction (Carballo-Villalobos et al. 2018; Fattori et al. 2020). In humans, DSM potential analgesic effects have been evaluated in previous studies with promising results for hemorrhoids- (Diana et al. 2000), radicular- (Wang Y et al. 2017), and total knee arthroplasty- (Wang Q et al. 2024) related pain.

Our study investigated for the first time, the effects of DSM intervention for exercise-induced muscle pain. Although an improved performance was not observed during the EIMD protocol under DSM consumption, we showed that DSM preventive supplementation can affect muscle soreness, oxidative stress, recovery of muscle strength, and postural balance during the course of DOMS. The greatest analgesic effect was detected on the climbing stairs at 48th hour after EIMD protocol. The same analgesic activity was not evidenced for

descending stairs, possibly due to the fact that climbing stairs leads to higher energy expenditure and, consequently, effort when compared to descending stairs (Teh and Aziz 2002). Regarding oxidative stress parameters, no major variations were observed between times and groups. Our sample group is exclusively composed by athletes, which may explain these minimal changes. It has been proposed that trained individuals are less vulnerable to oxidative insults due to an optimized and long-lasting antioxidant system (Spanidis et al. 2018; Lu et al. 2021). ROS are even proposed as important molecules related to the adaptation of skeletal muscle tissue in response to exercise (Powers et al. 2010). In turn, DSM has inherent antioxidant capacity due to its chemical structure (Alkhalif 2020). For MDA levels, which reflects lipid peroxidation in cells, DSM intervention led to their moderate decrease at 48 hours after EIMD. Since elevated oxidative stress contributes to inducing pain (Bussulo et al. 2021), the reduced MDA levels observed here after DSM pre-treatment may explain the decrease muscle soreness in climbing stairs detected at the same time-period after EIMD.

Preventive DSM supplementation also prevented the decline in muscle strength with a moderate magnitude of effect. This data is extremely important in terms of athletic performance. A possible relationship may also be attributed to the antioxidant effects of DSM. Acute bouts of many types of exercises, including resistance exercise, results in increased production of ROS in both skeletal muscle tissue and blood, and high levels of ROS may promote oxidative damage in skeletal muscle fibers (including lipid peroxidation) and impair maximal muscle force production (Powers et al. 2020). Therefore, the preemptive inhibition of force reduction conferred by DSM suggest a relation with its anti-oxidative properties. DSM's preventive intervention also contributes to refining the postural balance of athletes, as evidenced by reductions in AP and ML velocities (the speed of displacement) and frequencies (the number of displacement) when compared to PLA preventive intervention, both contributing in a complementary way to the adaptation of postural balance from 24 hours after the EIMD. As proprioception plays a fundamental role in maintaining balance and coordination during physical activities related to sports gestures (Yilmaz et al. 2024), its optimization can guarantee that athletes conduct precise and controlled movements, which are crucial for performance in sports

that require agility, speed, and precision, such as futsal. The precise mechanisms by which DSM promotes these refinements on postural balance are not fully understood, however, its phlebotonic properties may facilitate muscle pump system amelioration, which, associated with the reduction on muscle strength, may be important for muscle contribution in balance control, which include the quadriceps muscle evaluated here.

This study has limitations. The limited follow-up to 48th hour (and not at later time-points), the lack of muscle tissue samples to evaluate local markers of oxidative stress, and the sample being composed exclusively of women (men not investigated) represents some of the limitations of the present study. Thus, future studies are required to address these issues. Our findings on the effects of DSM on DOMS in this first study highlights the importance of further investigation into longer treatment regimens, alternative doses and different exercise modalities for both female and male athletes. Further exploration of the beneficial effects of DSM as an analgesic compound in exercise-induced muscle pain will allow us to determine the most rational ways and conditions for its use.

The present study suggests that DSM preload supplementation can alleviate excessive oxidative stress and muscle soreness, as well as accelerate muscle recovery and improve postural balance parameters after EIMD in professional female futsal, with effects ranging from trivial-to-moderate, depending on the analyzed parameter. As a practical application, our data support the preemptive supplementation with DSM as a potential strategy to reduce the symptomatology of DOMS in athletes, especially during the pre-season activities, a period in which they are most susceptible to the deleterious clinical aspects of EIMD and DOMS. Considering the findings of the present study, the hypothesis is raised that DSM may add positive effects in the preparation of high-performance athletes aiming for better performance in sports, such as futsal.

