



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

LILIANA SKAF SANTOS GONÇALVES

EFEITOS AGUDOS DA INGESTÃO DE BEBIDA ENERGÉTICA NA FUNÇÃO
ENDOTELIAL EM ADULTOS SAUDÁVEIS

RIO DE JANEIRO
2022

LILIANA SKAF SANTOS GONÇALVES

EFEITOS AGUDOS DA INGESTÃO DE BEBIDA ENERGÉTICA NA FUNÇÃO
ENDOTELIAL EM ADULTOS SAUDÁVEIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Cardiovasculares, do Instituto Nacional
de Cardiologia, como pré-requisito à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Cardiovasculares.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Tibiriçá

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Arthur B. Kasal

Rio de Janeiro
2022

G635e Gonçalves, Liliana Skaf Santos.

Efeitos agudos da ingestão de bebida energética na função endotelial em adultos saudáveis / Liliana Skaf Santos – Rio de Janeiro, 2022.

Orientador: Eduardo Tibiriçá

Coorientador: Daniel Arthur B. Kasal

75 f.

Dissertação (Mestrado profissional em Ciências Cardiovasculares) Instituto Nacional de Cardiologia – INC

1. Função endotelial microvascular. 2. Bebida energética. 3. Laser Speckle. I. Título.

LILIANA SKAF SANTOS GONÇALVES

**EFEITOS AGUDOS DA INGESTÃO DE BEBIDA ENERGÉTICA NA FUNÇÃO
ENDOTELIAL EM ADULTOS SAUDÁVEIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Cardiovasculares, do Instituto Nacional
de Cardiologia, como pré-requisito à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Cardiovasculares.

Aprovada em 08/09/2022.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Tibiriçá
Orientador
Instituto Nacional de Cardiologia

Prof. Dr. Daniel Arthur B. Kasal
Coorientador
Instituto Nacional de Cardiologia

Prof^a. Dra. Valéria Verri
Membro interno (Presidente)
Instituto Nacional de Cardiologia

Prof^a. Dra. Fabiula Schwartz de Azevedo
Membro interno
Instituto Nacional de Cardiologia

Prof^a. Dra. Sandra Barbosa
Membro externo
Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ)

Prof^a. Dra. Grazielle Huguenin
Membro interno (suplente)
Instituto Nacional de Cardiologia

Prof^a. Dra. Bianca M. Gregório
Membro externo (suplente)
Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ)

Dedico ao meu querido pai Jaime que aos 90 anos é meu maior incentivador.

*Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.*

Mahatma Gandhi

RESUMO

Introdução: As bebidas energéticas (BE) são bebidas não-alcoólicas prontas para consumo, que possuem em sua composição ingredientes principais o açúcar, a taurina e a cafeína, além de vitaminas do complexo B e demais substâncias. O seu consumo vem aumentando no mundo, havendo poucos estudos e com resultados discordantes, sobre seus efeitos cardiovasculares agudos em adultos jovens. O sistema de contraste de imagens por laser speckle (LSCI) é uma metodologia não-invasiva e baseada em luz laser utilizada para avaliar a função endotelial microvascular sistêmica.

Objetivos: Avaliar a reatividade microvascular sistêmica antes e após o consumo de uma BE (250 ml) em comparação com o controle (consumo de água), por voluntários jovens e saudáveis.

Métodos: Estudo intervencional randomizado incluindo 22 voluntários jovens do sexo masculino com idade média de $25 \pm 4,8$ anos. A avaliação do fluxo sanguíneo microvascular cutâneo no antebraço usou o LSCI acoplado à iontoforese de acetilcolina (Ach), com correntes anódicas crescentes, antes e após 90 e 180 minutos do consumo de BE ou da mesma quantidade de água, seguido do teste de hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO). O consumo de BE e de água foi realizado com intervalo de aproximadamente duas semanas, mediante randomização.

Resultados: Na avaliação das alterações da condutância microvascular cutânea induzida por Ach como na HRPO, não houve nenhuma alteração significativa na vasodilatação dos indivíduos que consumiram BE, em nenhuma das três fases do exame.

Discussão: A análise dos dados sugere que o consumo agudo de uma BE não afeta a função endotelial microvascular de adultos jovens saudáveis. O registro de efeitos adversos das BE na literatura pode em parte estar associado ao consumo concomitante de outras substâncias, que não foram avaliadas no presente estudo por razões éticas. Finalmente, o consumo associado a complicações pode envolver volumes maiores que o testado neste estudo.

Palavras-chave: Função endotelial microvascular, bebida energética, laser speckle

ABSTRACT

Introduction: Energy drinks (ED) are ready-to-drink non-alcoholic drinks that have sugar, taurine and caffeine in their composition, as well as B vitamins and other substances. Its consumption has been increasing worldwide, with few studies and conflicting results on its acute cardiovascular effects in young adults. The laser speckle contrast imaging (LSCI) system is a non-invasive, laser light-based methodology used to assess systemic microvascular endothelial function.

Objectives: To evaluate the systemic microvascular reactivity before and after the consumption of a ED (250 ml) compared to the control (water consumption), by young and healthy volunteers.

Methods: Randomized interventional study including 22 young male volunteers with a mean age of 25 ± 4.8 years. The assessment of cutaneous microvascular blood flow in the forearm used the LSCI coupled to acetylcholine iontophoresis (Ach), with increasing anodic currents, before and after 90 and 180 minutes of consumption of ED or the same amount of water, followed by the post-occlusive reactive hyperemia test (PORH). The consumption of ED and water was performed with an interval of approximately 2 weeks, by randomization.

Results: In the evaluation of changes in cutaneous microvascular conductance induced by Ach, as well as by PORH, there were no significant changes in the microvascular vasodilation of individuals who consumed ED, in any of the three phases of the examination.

Discussion: Data analysis suggests that acute consumption of an ED does not affect microvascular endothelial function in healthy young adults. The record of adverse effects of ED in the literature may in part be associated with the concomitant consumption of other substances, which were not evaluated in the present study for ethical reasons. Finally, consumption of ED associated with complications may involve volumes greater than that tested in this study.

Keywords: microvascular endothelial function, energy drinks, laser speckle

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Percentual de efeitos adversos mais frequentes por sistema orgânico, no público pediátrico, adulto e total da população	14
Figura 2 –	Coingestão de BE com outras substâncias.....	14
Figura 3 –	Anatomia da microcirculação	19
Figura 4 –	Principais sintomas dos relatórios de eventos adversos de bebidas energéticas da CAERS e do NPDS, no período de 2008-2015	22
Figura 5 –	Aparelho de laser speckle com contraste de imagem acoplado com iontoforese de água deionizada	24
Figura 6 –	Consumo de alimentos contendo cafeína.....	33
Figura 7 –	Tipos de alimentos contendo cafeína	33
Figura 8 –	Frequência do consumo de BE	33
Figura 9 –	Finalidade do consumo de BE	34
Figura 10 –	Consumo de bebidas alcoólicas entre os participantes	34
Figura 11 –	Frequência do consumo de bebida alcoólica entre os participantes do estudo	34
Figura 12 –	Efeitos da iontoforese de acetilcolina (ACh) na condutância microvascular cutânea [expressa em unidades arbitrárias de perfusão (UAP), dividida pela pressão arterial média em mmHg], em voluntários sadios, antes (BASAL) e 90 e 180 min após ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética.....	36
Figura 13 –	Área sob a curva de vasodilatação microvascular cutânea induzida pela iontoforese de acetilcolina (ACh) antes (BASAL) e 90 ou 180 min após ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética.....	37
Figura 14 –	Delta (diferença entre o pico e o valor basal) da condutância vascular cutânea (CVC) induzida pela iontoforese de acetilcolina (ACh) antes (BASAL) e 90 ou 180 min após ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética.....	38
Figura 15 –	Valores máximos de condutância vascular cutânea (CVC) induzida pela iontoforese de acetilcolina (ACh) antes (BASAL) e 90 ou 180 min após ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética.....	38
Figura 16 –	Valores máximos de condutância vascular cutânea (CVC) induzida pela iontoforese de acetilcolina (ACh) antes (BASAL) e 90 ou 180 min após ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética.....	39
Figura 17 –	Delta (diferença entre o pico e o valor basal) de condutância vascular cutânea (CVC) induzida pela hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) antes (BASAL) e 90 ou 180 min após ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética.....	39
Figura 18 –	Valores basais de condutância vascular cutânea (CVC) antes da ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética nos voluntários do estudo	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Algumas bebidas energéticas vendidas no Brasil e seus ingredientes	16
Tabela 2 –	Características clínicas e laboratoriais dos voluntários incluídos no estudo (n=22)	31
Tabela 3 –	Efeitos da ingestão de água mineral (controle) ou BE nos parâmetros cardiovasculares de voluntários saudáveis	32
Tabela 4 –	Participantes que consomem bebida alcoólica e BE e as marcas de BE citadas.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIR	Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e Bebidas não alcoólicas
Ach	Acetilcolina
AmED	Álcool misturado com bebida energética
ATP	Adenosina trifosfato
AUC Ach	Área sob a curva para a vasodilatação induzida pela acetilcolina
BE	Bebidas energéticas
CAERS	Centro de Segurança Alimentar e Nutrição Aplicada
CMC	Condutância microvascular cutânea
CVC	Condutância vascular cutânea
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EFSA	Autoridade europeia de segurança alimentar
GMPC	Monofosfato cíclico de guanosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HRPO	Hiperemia reativa pós oclusiva
IDR	Ingestão Diária Recomendada
IMC	Índice de massa corpórea
LDF	Fluxometria por laser doppler
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LSCI	Imagem de contraste por laser speckle
NO	Óxido nítrico
NPDS	Sistema Nacional de Dados de Intoxicações
RDC	Diretoria Colegiada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
	2.1 As bebidas energéticas	15
	2.2 A função endotelial microvascular.....	18
	2.3 Efeitos cardiovasculares das bebidas energéticas.....	20
	2.4 O laser speckle na microcirculação cutânea.....	23
3	JUSTIFICATIVA	25
4	OBJETIVOS	26
	4.1 Objetivo geral	26
	4.2 Objetivo específico.....	26
5	METODOLOGIA.....	27
	5.1 Desenho do estudo	27
	5.2 Amostra.....	27
	5.2.1 Critérios de inclusão	27
	5.2.2 Critérios de exclusão	27
	5.3 Procedimentos de coleta de dados	28
	5.3.1 Protocolo do estudo	28
	5.3.2 Técnicas de avaliação da microcirculação utilizadas.....	29
	5.4 Análise estatística	30
6	RESULTADOS	31
7	DISCUSSÃO	41
	7.1 Limitações do estudo	44
8	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
	ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	51
	ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	53
	ANEXO C – SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO À REVISTA	
	<i>MICROCIRCULATION</i>	55
	ANEXO D – ARTIGO CIENTÍFICO	56

1 INTRODUÇÃO

As bebidas energéticas (BE) vêm ao longo dos anos dominando o mercado de bebidas não alcoólicas (1). Elas contêm diversas combinações de ingredientes que comumente incluem, açúcares, cafeína, taurina, vitaminas e outras substâncias como glucuronolactona, aromatizantes e corantes (2).

São oferecidas pela indústria como tendo propriedades de aumento de energia, desempenho atlético, concentração, resistência e perda de peso (3, 4, 5). O consumo das BE tem aumentado significativamente no mundo ocidental, e a metade dos consumidores é constituída por crianças, adolescentes e adultos jovens. Apesar do uso amplo, a *International Society of Sports Nutrition* em seu posicionamento sobre BE, declarou que “muitas BE contêm numerosos ingredientes; esses produtos em particular merecem estudos adicionais para demonstrar a sua segurança e efeitos potenciais na performance física e mental” (6).

Apesar de não existirem muitos estudos experimentais avaliando os efeitos clínicos das BE, observa-se um crescente número de casos relatados referentes a eventos adversos associados à ingestão de BE.

Estudo de revisão e meta-análise publicado em 2020, utilizou os bancos de dados PubMed, MEDLINE e EMBASE, para avaliar os efeitos adversos após consumo de BE, entre os anos de 2007 a 2018, na população pediátrica e adulta, envolvendo vários países (Figura 1). Dos 32 estudos selecionados, os eventos relatados mais comuns foram, sintomas cardíacos (taquicardia, palpitações e dores no peito); sintomas gastrointestinais (dores abdominais e falta de apetite), neurológicos (dores de cabeça, tremores e tonturas) e psicológicos (insônia, mão trêmula, fala rápida, fraqueza e fadiga) (7).

Além disso, o estudo avaliou 6.796 consumidores sobre o consumo concomitante com outras substâncias, e 44,5% deles relataram consumir BE com álcool (Figura 2).

A literatura apresenta relatos contraditórios sobre seus efeitos na frequência cardíaca (8, 9) e na pressão arterial (10, 11). Poucos estudos avaliaram seus efeitos na função endotelial (12-14).