Finding information and acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular (FUNADESP) research fellowship for Andreo F. Aguiar (55-1357/2022), Juliano Casonatto (55-

16472023), and Sergio M. Borghi (55-1363/2022) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) senior research fellowship for Waldiceu A. Verri Jr. (309633/2021-4). Governo do Estado do Paraná, Conselho Paranaense de Ciência e Tecnologia, and Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia, e Ensino Superior (SETI) (dotação orçamentária # 4560.19.571.06.6153; eprotocolo 21.234.745-0). We also thank the exercise physiology laboratory of University of Northern Paraná.

Declaration of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

Authorship contributions

F.C.B.C. involved in conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, validation, visualization, and writing original draft. G.B.C. involved in data curation, formal analysis, investigation, and methodology. I.M.P. involved in data curation formal, analysis, investigation, and methodology. M.M.S. involved in data curation formal, analysis, investigation, and methodology. J.M.B. involved in data curation, formal analysis, investigation, and methodology. M.M.B. involved in data curation, formal analysis, investigation, and methodology. J.L.J. involved in data curation, formal analysis, investigation, and methodology. T.T.C. involved in formal analysis, investigation, methodology, and writing – review & editing. A.F.A. involved in formal analysis, investigation, methodology, and funding acquisition. J.C. involved in data curation, formal analysis, and funding acquisition. E.O.J. involved in data curation, formal analysis, investigation, and methodology. W.A.V. Jr. involved in data curation, formal analysis, methodology, and funding acquisition. S.M.B. involved in conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, project administration, resources, supervision, validation, writing – review & editing.

Data availability statement

The data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Alkhalaf MI. 2020. Diosmin protects against acrylamide-induced toxicity in rats: Roles of oxidative stress and inflammation. *J King Saud University - Science*. 32:1510-1515.
- Ammar A, Turki M, Chtourou H, Hammouda O, Trabelsi K, Kallel C, Abdelkarim O, Hoekelmann A, Bouaziz M, Ayadi F et al. 2016. Pomegranate Supplementation Accelerates Recovery of Muscle Damage and Soreness and Inflammatory Markers after a Weightlifting Training Session. *PLoS One*. 11(10):e0160305.
- Bussulo SKD, Ferraz CR, Carvalho TT, Verri WA, Jr., Borghi SM. 2021. Redox interactions of immune cells and muscle in the regulation of exercise-induced pain and analgesia: implications on the modulation of muscle nociceptor sensory neurons. *Free Radic Res*. 55(7):757-775.
- Carballo-Villalobos AI, Gonzalez-Trujano ME, Pellicer F, Alvarado-Vasquez N, Lopez-Munoz FJ. 2018. Central and peripheral anti-hyperalgesic effects of diosmin in a neuropathic pain model in rats. *Biomed Pharmacother*. 97:310-320.
- Carey CC, Lucey A, Doyle L. 2021. Flavonoid Containing Polyphenol Consumption and Recovery from Exercise-Induced Muscle Damage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med*. 51(6):1293-1316.
- Cheung K, Hume P, Maxwell L. 2003. Delayed onset muscle soreness : treatment strategies and performance factors. *Sports Med*. 33(2):145-164.
- Cohen J. 1992. A power primer. *Psychol Bull*. 112(1):155-159.
- Diana G, Catanzaro M, Ferrara A, Ferrari P. 2000. [Activity of purified diosmin in the treatment of hemorrhoids]. *Clin Ter*. 151(5):341-344.
- Fahmy A, Abuelenain GL, Rasheed N, Abdou A. 2021. 'de Novo' repurposing of Daflon as anti-intestinal parasitic drug in experimental giardiasis. *Exp Parasitol*. 226-227:108124.
- Fattori V, Rasquel-Oliveira FS, Artero NA, Ferraz CR, Borghi SM, Casagrande R, Verri WA, Jr. 2020. Diosmin Treats Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Pain and Peritonitis by Blocking NF-kappaB Activation in Mice. *J Nat Prod*. 83(4):1018-1026.
- Ferraz CR, Carvalho TT, Manchope MF, Artero NA, Rasquel-Oliveira FS, Fattori V, Casagrande R, Verri WA, Jr. 2020. Therapeutic Potential of

Flavonoids in Pain and Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and Clinical Data, and Pharmaceutical Development. *Molecules*. 25(3).