Devido à importância da microcirculação sistêmica na fisiopatologia das doenças cardiovasculares, a avaliação não-invasiva da função microvascular tornou-se essencial (15). Além disso, a disfunção microvascular pode coexistir, ou mesmo preceder, a disfunção macrovascular, provavelmente devido a mecanismos fisiopatológicos comuns de lesão vascular, tais como processos inflamatórios e estresse oxidativo (15). A utilização da microcirculação cutânea como um leito vascular acessível e representativo da reatividade microcirculatória sistêmica é uma abordagem útil e com reprodutibilidade superior em comparação com outras técnicas não-invasivas (16).

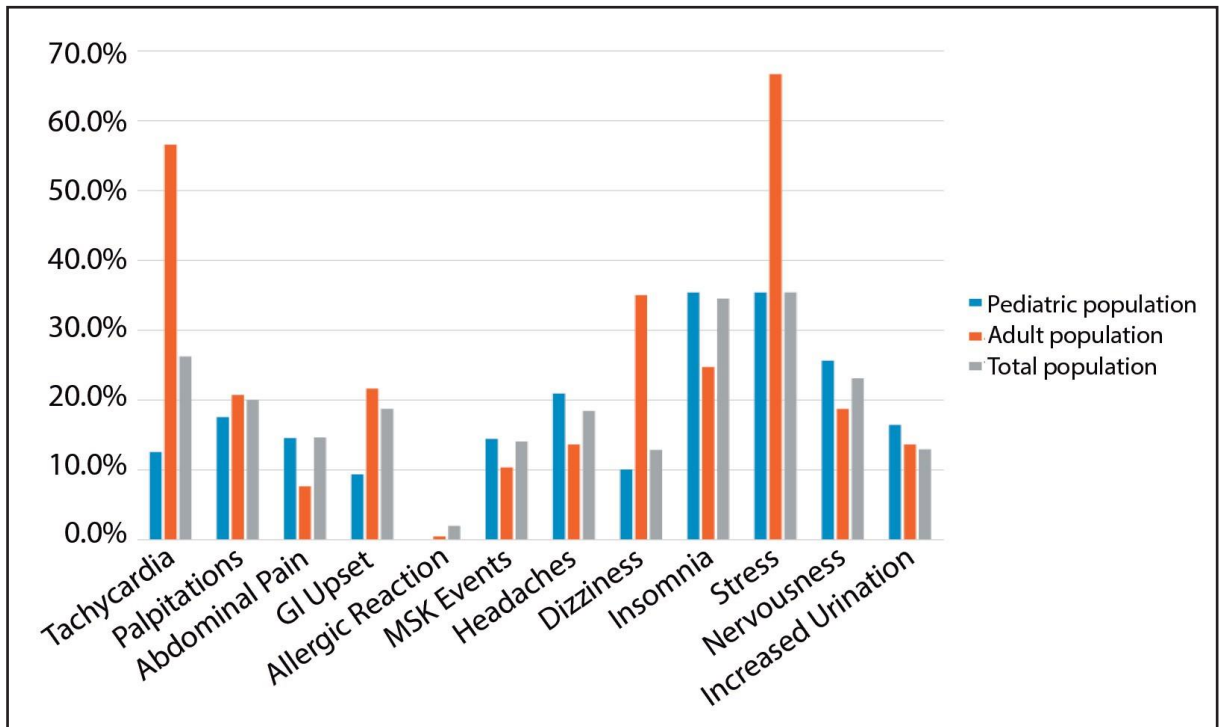


Figura 1 – Percentual de efeitos adversos mais frequentes por sistema orgânico, no público pediátrico, adulto e total da população

Legenda: MSK – musculoesquelético; GI – gastrointestinal.

Nota: Taquicardia; palpitações, dores abdominais; transtorno do trato gastrointestinal; reação alérgica; eventos musculoesqueléticos; dores de cabeça; tontura; insônia; estresse; nervosismo; micção frequente.

Fonte: Adaptado de Nadeem *et al*, 2021 [7].

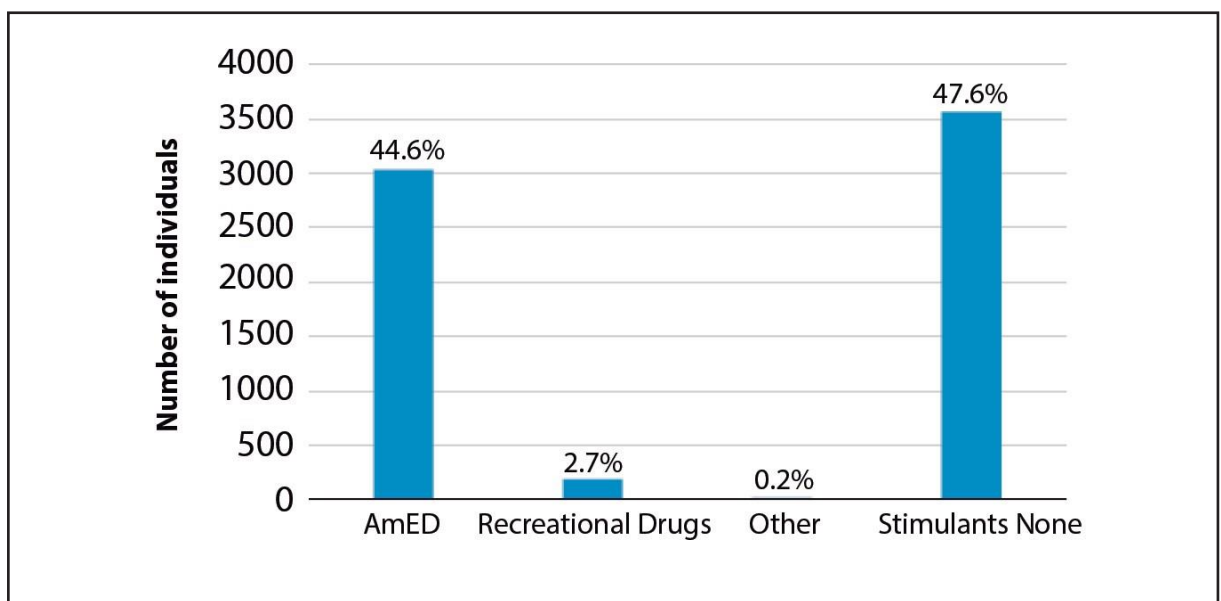


Figura 2 – Coingestão de BE com outras substâncias

Legenda: ED – bebida energética; AmED – álcool misturado com BE.

Nota: n=6 796 consumidores. Na vertical: número de indivíduos. Na horizontal: álcool misturado com BE; drogas recreativas; outros estimulantes; nenhum.

Fonte: Adaptado de Nadeem *et al*, 2021 [7].

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As bebidas energéticas

As primeiras bebidas energéticas surgiram na Ásia na década de 1960 mas foi na Europa partir da década de 1980, que se tornaram um dos maiores segmentos de vendas da indústria mundial (17).

Só no Brasil foram consumidos em 2020, 150.974 mil litros de BE, um aumento de 17,4% em relação ao ano anterior e, equivalente a 1,71 litros per capita, maior consumo da série histórica desde 2010 (1).

As BE são classificadas como sendo: *“Composto líquido pronto para consumo e que possui em sua composição como ingrediente(s) principal(is): Inositol e ou glucuronolactona e ou taurina e ou cafeína, podendo ser adicionado de vitaminas e minerais até 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) na porção do produto”* (18).

Há diversas marcas de BE vendidas no Brasil e no mundo que contém, além de diferentes ingredientes e quantidades, variadas versões de seus produtos, com e sem açúcar e sódio e as versões saborizadas.

Em estudo conduzido por Ramada e Nacif sobre consumo de BE por estudantes em uma Universidade em São Paulo em 2019 (19), as 3 BE mais citadas pelo público pesquisado foram: Red Bull® (36%), Fusion® (15%) e Monster Energy® (12%).

Sendo assim, comparamos as principais substâncias contidas na lista de ingredientes das marcas mencionadas no estudo, entre eles: cafeína, taurina, glucoronolactona, açúcares, vitaminas, sódio e outros. O volume da embalagem varia de acordo com a marca conforme demonstrado na Tabela 1.

Devido às características de fabricação, que incluem ainda o uso de compostos artificiais, como aromatizantes, espessantes, corantes, edulcorantes e acidulantes artificiais, as BE são consideradas alimentos ultraprocessados segundo os critérios de classificação da NOVA, base de dados criada por pesquisadores do Núcleo de Pesquisas Epidemiológicas em Nutrição e Saúde, Universidade de São Paulo/USP. Essa base de dados classificou os alimentos segundo critérios de processamento em: in natura, minimamente processados, processados e ultraprocessados) que formou a base para a elaboração do Guia Alimentar Brasileiro (20). São equiparadas ainda, no contexto da classificação da NOVA, à refrigerantes e bebidas açucaradas, devido ao teor aumentado de açúcares e sódio em sua composição (20).

Tabela 1 – Algumas bebidas energéticas vendidas no Brasil e seus ingredientes

Bebida Energética	Volume (ml) por lata	Cafeína (mg)	Taurina (mg)	Glucorono-lactona (mg)	Acúcar (g)	Vitaminas	Sódio (mg)	Outros
Red Bull®	250	80	1000	0	27,5	B3, B5, B6, B2, B12	103	Acidulantes, reguladores de acidez, aromatizantes, corante de caramelo.
Monster Energy®	473	153,7	1892	9,9	54,0	B3, B6, B2, B12	366,5	Inositol, extrato de guarana, maltodextrina, acidulante, reguladores de acidez, conservantes, aromatizantes, corantes (antocianinas).
Fusion Energy® sabor citrus	250	87,5	1000	0	5,5	B1, B3, B5, B6, B7 e D	9,75	Guarana, concentrado de cártamo, acidulantes, aromatizantes, regulador de acidez, edulcorantes: acessulfame de potássio e sucralose, corante (azul brilhante FCF).
Red Bull® sem açúcar	250	80	1000	0	0	B3, B5, B6, B2, B12	104	Acidulantes, reguladores de acidez, aromatizantes, corante de caramelo, edulcorantes: sucralose e acessulfame de potássio, espessante.

continua

conclusão

Bebida Energética	Volume (ml) por lata	Cafeína (mg)	Taurina (mg)	Glucorono-lactona (mg)	Acúcar (g)	Vitaminas	Sódio (mg)	Outros
Monster Energy® sem açúcar	473	153,7	1892	9,9	0	B3, B5, B6, B12,	359,5	Inositol, extrato de guarana, maltodextrina, edulcorantes artificiais: (eritritol, sucralose, acesulfame de potássio), acidulante, reguladores de acidez, conservantes, aromatizantes.

Fonte: Pesquisa por rótulos das marcas Red Bull® (250 ml); Red Bull® sem açúcar (250 ml); Monster Energy® (473 ml); Monster Energy® sem açúcar (473 ml) e Fusion Energy® sabor citrus (250 ml) em rede de supermercados Pão de Açúcar, na cidade do Rio de Janeiro/RJ, entre os meses de março a abril de 2022, e em consulta *online* <https://www.imigrantesbebidas.com.br/energetico-fusion-citrus-250ml>.

O público alvo das bebidas energéticas são adultos jovens (17), atraídos pela promessa da indústria de melhora da performance física, ganho de massa magra e redução de fadiga (21).

Apesar do consumo maior entre jovens adultos, tornou-se popular nas faixas etárias mais novas, inclusive crianças, diante da facilidade de obtenção dessas bebidas e do marketing agressivo (8).

Embora a agência reguladora americana de alimentos e bebidas, *Food and Drug Administration* (FDA) não disponha de uma regulação específica para as BE, existem limites de adição das principais substâncias, como a cafeína e taurina. No Brasil esses limites foram estabelecidos pela ANVISA através da Portaria nº 868/1998, em 350 mg/L e 400 mg/100 ml, respectivamente (22).

No entanto, a busca incessante do público consumidor pela melhora do desempenho mental e físico, fez aumentar no mundo todo os relatos de toxicidade pelo consumo de BE, comumente relacionados a alta ingestão de cafeína ou em associação com o consumo de substâncias lícitas ou ilícitas (23).

Em pesquisa realizada com 496 estudantes nos Estados Unidos da América (EUA) com idade de $21,5 \pm 3,7$ anos, 51% relataram ter consumido ao menos 1 lata

de BE no último mês. Desses consumidores 67% relataram dificuldades de sono, aumento de energia 65% e associação com álcool 54% (24).

Na pesquisa de Ramada (19), os estudantes relataram que consomem mais BE, quando associado ao álcool, principalmente vodka (55% dos entrevistados) seguido do whisky (24% dos entrevistados) da cerveja (8% dos entrevistados) e vinho tinto (4% dos entrevistados).

Em razão do crescente número de relatos médicos envolvendo os efeitos das BE, alguns países reforçaram a rotulagem até mesmo restringiram a venda em farmácias e proibiram a venda para menores de 15 anos, como o fez a Dinamarca Canadá e a França (25).

Apesar disso, há poucas políticas públicas de regulação sobre o consumo de BE muitas vezes associadas erroneamente com bebidas esportivas, o que chamou a atenção da *Canadian Pediatric Society*, em seu posicionamento à comunidade científica, alertando sobre os riscos à saúde de jovens e crianças sobre o consumo de BE (26).

2.2 A função endotelial microvascular

A microcirculação é definida como a circulação de sangue através de pequenos vasos do corpo (diâmetro $<100\ \mu\text{m}$) composta por arteríolas, metarteríolas, capilares e vênulas (27). As arteríolas são os principais responsáveis pela manutenção do tônus vascular e, conseqüentemente, pelo controle do gradiente de pressão existente entre os capilares proximais e distais. Deste modo, elas promovem o controle local do fluxo sanguíneo, de acordo com a demanda metabólica dos tecidos (28). Os capilares se originam das arteríolas e sua propriedade funcional altera dependendo da localização onde são recrutados. Nos órgãos metabolicamente ativos, como o coração, musculo esquelético e glândulas, a densidade capilar é alta, ao passo que no tecido subcutâneo ou cartilagens é baixa (29).

A função primária dos capilares é a de permitir as trocas de oxigênio, de nutrientes e de resíduos entre o sangue e as células teciduais, por meio do líquido intersticial. Sua estrutura é composta por uma única camada de células endoteliais (endotélio vascular) e por membrana basal, não tendo as túnicas média e externa (29). A Figura 3 apresenta uma visão esquemática da anatomia da microcirculação.

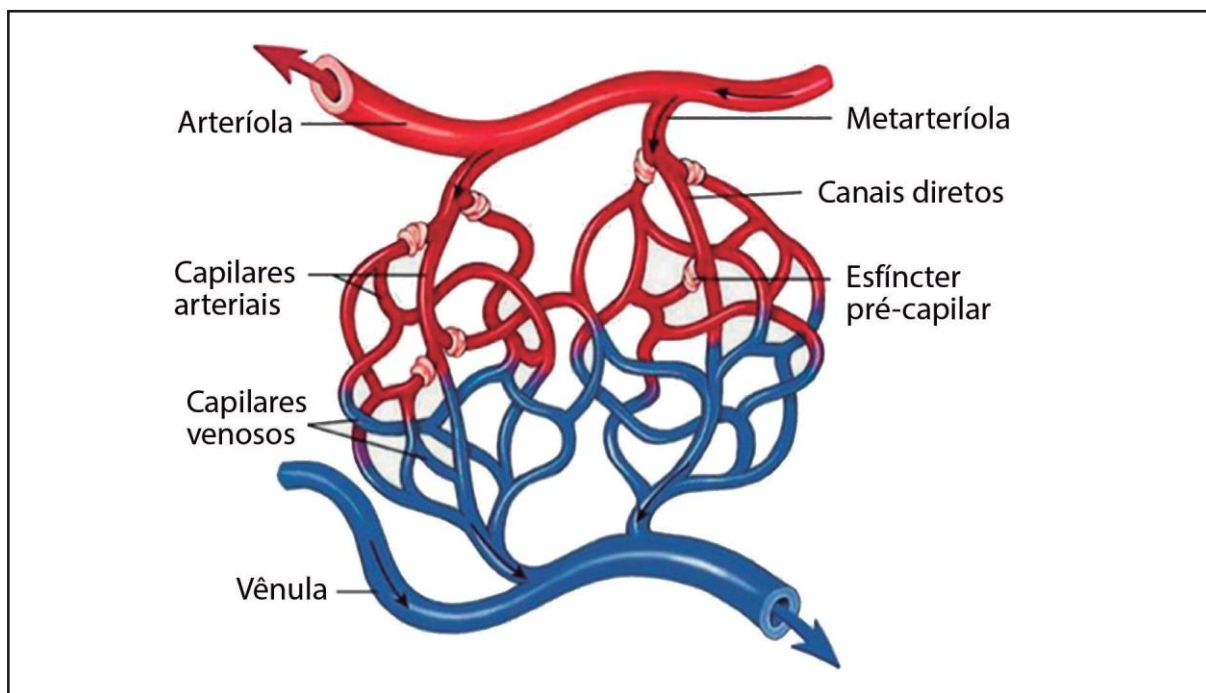


Figura 3 – Anatomia da microcirculaça3o

Fonte: Revista Brasileira de Terapia Intensiva. 2017; 29(2):238-247. (30)

As células endoteliais constituem um 3rg3o que se distribui por todo o corpo, formando uma interface din3mica com todos os outros 3rg3os. O endot3lio mede o t3nus vasomotor, regula o tr3fego de células e nutrientes, mant3m a fluidez do plasma, contribui para o balanço entre mediadores pr3 e anti-inflamat3rios, modula a atividade pr3-coagulante e anticoagulante, participa na formaça3o de novos vasos sang3neos, orquestra o desenvolvimento de 3rg3os, participa da imunidade e interage com as células sang3neas circulantes (31).

O endot3lio controla o t3nus da musculatura lisa vascular pela produça3o de mediadores que podem produzir vasodilataça3o ou vasoconstr33o (32). Entre as subst3ncias mediadoras respons3veis pela vasodilataça3o est3o o 3xido n3trico (NO), as prostaciclinas e o fator hiperpolarizante dependente do endot3lio (EDHF, *endothelium derived hyperpolarizing factor*). O EDHF 3 um conjunto de subst3ncias capazes de promover hiperpolarizaça3o das células musculares lisas e consequente vasodilataça3o. Entre essas subst3ncias destacam-se os 3ons pot3ssio, esp3cies reativas de 3xig3nio, o pept3deo C – natriur3tico e os metab3litos do citocromo P450. O 3xido n3trico (NO) foi descoberto em 1772 por Joseph Priestley como um g3s l3mpido e incolor com biodisponibilidade de apenas 6-10s, *in vivo*. Mas foi em 1980, que Furchgott e Zawadzki descobriram que o endot3lio liberava um fator capaz de relaxar a musculatura lisa vascular (33), que mais tarde foi identificado como sendo o NO. Entre as subst3ncias vasoconstritoras, podemos citar a angiotensina II, as endotelinas, as prostaglandinas

e o tromboxano. O endotélio normal é capaz de manter níveis constantes desses mediadores, com predomínio da produção de óxido nítrico, levando a uma situação basal de vasodilatação.

Quando células endoteliais são estimuladas pela acetilcolina ou outros agentes vasodilatadores (ATP, bradiquinina, serotonina, substância P, histamina), o óxido nítrico é liberado. O Óxido nítrico é sintetizado a partir da L-arginina, que ativa a guanilil ciclase no músculo vascular liso, para aumentar a concentração de guanosina monofostato ciclase (cGMP), a qual produz relaxamento pelo decréscimo do miofilamento sensível ao (Ca^{++}). Sua liberação pode ser estimulada pelo cisalhamento do fluxo sanguíneo no endotélio (34).

A droga nitroprussiato pode aumentar a (cGMP), agindo diretamente no músculo liso, essa ação não é endotélio dependente. A Acetilcolina (neurotransmissor liberado pelos neurônios colinérgicos) por sua vez, provoca o aumento da vasodilatação através dos receptores M3 muscarínicos, cujos mecanismos fazem induzir a liberação de fator hiperpolarizante derivado do endotélio, que constitui a base para o relaxamento do músculo liso adjacente.

A função endotelial é um importante marcador da saúde vascular e a disfunção endotelial decorrente da perda da atividade biológica do NO é o passo inicial para a aterosclerose, participando no seu desenvolvimento e aumentando o risco de doenças cardiovasculares. Em decorrência da ampla distribuição do endotélio no organismo e das várias atividades desempenhadas, com fisiopatologia extremamente complexa, é fácil entender que existem; várias formas de se avaliar a função endotelial, com diferentes técnicas (35).

2.3 Efeitos cardiovasculares das bebidas energéticas

O consumo habitual das BE, as quais contém em média 27 g de hidratos de carbono por 250 ml de produto (1 lata), está relacionado ao risco de obesidade, síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e cáries (36, 37).

Já o consumo excessivo das BE, por sua vez está relacionado a maior incidência de eventos cardiovasculares e a intoxicação principalmente por cafeína (38) e a associação desta com aditivos semelhantes à cafeína e/ou outras substâncias de BE como a taurina, que podem interagir com a cafeína (38).

A taurina é uma das principais substâncias com maior quantidade por volume de BE, é um aminoácido semi-essencial, presente em abundância em mamíferos e normalmente encontrado na dieta humana. Estudos atestam vários benefícios da taurina mas a quantidade presente na maioria da BE não é considerada suficiente para se observar efeitos terapêuticos ou adversos (4).

A glucoronolactona, ingrediente mais encontrado em BE nas versões sem açúcar, é uma substância presente em todos os tecidos conjuntivos do ser humano. É um metabólito da quebra da digestão do açúcar no fígado e conhecida por ser um potente detoxificante hepático e prevenir a depleção de glicogênio muscular. Apesar disso, há poucos estudos clínicos atestando seus efeitos isoladamente (4).

A cafeína é conhecida por ser um estimulante que influencia as atividades neuronais, sendo capaz de inibir a enzima fosfodiesterase e levar ao aumento da frequência cardíaca, pressão arterial, glicose sanguínea e broncodilatação (39). É absorvida em menos de 1 hora no intestino delgado dos adultos e se difunde posteriormente em outros tecidos, atravessando facilmente a barreira hematoencefálica. Seu tempo de absorção depende da fórmula química do produto, das propriedades das doses, da idade, genética e ambiente envolvidos (39).

De acordo com a opinião da *European Food Safety Authority* de 2015, EFSA, doses únicas de cafeína até 200 mg (cerca de 3 mg/kg para um adulto de 70 kg) não levantam preocupações de segurança. A mesma quantidade não levanta preocupações de segurança quando consumida <2 horas antes do exercício físico intenso em condições ambientais normais. Outros constituintes de “bebidas energéticas” em concentrações típicas em tais bebidas (cerca de 300–320, 4.000 e 2.400 mg/L de cafeína, taurina e d-glucurono-γ-lactona, respectivamente), bem como álcool em doses acima de 0,65 g/kg, não afetaria a segurança de doses únicas de cafeína até 200 mg. O consumo habitual de cafeína até 400 mg por dia não dá origem a preocupações de segurança para mulheres não grávidas (40).

Em estudo de Hammond *et al*, 2019, por meio de pesquisa *on line*, com amostra de 2.055 jovens entre 12 e 24 anos, foi comparado os efeitos adversos do consumo de BE em relação ao consumo de cafeína. Dos participantes do estudo, 41,5% deles relataram pelo menos um efeito adverso, e os mais comuns foram os neurológicos e cardiovasculares. Entre os grupos, os que consumiram BE superaram o percentual de sintomas relatados em comparação com a cafeína. Os sintomas mais comuns foram: taquicardia (24,7%/10,5%), dificuldade para dormir (24,1%/16,5%), dores de cabeça (18,3%/11,5%), e tremores (26,5%/17%) foram os mais frequentes (41).

Ehlers *et al*, 2019, realizou estudo de revisão onde avaliou 28 estudos de intervenção e 1 metanálise a fim de investigar a relação do consumo de BE com desfechos cardiovasculares (41). O estudo concluiu que o consumo agudo moderado de BE em torno de 200 mg não é prejudicial principalmente para adultos jovens sem condições cardiovasculares preexistentes o que corrobora a opinião do European Food Safety Authority (EFSA) de 2015 (40). Já o consumo excessivo de BE contendo cafeína acima de 200 mg/L a 320 mg, causaram aumento de pressão arterial, sintomas como o prolongamento do intervalo QT, palpitações, náuseas, falta de ar e tremores (42).

Em outro estudo transversal, foi comparado os eventos adversos decorrentes do consumo de bebidas energéticas de 2 dos maiores bancos de dados norte-americanos, no período de 2008-2015, (*Center for Food Safety and Applied Nutrition's Adverse Event Reporting System – CAERS* e *American Association of Poison Control Centers – National Poison Data System – NPDS*) (Figura 4). Durante esse período foram registrados 357 casos de eventos adversos associados à ingestão de energéticos pelo CAERS e 12.822 de casos pelo NPDS, sendo taquicardia o sintoma cardiovascular mais relatado (43).