Gerges SH, Wahdan SA, Elsherbiny DA, El-Demerdash E. 2022. Pharmacology of Diosmin, a Citrus Flavone Glycoside: An Updated Review. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 47(1):1-18.

Goes RA, Lopes LR, Cossich VRA, de Miranda VAR, Coelho ON, do Carmo Bastos R, Domenis LAM, Guimaraes JAM, Grangeiro-Neto JA, Perini JA. 2020. Musculoskeletal injuries in athletes from five modalities: a cross-sectional study. *BMC Musculoskelet Disord*. 21(1):122.

Hotfiel T, Freiwald J, Hoppe MW, Lutter C, Forst R, Grim C, Bloch W, Huttel M, Heiss R. 2018. Advances in Delayed-Onset Muscle Soreness (DOMS): Part I: Pathogenesis and Diagnostics. *Sportverletz Sportschaden*. 32(4):243-250.

Hryvniak D, Wilder RP, Jenkins J, Statuta SM. 2021. Chapter 15, Therapeutic Exercise. In: Cifu DX, editor. *Braddom's Physical Medicine and Rehabilitation*. Sixth Edition ed.; p. 291-315.

Hughes JD, Denton K, R SL, Oliver JL, De Ste Croix M. 2018. The Impact of Soccer Match Play on the Muscle Damage Response in Youth Female Athletes. *Int J Sports Med*. 39(5):343-348.

Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P. 2019. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxid Med Cell Longev*. 2019:1279250.

Kirienko A, Radak D. 2016. Clinical acceptability study of once-daily versus twice-daily micronized purified flavonoid fraction in patients with symptomatic chronic venous disease: a randomized controlled trial. *Int Angiol*. 35(4):399-405.

Lim CY, In J. 2021. Considerations for crossover design in clinical study. *Korean J Anesthesiol*. 74(4):293-299.

Lu Y, Wiltshire HD, Baker JS, Wang Q. 2021. Effects of High Intensity Exercise on Oxidative Stress and Antioxidant Status in Untrained Humans: A Systematic Review. *Biology (Basel)*. 10(12).

Luque MZ, Aguiar AF, da Silva-Araujo AK, Zaninelli TH, Heintz OK, Saraiva-Santos T, Bertozzi MM, Souza NA, Junior EO, Verri WA, Jr. et al. 2023. Evaluation of a preemptive intervention regimen with hesperidin methyl chalcone in delayed-onset muscle soreness in young adults: a randomized,