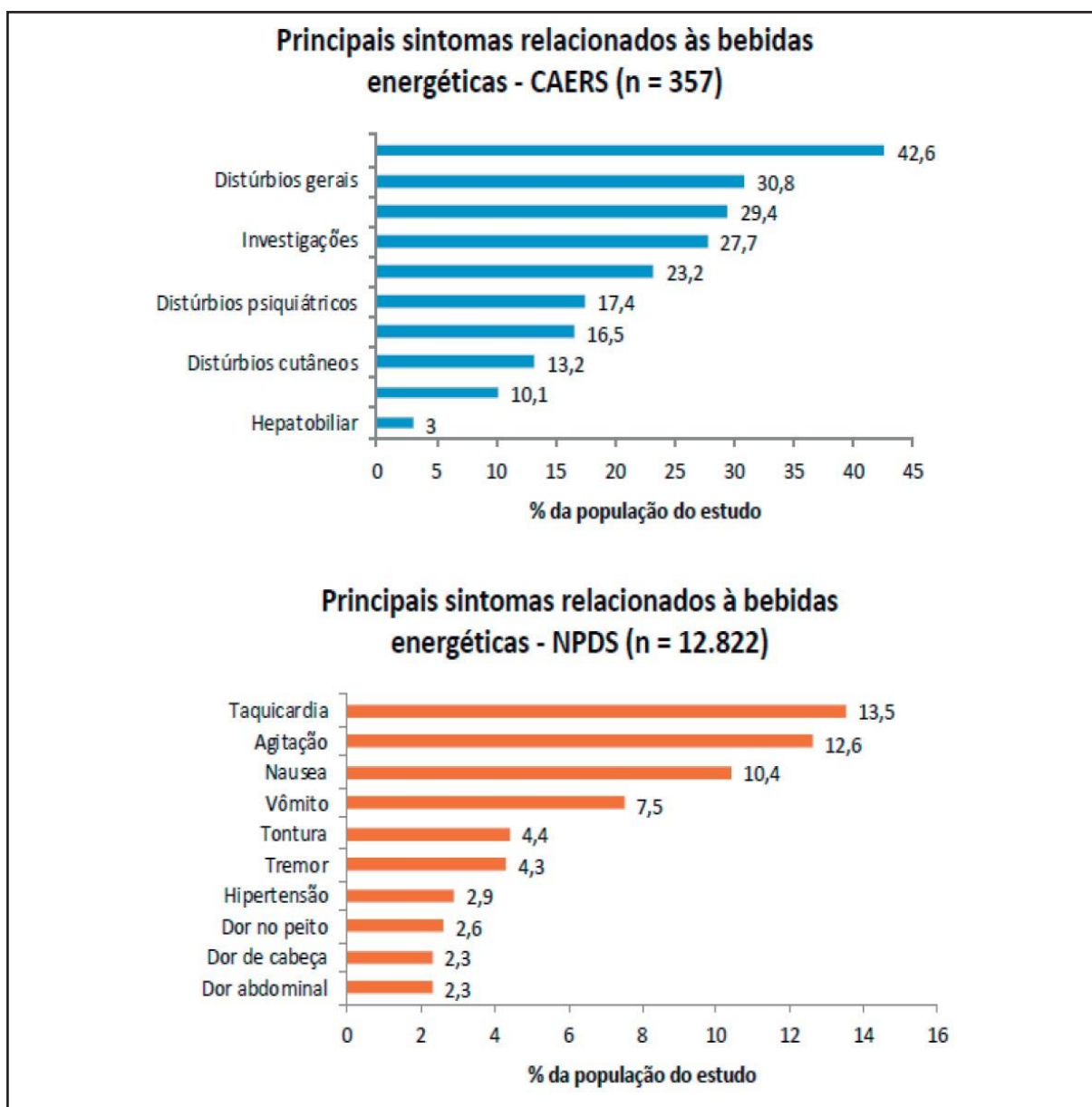


Figura 4 – Principais sintomas dos relatórios de eventos adversos de bebidas energéticas da CAERS e do NPDS, no período de 2008-2015

Legenda: CAERS – *Center for Food Safety and Applied Nutrition's Adverse Event Reporting System*; NPDS – *National Poison Data System*.

Fonte: MARKON, A.O. *et al.* Public Health Nutrition, 2019, p.1-12,2019 [43].

Há poucos estudos que avaliaram os efeitos do consumo de BE na função endotelial e, mesmo assim, os resultados encontrados na literatura são conflitantes. Em estudo Worthley *et al* em 2010 (13) e, em seguida, nos estudos de Higgins *et al* realizados em 2013 (12) e 2017 (44), o consumo de BE promoveu disfunção endotelial e aumentou a agregação plaquetária em adultos saudáveis.

Já em estudo de Molnar e Somberg (45), o consumo de BE melhorou de forma significativa a função endotelial de adultos jovens e mais recente, em estudo de Akhundova em 2021 (42), não houve alteração na função endotelial após consumo de BE, na versão sem açúcar.

2.4 O laser speckle na microcirculação cutânea

Ao longo de mais de 30 anos, muito se tem pesquisado sobre os mecanismos que envolvem a relação entre a função microcirculatória, o adequado fornecimento de oxigênio aos tecidos, a própria função desse órgão, o suprimento sanguíneo aos tecidos, como fator crucial de injúria e doença (28).

As técnicas de fluxometria laser doppler ou *Laser Doppler Perfusion Imaging* (LDPI) e agora mais recentemente a fluxometria digital baseada em luz laser, *Laser Speckle Contrast Image*, (LSCI) são as mais amplamente utilizadas por serem menos invasivas e de ótima resolução para investigação do fluxo sanguíneo microcirculatório (46).

A técnica de imagem por *speckle* foi originalmente criada por Ferchers e Briers em 1980 para obter imagem do fluxo sanguíneo da retina (46). Posteriormente foi aperfeiçoada por meio de um gerador de imagem e comercializada pela primeira vez por *Moor Instruments* em 2007 (46). Atualmente é utilizada em muitas áreas médicas como reumatologia, dermatologia, queimaduras, oftalmologia, neurologia, cirurgia gastrointestinal. Sua aplicação na análise cardiovascular é recente (47).

Esta técnica é baseada nas alterações dinâmicas da luz dispersa por sua interação com os glóbulos vermelhos ao iluminar determinado tecido biológico. A principal diferença desta técnica, com relação à fluxometria laser-doppler (LDF), consiste na alta reprodutibilidade das medidas que resulta de avaliações contínuas de áreas extensas da pele, através de tecnologia de contraste de imagens (16).

Atualmente a microcirculação cutânea tem sido considerada um meio fácil e potencialmente representativo do leito vascular para avaliar e entender mecanismos de função e disfunção endotelial (Figura 5) (16).

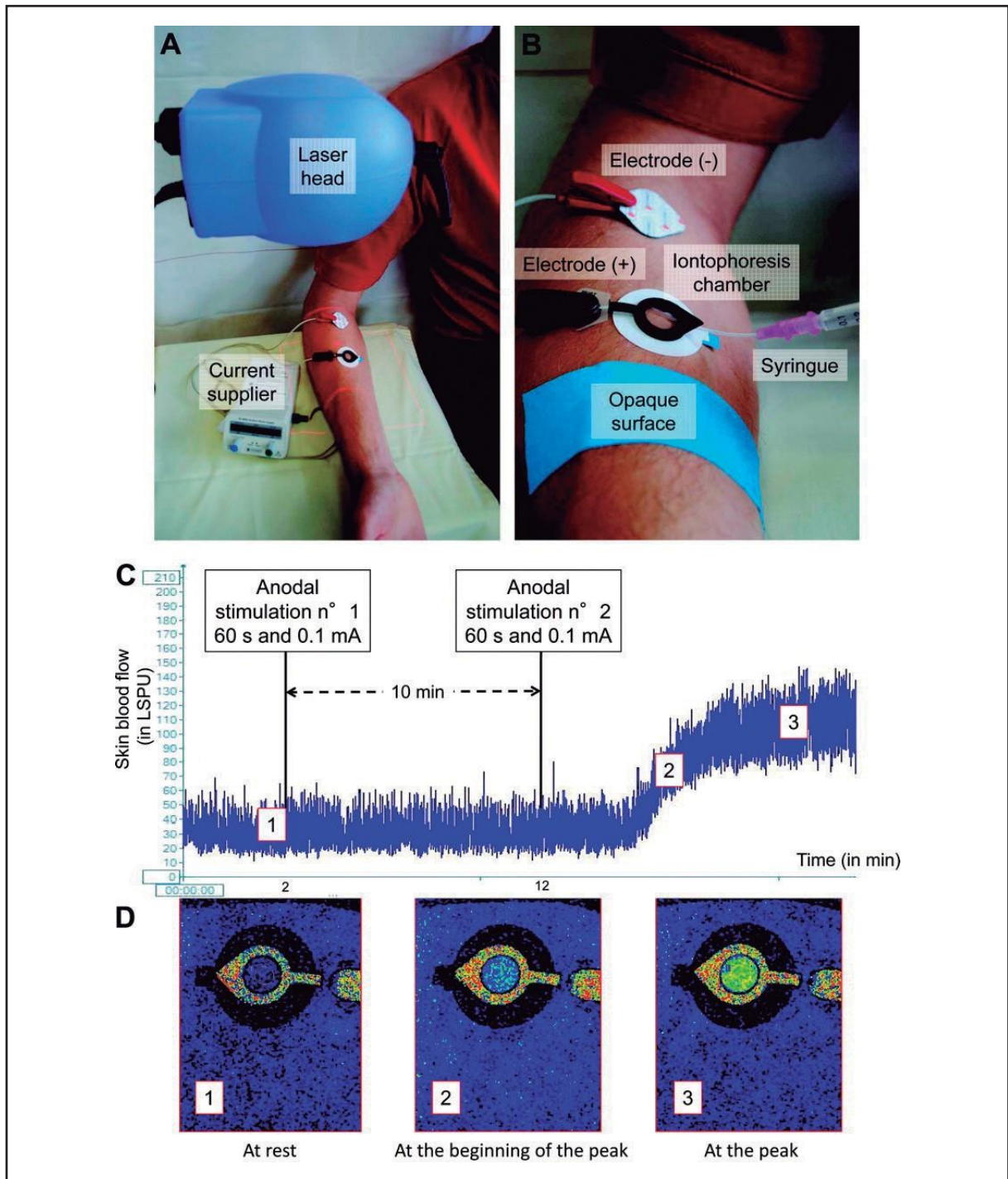


Figura 5 – Aparelho de laser speckle com contraste de imagem acoplado com iontoforese de água deionizada

Em A: *Laser Speckle Contrast Imaging*, estudo a microcirculação cutânea utilizando o antebraço do voluntário.

Em B: A câmara de iontoforese é suprida com medicação, e na superfície é afixado um adesivo opaco no antebraço para gravar artefatos de movimento.

Em C: Modelo de gravação de mudança do fluxo sanguíneo da pele induzido pela iontoforese de água deionizada (2 estímulos anódicos separados por um intervalo de 10 minutos).

Em D: Imagens de mudanças no fluxo sanguíneo induzido por iontoforese de água deionizada. LSPU indica unidades de perfusão do laser speckle.

Fonte: Originally published 1 jan, 2012 <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.111.970418> Circulation: Cardiovascular Imaging. 2012; 5:155–163. (Adaptado de Mahé et al 2012) [48].

3 JUSTIFICATIVA

O consumo de BE vem aumentando no Brasil e no mundo e seus efeitos no corpo humano ainda são pouco conhecidos pela literatura. Avaliar os efeitos agudos do consumo de uma BE no endotélio vascular através de métodos não invasivos e de reprodutibilidade superior aos métodos convencionais é de suma importância uma vez que a disfunção endotelial é um dos preditores de doenças cardiovasculares.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de uma bebida energética na reatividade microvascular de indivíduos jovens saudáveis.

4.2 Objetivo específico

Verificar a reatividade microvascular dos indivíduos antes e após o consumo de bebida energético em comparação com o consumo de água.

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho do estudo

Estudo intervencional randomizado realizado nas dependências do Instituto Nacional de Cardiologia (INC) durante o período de dezembro de 2019 a fevereiro de 2022. A pesquisa foi divulgada por meio de rede social, Instagram® e Facebook® e através de cartazes distribuídos entre os pesquisadores do Hospital e chefes de setor. Foram recrutados 23 indivíduos do sexo masculino. Depois de informados sobre os objetivos e metodologia do estudo, foram apresentados e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A). O projeto se encontra aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do INC (Anexo B), com o registro CAAE: 13135219.0.0000.5272.

5.2 Amostra

A pesquisa adotou protocolos de estudo conduzidos apenas com participantes do sexo masculino em razão da possível interferência do ritmo hormonal de pessoas do sexo feminino, o que poderia prolongar ainda mais o tempo da pesquisa e inviabilizar o estudo. Neste contexto, estudos anteriores da nossa equipe mostraram que a reatividade microvascular sistêmica dependente de endotélio é significativamente diferente entre adultos jovens do sexo masculino e feminino (48). Além disso, a possibilidade da existência de efeitos da BE durante a gravidez (49) também dificultaria a inclusão de mulheres jovens no estudo por motivos éticos.

5.2.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram: Idade entre 18 e 35 anos, sem achados relevantes em seu histórico médico, frequência cardíaca entre 60 e 90 bpm e pressão arterial sistólica entre 95 e 130 mmHg e diastólica entre 55 e 88 mmHg, após estar sentado por 5 minutos.

5.2.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram: ser atleta competitivo, estar em uso regular de medicamentos, uso de drogas ilícitas, ter alergia a café, taurina ou a qualquer dos componentes do energético selecionado, ter índice de massa corporal (IMC) ≥ 30 .

5.3 Procedimentos de coleta de dados

Todos os participantes foram informados antecipadamente por comunicado via WhatsApp® sobre os preparativos para o exame que incluíram: estar em jejum de no mínimo 8 horas, não praticar atividade física no dia anterior ao exame, não consumir alimentos contendo cafeína 24 horas antes do estudo.

Na primeira visita, todos os participantes que preencheram os critérios de inclusão no estudo, após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo CEP/INC, preencheram ficha de dados, contendo: nome; idade; sexo; cor; peso; altura; índice de massa corporal; circunferência abdominal; histórico de tabagismo, história social e de doenças; questionário sobre consumo de bebidas contendo cafeína e consumo de bebidas alcoólicas; histórico de saúde familiar e questionário de frequência alimentar. Ainda na primeira visita os voluntários, foram submetidos a coleta de sangue venoso para análise bioquímica.

Os exames bioquímicos realizados foram:

- Glicemia (mg/dl);
- Colesterol total (mg/dl);
- LDL – colesterol (mg/dl);
- Triglicerídeos (mg/dl);
- Ureia (mg/dl);
- Creatinina (mg/dl).

Para medição de altura (cm) dos participantes, foi utilizado régua antropométrica (balança digital) com escala de 1 metro a 2,10 metros com divisão de 0,5 cm. Para medição do perímetro abdominal foi utilizado trena antropométrica (cm com resolução em mm).

5.3.1 Protocolo do estudo

O estudo foi feito em duas sessões, sendo o consumo da intervenção (Red Bull®) ou controle (água), definidos mediante randomização com intervalo de no mínimo 2 semanas entre elas.

Os ingredientes e as informações nutricionais contidas em 250 ml de BE utilizada no estudo foram: 27 gramas de carboidratos (sucralose e glicose); 103 mg de sódio; 1000 mg de taurina; 80 mg de cafeína; vitaminas do complexo B (16 mg de vitamina B3; 5 mg de vitamina B5; 1,3 mg de vitamina B; 1,3 mg de B2 e 1 micrograma de B12).

Todos os exames foram realizados entre 8:00 e 13:00h em temperatura controlada de 21° C (± 2) em sala semiescura e ambiente calmo. Os voluntários foram então solicitados a se deitarem em posição supina por 10 minutos. Após repouso os voluntários tiveram pressão arterial (mmHg) medida por esfigmomanômetro de mercúrio e frequência cardíaca mensurada.

Os voluntários então, foram submetidos a avaliação da reatividade microcirculatória por LSCI, em estado basal. Posteriormente, foram submetidos ao consumo de 250 ml de BE ou da mesma quantidade de água mineralizada (Minalba®) como controle. A randomização do consumo de intervenção (Red Bull®) ou de controle (água) se deu nas dependências do laboratório do INC, como uso de moeda local, cara ou coroa (cara a BE e coroa água).

A avaliação da microcirculação foi repetida no período de 90 e 180 minutos após o consumo de BE ou água. Antes de cada avaliação, pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca foram medidos por meio de aparelho eletrônico modelo Omro HEM- 705CP e manguito de tamanho apropriado, após um tempo mínimo de repouso de 10 minutos em posição supina. A pressão arterial média foi calculada pela fórmula: $PAM = PAD + [(PAS - PAD) / 3]$.

5.3.2 Técnicas de avaliação da microcirculação utilizadas

Investigação da reatividade microvascular

A reatividade microvascular cutânea foi avaliada através da técnica de fluxometria laser *speckle*, padronizada e validada em centros de investigação clínica da França (16). Esta técnica tem sido utilizada na determinação da reatividade microvascular sistêmica em diversos estudos clínicos no Núcleo de Investigação Cardiovascular em Microcirculação da Coordenação de Ensino e Pesquisa do Instituto Nacional de Cardiologia.

Um sistema de fluxometria laser *speckle* (comprimento de onda de 780 nm; PeriCam PSI-NR, Perimed AB, Järfälla, Suécia) acoplado a um sistema farmacológico de micro-iontoforese (Perilont, Perimed AB) foi utilizado para a avaliação não-invasiva e em tempo real das variações de fluxo microvascular dependentes (acetilcolina) e independentes (nitroprussiato de sódio) de endotélio. Os eletrodos de micro-iontoforese foram colados à face ventral da pele do antebraço através de adesivos dupla face, fornecidos pelo fabricante (LI611 electrodes, Perimed AB). Os eletrodos foram preenchidos com 200 μ l de solução de 2% de acetilcolina (Sigma Chemical CO, USA) e os eletrodos neutros (dispersão da corrente) foram instalados 15 cm acima dos eletrodos de infusão. Após registro da linha de base do fluxo microvascular

cutâneo durante 5 minutos, 4 doses de acetilcolina (corrente anódica) de intensidades crescentes de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 μ A e tempo de infusão de 10 segundos foram administradas de maneira cumulativa a cada 60 segundos. É importante ressaltar que o protocolo não incluiu administração de drogas, sendo que as substâncias supracitadas ficaram apenas em contato com a epiderme dos pacientes.

Para os testes de hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO), a oclusão arterial foi realizada através de manguito pneumático inflado em pressão supra-sistólica (50 mmHg acima da pressão sistólica dos pacientes) durante 3 minutos. Após a liberação do manguito, foi medido o fluxo microvascular cutâneo máximo.

O sinal emitido pelo laser *speckle* é proporcional ao número e à velocidade de células sanguíneas em movimento em microvasos superficiais da pele (capilares e arteríolas terminais), sendo que o feixe de raios laser que ilumina a pele é refletido pelas células em movimento e gera um sinal correlacionado de maneira linear com o fluxo de hemácias. O sinal é semi-quantitativo e expresso em unidades de perfusão (PU, *perfusion units*), de acordo com o consenso europeu (*European Laser Doppler Users Groups*, London 1992). O sinal de laser *speckle* foi registrado em computador através de software de aquisição automática de dados (Perisoft for Windows).

5.4 Análise estatística

As variáveis numéricas foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Aquelas com distribuição normal (paramétrica), foram analisadas utilizando testes t de Student para comparação entre dois grupos, ANOVA para comparação entre três ou mais grupos e ANOVA para medidas repetidas para análise de variáveis em diferentes intervalos de tempo. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste do qui quadrado e o teste exato de Fisher. Para aqueles que não possuíam distribuição gaussiana (não paramétrica) foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos, Kruskal-Wallis para comparação entre três ou mais grupos. Os dados foram apresentados como médias e desvio padrão, quando de distribuição normal, como medianas e percentil 25-75 quando não normal. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. O pacote estatístico utilizado foi o Prism versão 8.0 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, EUA) e o R versão 3.1.0.

6 RESULTADOS

A amostra do estudo foi composta por 23 indivíduos do sexo masculino entre 18 e 35 anos de idade. Dos 23 participantes, apenas 1 não deu continuidade a pesquisa, tendo o restante de 22 completado o protocolo. Em relação a escolaridade, (8 ou 34,8%) possuem o 2º grau completo, (8 ou 34,8%) possuem superior incompleto, (5 ou 21,7%) possuem superior completo e (2 ou 8,7%) possuem pós-graduação.

As características clínicas e laboratoriais dos indivíduos voluntários incluídos no estudo estão descritas na Tabela 2. Trata-se de um grupo de indivíduos jovens, normotensos, sem critérios diagnósticos para dislipidemia.

Tabela 2 – Características clínicas e laboratoriais dos voluntários incluídos no estudo (n=22)

Parâmetro	
Idade (anos)	25 ± 4,8
Peso (kg)	76,5 ± 10,9
Índice de Massa Corporal (kg/m²)	24,6 ± 2,3
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	120 ± 7,9
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	72 ± 8,3
Pressão Arterial Média (mmHg)	88 ± 7,1
Frequência Cardíaca (batimentos/min)	64 ± 10
Glicemia (mg/dl)	89 ± 8
Colesterol Total (mg/dl)	162 ± 29
LDL-colesterol (mg/dl)	106 ± 26
HDL-colesterol (mg/dl)	51 (42-58)
Triglicerídeos (mg/dl)	67 ± 21
Ureia (mg/dl)	28 ± 7
Creatinina (mg/dl)	0,95 ± 0,13
Circunferência Abdominal (cm)	84,1 ± 7,7
Altura (cm)	176,4 ± 8,9
Eutróficos n (%)	13 (59)
Sobrepeso n (%)	9 (41)

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão ou mediana (intervalo interquartilico) quando apresentam distribuição paramétrica ou não paramétrica, respectivamente.

Os efeitos agudos do consumo de BE na pressão arterial e na frequência cardíaca estão demonstrados na Tabela 3. Houve ligeira diminuição da frequência cardíaca no grupo controle (0.0369) em comparação com o grupo que consumiu BE (0.0223) e aumento moderado na pressão arterial sistólica no grupo que consumiu BE.

Tabela 3 – Efeitos da ingestão de água mineral (controle) ou BE nos parâmetros cardiovasculares de voluntários saudáveis

CONTROLE				
Parâmetros	Basal	90 min	180 min	P valores
PAS (mmHg)	120 ± 9	120 ± 6	122 ± 7	0.4479
PAD (mmHg)	70 ± 8	71 ± 8	71 ± 8	0.5445
PAM (mmHg)	86 ± 7	87 ± 7	88 ± 7	0.3435
FC (bat/min)	60 ± 10	60 ± 11	58 ± 10*	0.0369
BEBIDA ENERGÉTICA				
Parâmetros	Basal	90 min	180 min	P valores
PAS (mmHg)	121 ± 7	122 ± 6	124 ± 7*	0.0347
PAD (mmHg)	72 ± 8	73 ± 7	72 ± 8	0.7827
PAM (mmHg)	88 ± 7	89 ± 6	90 ± 7	0.5221
FC (bat/min)	62 ± 10	60 ± 10	59 ± 11*	0.0223

Os resultados são apresentados como média ± SD (de acordo com teste de normalidade de Shapiro-Wilk). Análise estatística foi calculada usando one way ANOVA seguido por teste de comparação múltipla de Tukey. *p<0.05 comparado com valores basais.

Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; PAM – pressão arterial média; FC – frequência cardíaca

Os participantes foram questionados sobre o consumo habitual de alimentos contendo cafeína e 20 ou 90,9% (n=22) responderam que sim (Figura 6). Para os que responderam sim, foi perguntado em seguida, o consumo de 3 categorias de alimentos, entre eles suplementos, BE e outros. Nenhum dos participantes citou o consumo de suplementos e apenas 7 ou 36,8% citaram o consumo de BE e 18 ou 94,7% citaram outros (Figura 7). Desses 7 que afirmaram consumir BE, 50% consumiram ao menos 1x por mês (Figura 8) e, 5 ou 83,3%, relataram que consumiam com a finalidade de lazer (Figura 9).

O consumo de bebidas alcoólicas foi relatado por 18 ou 81,8% (n=22), dos participantes do estudo (Figura 10), sendo que 9 ou 52,9% (n=17) relataram consumir com a frequência de 1 a 3 vezes ao mês (Figura 11). Observa-se que todos os participantes que relataram o consumo de bebida alcoólica também relataram o consumo de BE e as marcas mais citadas (Tabela 4).

Nenhum participante relatou estar em uso de medicamentos e nem ser tabagista.