- double-blinded, and placebo-controlled trial study. *Eur J Appl Physiol.* 123(9):1949-1964.
- Misra HP. 1974. Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. *J Biol Chem.* 249(7):2151-2155.
- Morgan PT, Wollman PM, Jackman SR, Bowtell JL. 2018. Flavanol-Rich Cacao Mucilage Juice Enhances Recovery of Power but Not Strength from Intensive Exercise in Healthy, Young Men. *Sports (Basel).* 6(4).
- Nahon RL, Silva Lopes JS, de Magalhães Neto AM, Machado AS, Cameron LC. 2021. Anti-inflammatories for delayed onset muscle soreness: systematic review and meta-analysis. *Rev Bras Med Esporte.* 27(6):646-654.
- Nicol LM, Rowlands DS, Fazakerly R, Kellett J. 2015. Curcumin supplementation likely attenuates delayed onset muscle soreness (DOMS). *Eur J Appl Physiol.* 115(8):1769-1777.
- Ohrbach R, Gale EN. 1989. Pressure pain thresholds, clinical assessment, and differential diagnosis: reliability and validity in patients with myogenic pain. *Pain.* 39(2):157-169.
- Perera N, Liolitsa D, Iype S, Croxford A, Yassin M, Lang P, Ukaegbu O, van Issum C. 2012. Phlebotonics for haemorrhoids. *Cochrane Database Syst Rev.*(8):CD004322.
- Powers SK, Deminice R, Ozdemir M, Yoshihara T, Bomkamp MP, Hyatt H. 2020. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *J Sport Health Sci.* 9(5):415-425.
- Powers SK, Duarte J, Kavazis AN, Talbert EE. 2010. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol.* 95(1):1-9.
- Powers SK, Jackson MJ. 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 88(4):1243-1276.
- Ramelet AA. 2001. Clinical benefits of Daflon 500 mg in the most severe stages of chronic venous insufficiency. *Angiology.* 52 Suppl 1:S49-56.
- Roberts BM, Sczuroski CE, Caldwell AR, Zeppetelli DJ, Smith NI, Pecorelli VP, Gwin JA, Hughes JM, Staab JS. 2024. NSAIDs do not prevent exercise-induced performance deficits or alleviate muscle soreness: A placebo-controlled randomized, double-blinded, cross-over study. *J Sci Med Sport.* 27(5):287-292.

- Robertson RJ, Goss FL, Rutkowski J, Lenz B, Dixon C, Timmer J, Frazee K, Dube J, Andreacci J. 2003. Concurrent validation of the OMNI perceived exertion scale for resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 35(2):333-341.
- Romero-Morales C, Lopez-Lopez D, Almazan-Polo J, Mogedano-Cruz S, Sosa-Reina MD, Garcia-Perez-de-Sevilla G, Martin-Perez S, Gonzalez-de-la-Flor A. 2024. Prevalence, diagnosis and management of musculoskeletal disorders in elite athletes: A mini-review. *Dis Mon.* 70(1):101629.
- Ruiz-Iglesias P, Gorgori-Gonzalez A, Massot-Cladera M, Castell M, Perez-Cano FJ. 2021. Does Flavonoid Consumption Improve Exercise Performance? Is It Related to Changes in the Immune System and Inflammatory Biomarkers? A Systematic Review of Clinical Studies since 2005. *Nutrients.* 13(4).
- Schoenfeld BJ. 2012. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for exercise-induced muscle damage: implications for skeletal muscle development. *Sports Med.* 42(12):1017-1028.
- Smith LL. 1992. Causes of Delayed Onset Muscle Soreness and the Impact on Athletic Performance: A Review. *J Strength Cond Res.* 6(3):135-141.
- Souglis A, Bourdas DI, Gioldasis A, Ispirlidis I, Philippou A, Zacharakis E, Apostolidis A, Efthymiou G, Travlos AK. 2023. Time Course of Performance Indexes, Oxidative Stress, Inflammation, and Muscle Damage Markers after a Female Futsal Match. *Sports (Basel).* 11(7).
- Spanidis Y, Stagos D, Papanikolaou C, Karatza K, Theodosi A, Veskokouk AS, Deli CK, Poullos A, Koulocheri SD, Jamurtas AZ et al. 2018. Resistance-Trained Individuals Are Less Susceptible to Oxidative Damage after Eccentric Exercise. *Oxid Med Cell Longev.* 2018:6857190.
- Teh KC, Aziz AR. 2002. Heart rate, oxygen uptake, and energy cost of ascending and descending the stairs. *Med Sci Sports Exerc.* 34(4):695-699.
- Wang Q, Jin Q, Cai L, Zhao C, Feng P, Jia J, Xu W, Qian Q, Ding Z, Xu J et al. 2024. Efficacy of Diosmin in Reducing Lower-Extremity Swelling and Pain After Total Knee Arthroplasty: A Randomized, Controlled Multicenter Trial. *J Bone Joint Surg Am.* 106(6):492-500.
- Wang Y, Fang X, Ye L, Li Y, Shi H, Cao Y. 2017. A Randomized Controlled Trial Evaluating the Effects of Diosmin in the Treatment of Radicular Pain. *Biomed Res Int.* 2017:6875968.