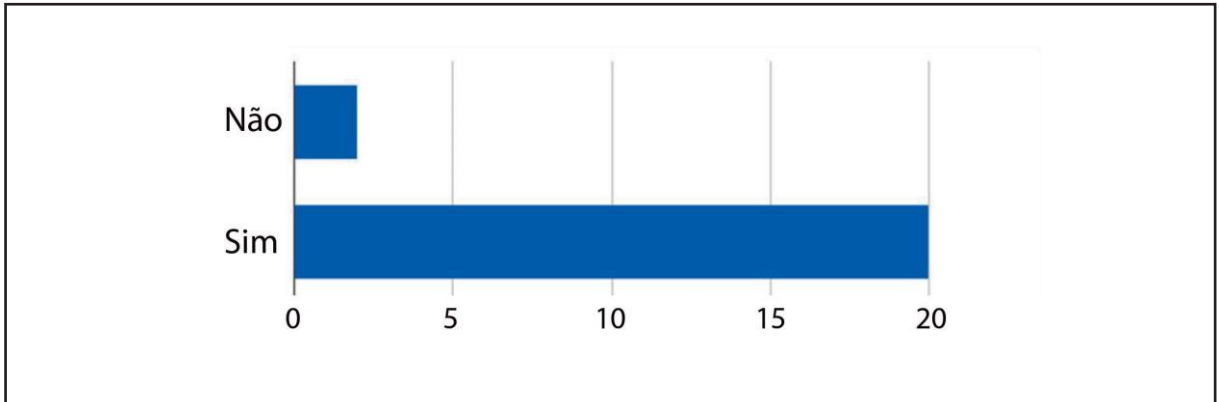


Figura 6 – Consumo de alimentos contendo cafeína

Não (2, 9,1%), sim (20, 90,9%). N=22

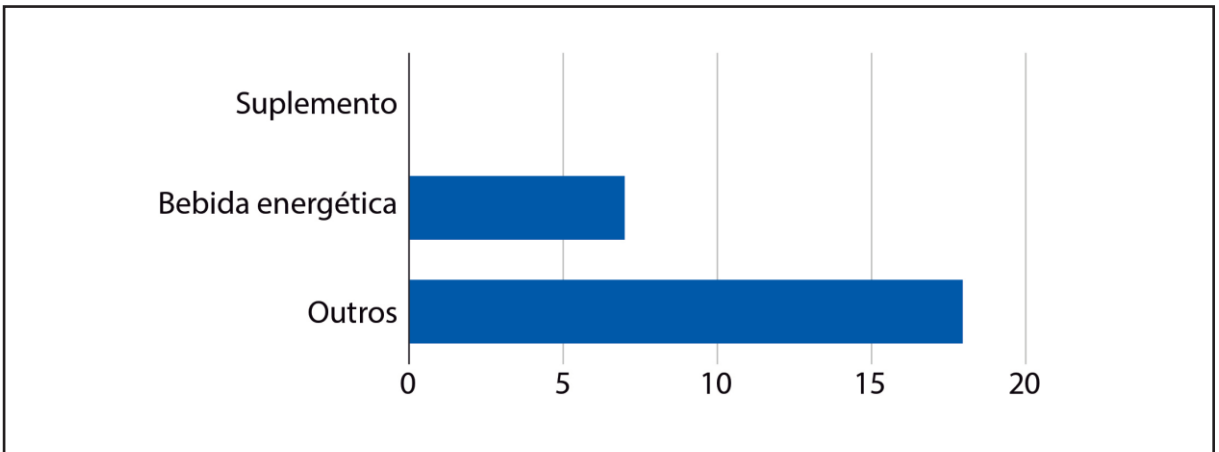


Figura 7 – Tipos de alimentos contendo cafeína

Suplemento (0, 0,0%), bebida energética (7, 36,8%), outros (18, 94,7%). N=20

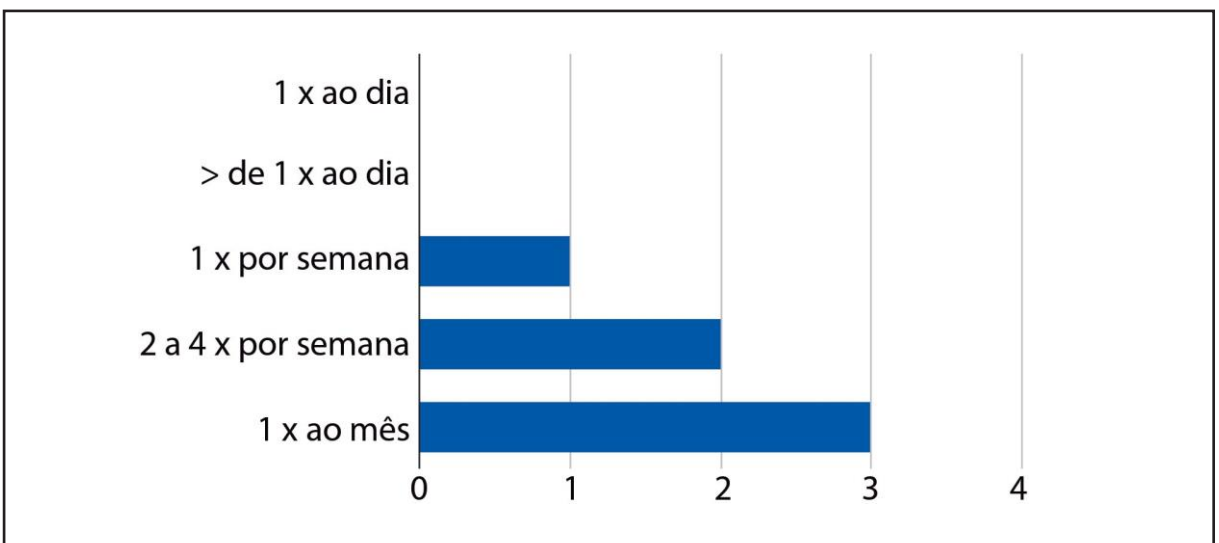


Figura 8 – Frequência do consumo de BE

1x ao dia (0, 0,0%), > de 1x ao dia (0, 0,0%), 1x por semana (1, 16,7%), 2 a 4x por semana (2, 33,3%), 1 x ao mês (3, 50,0%).

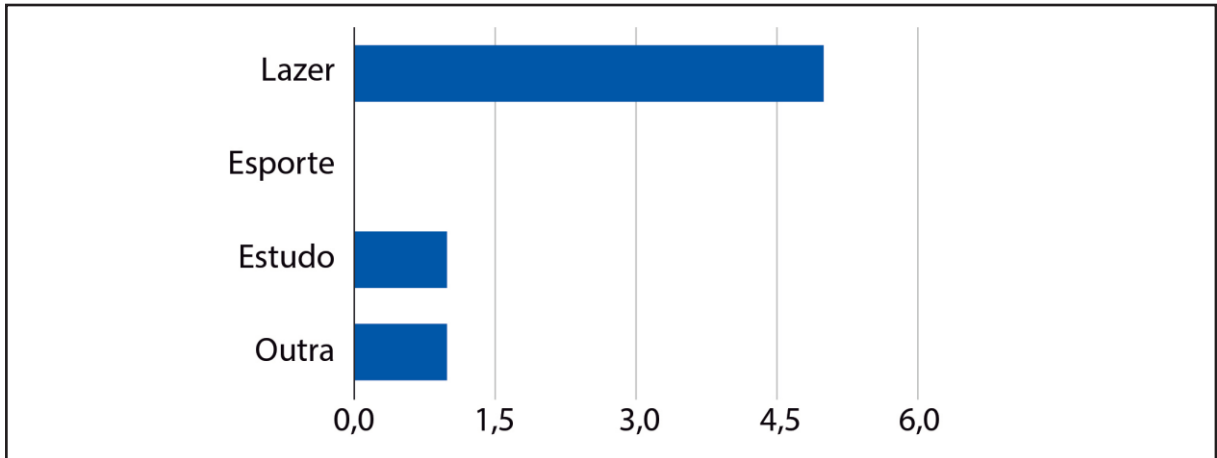


Figura 9 – Finalidade do consumo de BE

Lazer (5, 83,3%), esporte (0, 0,0%), estudo (1, 16,7%), outra (1, 16,7%)

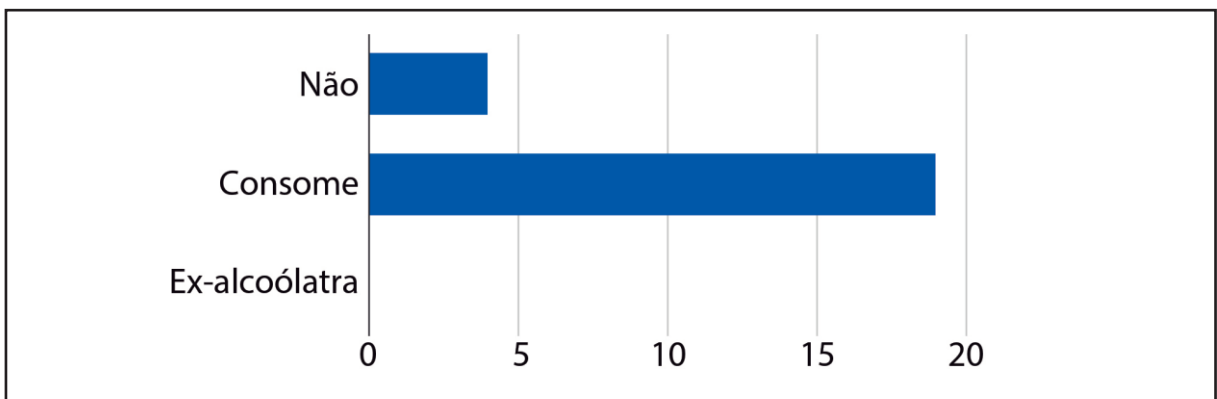


Figura 10 – Consumo de bebidas alcoólicas entre os participantes

Não (4, 17,4%), consome (19, 82,6%), ex-alcoólatra (0, 0,0%). N=22

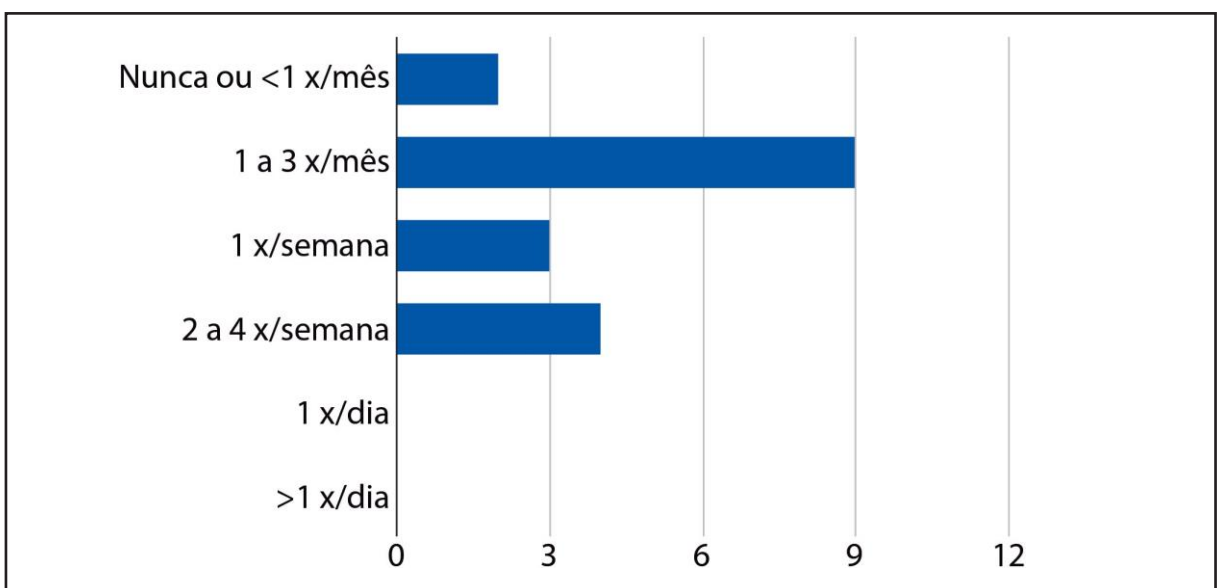


Figura 11 – Frequência do consumo de bebida alcoólica entre os participantes do estudo

Nunca ou <1x/mês (2, 11,1%), 1 a 3 x/mês (9, 50,0%), 1 x/semana (3, 16,7%), 2 a 4 x/semana (4, 22,2%), 1x/dia (0, 0,0%), >1x/dia (0, 0,0%). N=18

Tabela 4 – Participantes que consomem bebida alcoólica e BE e as marcas de BE citadas

Participante	Bebida alcoólica	Bebida energética	Especificar bebida energética
1	Consome	Não	
2	Consome	Não	
3	Consome	Não	
4	Consome	Não	
5	Consome	Não	
6	Consome	Sim	Red Bull®, Monster®
7	Consome	Sim	
8	Consome	Sim	Red Bull®
9	Consome	Sim	Red Bull®
10	Consome	Não	
11	Consome	Não	
13	Consome	Não	
14	Consome	Não	
16	Consome	Sim	Red Bull®
18	Consome	Sim	Red Bull® tropical
21	Consome	Não	
22	Consome	Não	
23	Consome	Sim	Monster® Vulcano Baly Minotauro sempre acompanhado do destilado (usa mais o Baly)

Resultados do consumo de BE na função endotelial

Na Figura 12, é mostrada a condutância microvascular cutânea induzida por acetilcolina nos indivíduos que consumiram água (controle) em comparação com a BE. No consumo de água houve leve redução da vasodilatação microvascular nos 90 e 180 minutos após o consumo, em comparação ao estado basal. Nos indivíduos que consumiram BE, ocorreu uma leve redução não significativa na vasodilatação nos primeiros estímulos de iontoforese tanto nos 90 e 180 minutos após consumo, permanecendo reduzido após leve alteração até a última corrente iontoforese somente após 180 minutos do consumo do início do exame.

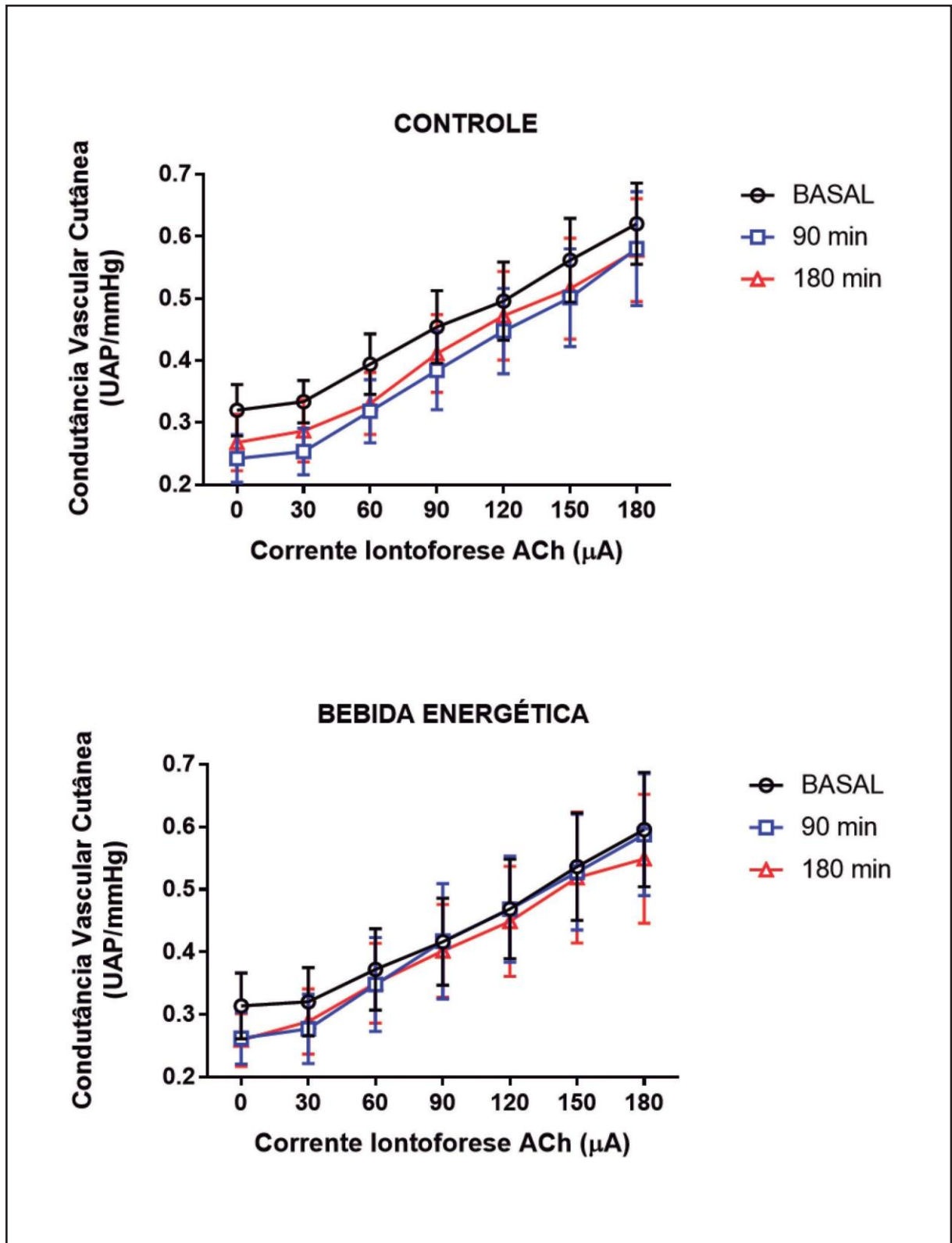


Figura 12 – Efeitos da iontoforese de acetilcolina (ACh) na condutância microvascular cutânea [expressa em unidades arbitrárias de perfusão (UAP), dividida pela pressão arterial média em mmHg], em voluntários saudáveis, antes (BASAL) e 90 e 180 min após ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética

Os valores são expressos como média e intervalo de confiança de 95%. Análise estatística realizada com análise da variância de dois fatores (two-way ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Na Figura 13 encontra-se a avaliação da área sobre a curva de vasodilatação microvascular expressa em unidades arbitrárias de perfusão, induzida pela iontoforese de acetilcolina, realizada nos três momentos do exame: estado basal, aos 90 e 180 minutos após consumo de controle e BE. Assim como na Figura 12, não houve alteração significativa na vasodilatação dos indivíduos que consumiram BE em nenhuma das três fases do exame, sendo observada leve redução na vasodilatação do grupo que consumiu água após 90 minutos, mas retornando a valores iniciais após 180 minutos.

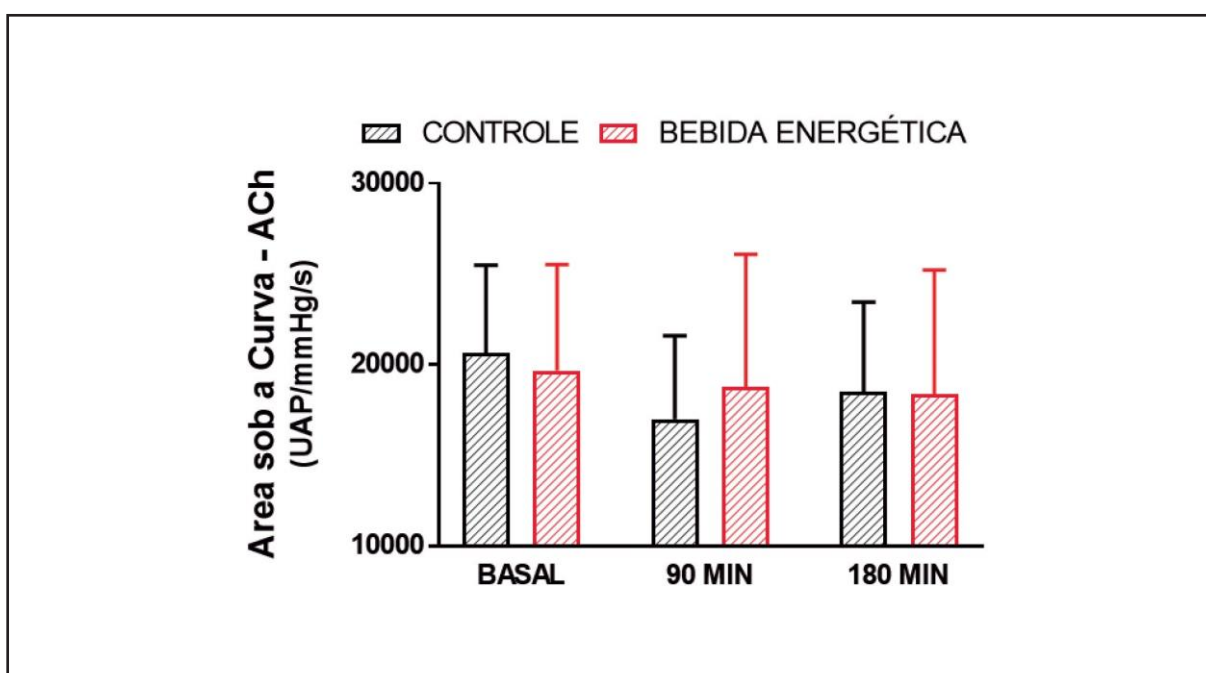


Figura 13 – Área sob a curva de vasodilatação microvascular cutânea induzida pela iontoforese de acetilcolina (ACh) antes (BASAL) e 90 ou 180 min após ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética

Os valores são expressos como média e desvio padrão (teste de normalidade de Shapiro-Wilk). Análise estatística realizada com análise da variância de dois fatores (two-way ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Legenda: UAP – unidades arbitrárias de perfusão.

Na Figura 14 encontra-se o índice Delta, que é a diferença entre o pico e o valor basal nas três fases do exame. Observa-se que não há alteração na vasodilatação em comparação as Figuras 12 e 13, confirmando os resultados anteriores.

Na Figura 15 verificamos os valores máximos de condutância vascular cutânea induzida por iontoforese nos dois grupos após consumo de água e BE. Não houve variação significativa entre os grupos e nas 3 fases do exame, mantendo semelhantes os resultados analisados pelos métodos anteriores de avaliação da microcirculação.

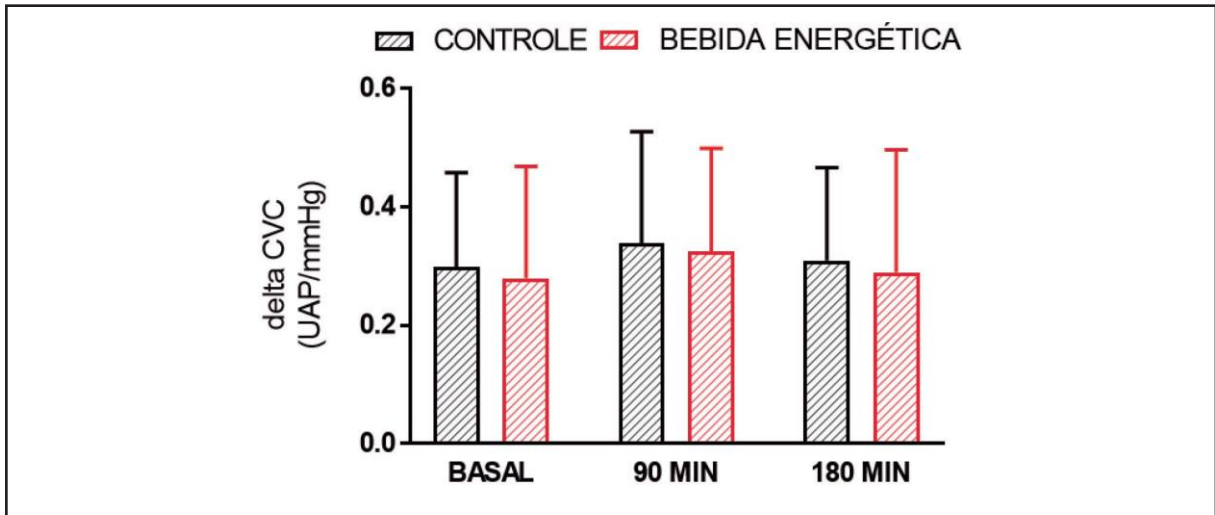


Figura 14 – Delta (diferença entre o pico e o valor basal) da condutância vascular cutânea (CVC) induzida pela iontoforese de acetilcolina (ACh) antes (BASAL) e 90 ou 180 min após ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética

Os valores são expressos como média e desvio padrão (teste de normalidade de Shapiro-Wilk). Análise estatística realizada com análise da variância de dois fatores (two-way ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Legenda: UAP – unidades arbitrárias de perfusão.

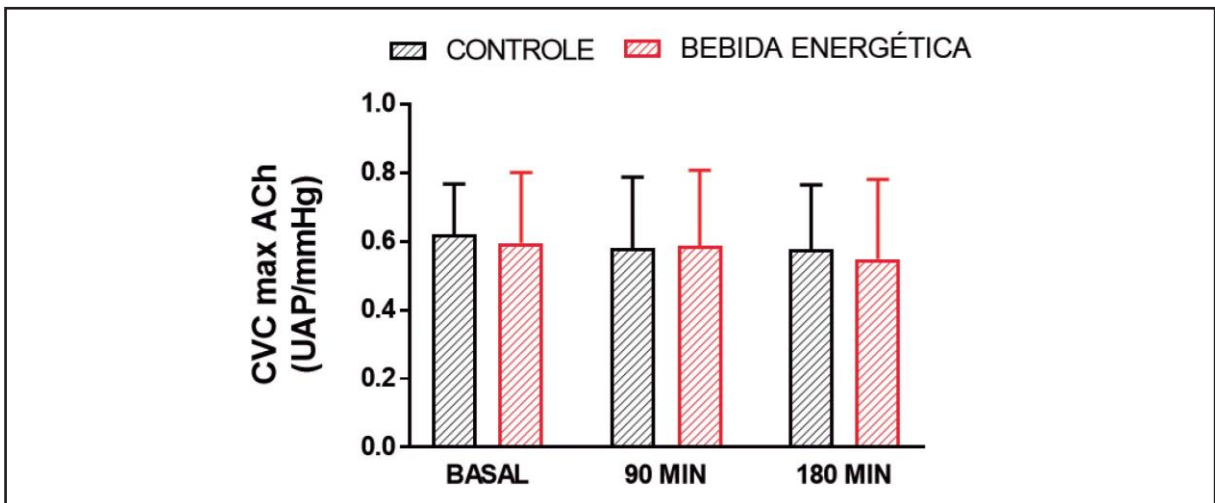


Figura 15 – Valores máximos de condutância vascular cutânea (CVC) induzida pela iontoforese de acetilcolina (ACh) antes (BASAL) e 90 ou 180 min após ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética

Os valores são expressos como média e desvio padrão (teste de normalidade de Shapiro-Wilk). Análise estatística realizada com análise da variância de dois fatores (two-way ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Legenda: UAP – unidades arbitrárias de perfusão.