Yilmaz O, Soylu Y, Erkmen N, Kaplan T, Batalik L. 2024. Effects of proprioceptive training on sports performance: a systematic review. *BMC Sports Sci Med Rehabil.* 16(1):149.

Figure captions

Fig. 1. CONSORT flow diagram detailing the experimental design used and the flow of participants through each stage (O1-O6) of the randomized crossover trial. The supplementation with PLA or DSM was carried out for three days, initiating on the day of baseline evaluations (O3), followed by the two subsequent days, being the last day, the test day of EIMD test (O4). The evaluations of muscle soreness, blood samples, muscle strength test, and postural balance were performed for both allocations 1 and 2.

Fig. 2. Effects of PLA and DSM preventive supplementation on plasmatic levels of oxidative stress. Evaluations on FRAP (A), ABTS (B), GSH (C), NBT (D), and MDA (E) levels at baseline and 24th and 48th after EIMD were performed. Data are presented as mean $\pm$ SD, in optical density (OD), per milliliter (ml) of plasma. * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.05$ indicate significant differences with the earlier time points (basal and 24th hour, respectively). Two-way ANOVA with repeated measures followed by Tukey's post hoc.

Fig. 3. Effects of PLA and DSM preventive supplementations on measures of muscle soreness. Evaluations on quadriceps palpation (A), sitting and getting up (B), climbing stairs (C), and descending stairs (D) at baseline and 24th and 48th after EIMD were performed. Data are presented as mean $\pm$ SD, in centimeters (cm). * $P \leq 0.05$ indicates significant differences with the earlier time points (basal). Two-way ANOVA with repeated measures followed by Tukey's post hoc.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que a suplementação de DSM pode aliviar dor e estresse oxidativo excessivo, além de acelerar a recuperação muscular e melhorar o equilíbrio postural após DMIE, com efeitos que variam de triviais a moderados, dependendo do parâmetro analisado. Portanto, o DSM pode ser uma opção interessante para manter a qualidade e intensidade dos treinos e competições.

A pesquisa abre novos caminhos sobre as propriedades biológicas do DSM, que agora incluem DOMS atenuantes. Nossas descobertas sobre os efeitos do DSM no DMIT neste primeiro estudo destaca a importância de uma investigação mais aprofundada sobre tratamentos mais longos regimes, doses alternativas e diferentes modalidades de exercício para mulheres e homens atletas.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, R. N.; COSTA, L. O. P.; SAMULSKI, D. M. Monitoring and prevention of overtraining in athletes. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 5, p. 291–296, 2006.
- AMIEL, M.; BARBE, R. [Study of the pharmacodynamic activity of daflon 500 mg]. **Annales De Cardiologie Et D'angeiologie**, v. 47, n. 3, p. 185–188, 1 mar. 1998.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, jul. 1996.
- Bussulo, S. K. D., C. R. Ferraz, T. T. Carvalho, W. A. Verri, Jr. and S. M. Borghi. "Redox interactions of immune cells and muscle in the regulation of exercise-induced pain and analgesia: implications on the modulation of muscle nociceptor sensory neurons." **Free Radic Res** 55(7): 757-775, 2021.
- BORGHI, S. M. et al. The flavonoid quercetin inhibits titanium dioxide (TiO₂)-induced chronic arthritis in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 53, p. 81–95, 2018.
- CAREY, C. C.; LUCEY, A.; DOYLE, L. Flavonoid Containing Polyphenol Consumption and Recovery from Exercise-Induced Muscle Damage: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports Medicine**, v. 51, n. 6, p. 1293–1316, 9 mar. 2021.
- CHEUNG, K.; HUME, P. A.; MAXWELL, L. Delayed Onset Muscle Soreness. **Sports Medicine**, v. 33, n. 2, p. 145–164, 23 out. 2012.
- FERRAZ et al. Therapeutic Potential of Flavonoids in Pain and Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and Clinical Data, and Pharmaceutical Development. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 762, 10 fev. 2020.
- HAYASHI, H. et al. Randomized Phase II Trial Comparing Site-Specific Treatment Based on Gene Expression Profiling With Carboplatin and Paclitaxel for Patients With

Cancer of Unknown Primary Site. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 7, p. 570–579, 1 mar. 2019.

KREHER, J. B.; SCHWARTZ, J. B. Overtraining Syndrome. **Sports Health: A Multidisciplinary Approach**, v. 4, n. 2, p. 128–138, 31 jan. 2012.

KUSKOSKI, E. M. et al. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 691–693, dez. 2004.

LEWIS, P. B.; RUBY, D.; BUSH-JOSEPH, C. A. Muscle Soreness and Delayed-Onset Muscle Soreness. **Clinics in Sports Medicine**, v. 31, n. 2, p. 255–262, abr. 2012.

LIMA, L. V.; ABNER, T. S. S.; SLUKA, K. A. Does exercise increase or decrease pain? Central mechanisms underlying these two phenomena. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 13, p. 4141–4150, 26 maio 2017.

LUQUE, M. Z. et al. Evaluation of a preemptive intervention regimen with hesperidin methyl chalcone in delayed-onset muscle soreness in young adults: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled trial study. **European journal of applied physiology**, v. 123, n. 9, p. 1949–1964, 1 set. 2023.

MACINTYRE, D. L.; REID, W. D.; MCKENZIE, D. C. Delayed Muscle Soreness. **Sports Medicine**, v. 20, n. 1, p. 24–40, jul. 1995.

MANCHOPE, M. F. et al. Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO–cGMP–PKG–KATPChannel Signaling Pathway. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153015, 5 abr. 2016.

MOIR, G. L. Three Different Methods of Calculating Vertical Jump Height from Force Platform Data in Men and Women. **Measurement in Physical Education and Exercise Science**, v. 12, n. 4, p. 207–218, 14 out. 2008.

NICOL, L. M. et al. Curcumin supplementation likely attenuates delayed onset muscle soreness (DOMS). **European Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 8, p. 1769–1777, 21 mar. 2015.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Exercise as Medicine - Evidence for Prescribing Exercise as Therapy in 26 Different Chronic Diseases. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 25, n. s3, p. 1–72, 25 nov. 2015.

PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B. **Chemico-Biological Interactions**, v. 228, p. 88–99, 25 fev. 2015.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, maio 1999.

RICE, D. et al. Exercise-Induced Hypoalgesia in Pain-Free and Chronic Pain Populations: State of the Art and Future Directions. **The Journal of Pain**, v. 20, n. 11, p. 1249–1266, 1 nov. 2019.

Roveratti, Jacinto. ARTIGO ORIGINAL. **Rev Bras Reumatol**, v. 51, n. 4, p. 299–308, 2011.

SILVA, L. P. O. DA; OLIVEIRA, M. F. M. DE; CAPUTO, F. Métodos de recuperação pós-exercício. **Rev. educ. fis**, p. 489–508, 2013.

STREFEZZA, E. F. Comparative study of diosmin/hesperidin tablet and sachet formulations in the treatment of pain and edema of the lower limbs in chronic venous disease. **RBM rev. bras. Med**, 2010.

STRATH, S. J. et al. Guide to the Assessment of Physical Activity: Clinical and Research Applications. **Circulation**, v. 128, n. 20, p. 2259–2279, 12 nov. 2013.

TANSKANEN, M.; ATALAY, M.; UUSITALO, A. Altered oxidative stress in overtrained athletes. **Journal of Sports Sciences**, v. 28, n. 3, p. 309–317, fev. 2010.

VINA, J. et al. Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 1, p. 1–12, 3 ago. 2012.

7. ANEXO



UNIVERSIDADE PITÁGORAS
UNOPAR ANHANGUERA



Continuação do Parecer: 5.809.085

/ Brochura Investigador	Projeto.pdf	09:42:34	Borgi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	04/11/2022 09:42:20	Sergio Marques Borgi	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	04/10/2022 08:12:51	Sergio Marques Borgi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 12 de Dezembro de 2022

Assinado por:
Regina Célia PoliFrederico
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Marcella, 591

Bairro: Jardim Piza

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-9849

CEP: 86.041-140

E-mail: cep@unopar.br