Na figura 16 analisamos os valores máximos de condutância vascular cutânea induzida pela hiperemia pós-oclusiva nos dois grupos, após consumo de BE e controle. Não foi observado alteração na vasodilatação por meio dessa técnica entre os dois grupos e entre as 3 fases do exame, corroborando os resultados anteriores.

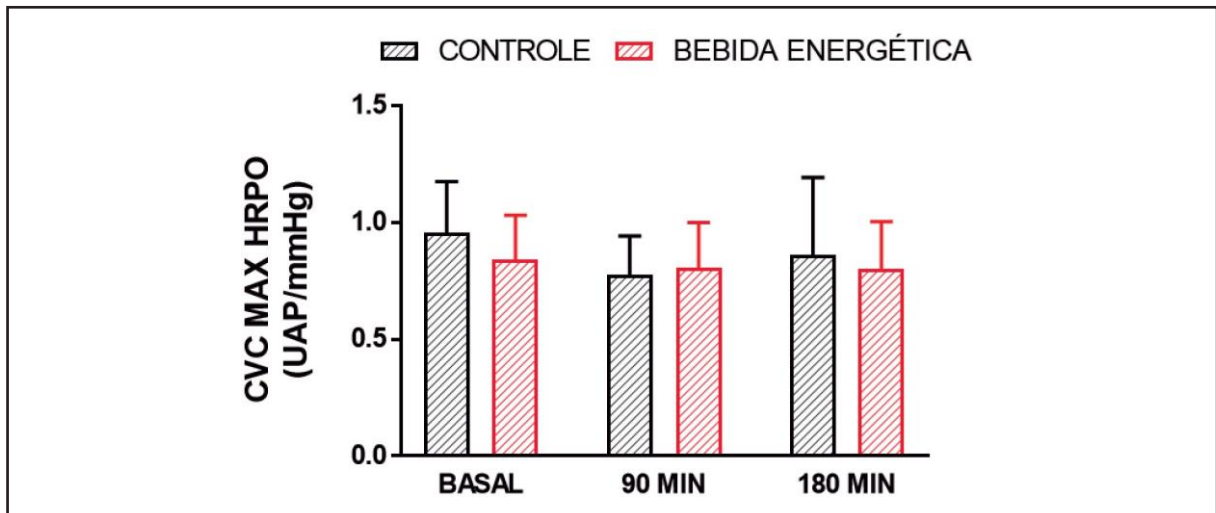


Figura 16 – Valores máximos de condutância vascular cutânea (CVC) induzida pela hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) antes (BASAL) e 90 ou 180 min após ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética

Os valores são expressos como média e desvio padrão (teste de normalidade de Shapiro-Wilk). Análise estatística realizada com análise da variância de dois fatores (two-way ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Legenda: UAP – unidades arbitrárias de perfusão.

Na figura 17 observamos o delta de condutância vascular cutânea induzida por hiperemia reativa pós oclusiva entre os dois grupos, controle e BE. Não foi observado alteração significativa na vasodilatação entre os dois grupos e entre as 3 fases do exame, corroborando mais uma vez com os resultados anteriores.

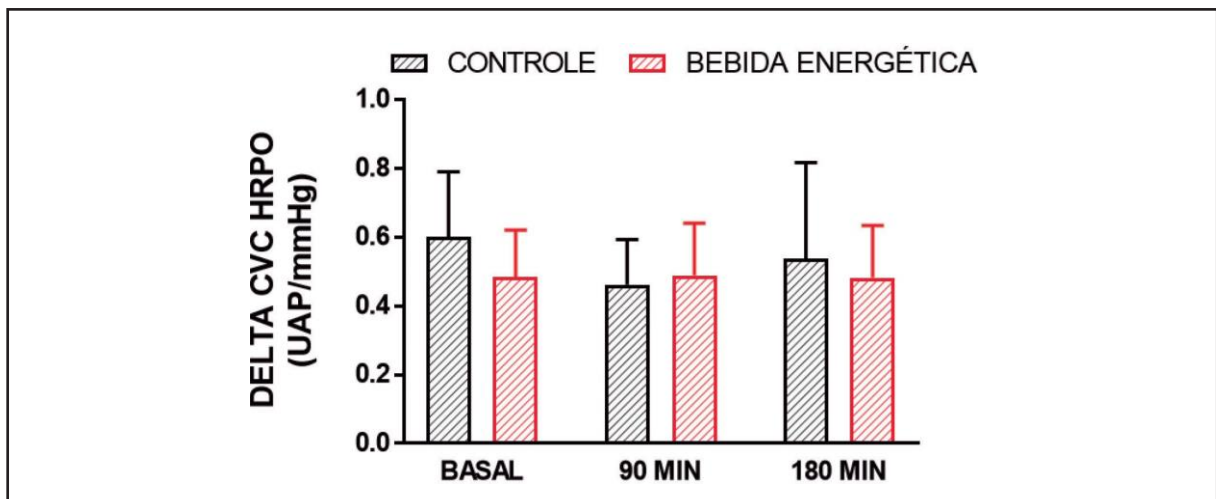


Figura 17 – Delta (diferença entre o pico e o valor basal) de condutância vascular cutânea (CVC) induzida pela hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) antes (BASAL) e 90 ou 180 min após ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética

Os valores são expressos como média e desvio padrão (teste de normalidade de Shapiro-Wilk). Análise estatística realizada com análise da variância de dois fatores (two-way ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Legenda: UAP – unidades arbitrárias de perfusão.

Na figura 18, por fim, demonstramos os valores basais de condutância vascular cutânea dos dois grupos (os valores basais são obtidos antes do consumo) com resultados equivalentes.

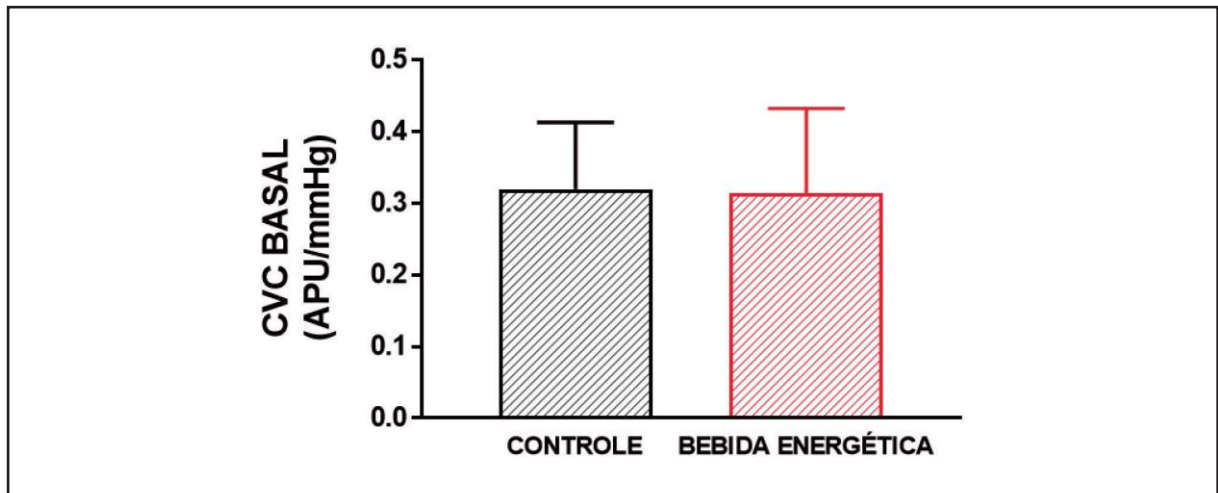


Figura 18 – Valores basais de condutância vascular cutânea (CVC) antes da ingestão de água (CONTROLE) ou bebida energética nos voluntários do estudo

Os valores são expressos como média e desvio padrão (teste de normalidade de Shapiro-Wilk). Análise estatística realizada com teste t de Student bicaudal não pareado. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Legenda: UAP – unidades arbitrárias de perfusão.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, o consumo de 250 ml de BE Red Bull ® não alterou de forma significativa a vasodilatação microvascular induzida por acetilcolina e por hiperemia pós-reativa. Por outro lado, o efeito agudo na pressão arterial sistólica foi bastante consistente com outros estudos prévios (13, 14).

As BE, de acordo com a definição da ANVISA, são bebidas prontas para consumo que possuem diversos ingredientes em sua composição, entre eles cafeína, taurina, extrato de guaraná, Inositol, que são utilizados pela indústria com intuito de promover melhora a performance, reduzir fadiga e auxiliar na perda de peso, entre outras promessas.

Apesar da alta demanda e dos diferentes ingredientes e porções disponibilizadas no mercado, não há evidências que permitam considerar essas bebidas seguras para o público em geral (38). A maior preocupação das autoridades e comunidades científicas é com o excesso de cafeína ou com aditivos semelhantes à cafeína que podem interagir com a cafeína, como a taurina.

Apesar do presente estudo não ter como objeto a análise do consumo BE com álcool, o questionário de vida social dos voluntários confirmou o que se observa na literatura. Há grande associação de BE com álcool, muitas vezes consumidos em festas e bares aos fins de semana. O excesso de consumo principalmente da cafeína e de outras substâncias que interagem entre si trazem consequências já relatadas na literatura principalmente para o sistema cardiovascular e neurológico.

Quanto à função endotelial há poucos estudos e os resultados são conflitantes. O que se observou foi a grande variedade de desenho de estudo, diferentes doses administradas de BE e de cafeína e diferentes métodos de avaliação.

Em estudo conduzido por Grasser *et al* (14) foram avaliados, a função endotelial microvascular, os parâmetros cardiovasculares e velocidade do fluxo cerebrovascular. Para análise da função endotelial foi utilizando método de iontoforese de acetilcolina/nitroprussiato e fluxometria por laser Doppler. Estudo similar ao nosso, eles utilizaram 355 ml de bebida energética RB com 114 mg de cafeína em comparação como consumo de água. A função endotelial microvascular foi avaliada 2 horas após consumo de controle e BE. Os autores observaram um aumento significativo na vasodilatação induzida por acetilcolina, com pico aos 90 minutos após consumo de BE. O mesmo resultado não foi observado após o estímulo por nitroprussiato. Os parâmetros cardíacos alteraram após consumo de BE como o aumento da frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e diastólica bem como, a redução da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral, também foi observado.

Os autores ao analisarem os parâmetros cardíacos e a resistência cerebrovascular, apontaram que a cafeína poderia ser a possível causadora dessas alterações, corroborando outras posições no mesmo sentido (52). Entretanto, eles mesmo fizeram uma observação ao compararem os seus resultados com estudo piloto conduzido por Amy *et al* (53) que relatou que o consumo repetido de bebida energética RB, entre 8:00 e 19:00 hs levou a média de 24 horas da pressão arterial ambulatorial diurna quando comparado ao consumo de cafeína isoladamente. Isso levantou a possibilidade de que outros ingredientes possam interferir isoladamente ou em conjunto com a cafeína na alteração da PA. Essa observação foi apontada também em outros estudos (17, 38).

Em estudo pioneiro de Worthey *et al* (13), houve um decréscimo no índice de hiperemia pós reativa usando o método por tonometria arterial periférica digital (PAT). Os autores utilizaram a mesma BE com a mesma quantidade da utilizada em nosso estudo, porém, na versão sem açúcar. A versão sem açúcar da BE continha, 80 ml de cafeína, 1000 mg de taurina e 600 mg glucorulonactona. Houve aumento significativo da média de pressão arterial e da agregação plaquetária após 1 hora do consumo de BE. Os autores associaram a disfunção endotelial e a piora da agregação plaquetária com elevados níveis de glicose, achado similar ao de Peçanha (54) que demonstrou em estudo recente, que o alto consumo de carboidratos aumentou a vasodilação microcirculatória em adultos jovens, provavelmente relacionado ao estímulo de insulina. Entretanto, o uso da versão sem açúcar pelos autores, os fez atribuírem à glucorunolactona a responsável pelos efeitos prejudiciais do consumo de BE. Já em nosso estudo o açúcar contido na BE poderia contrabalancear os efeitos vasoconstritores.

Em estudo recente realizado por Akhundova *et al* em 2021 (42) foram avaliados parâmetros cardiovasculares e a função endotelial utilizando o método de dilatação mediada por fluxo da artéria braquial (FMD), primeiro no estado basal e após 60 minutos depois do consumo. Foram estudados 30 voluntários, entre homens e mulheres, de 19 a 46 anos. Nos parâmetros cardiovasculares houve diferenças resultados entre homens e mulheres, com aumento da pressão sistólica nas mulheres e valores similares de pressão diastólica, frequência cardíaca e diâmetros de pico em ambos os sexos. Não houve alteração na função endotelial após consumo de BE, resultado similar ao nosso estudo com a observação de que o volume consumido foi maior ao utilizado em nosso estudo.

Em dois estudos conduzidos por Higgins *et al*, citados nesse estudo (13, 44), o primeiro com homem de 47 anos e posteriormente um grupo de 11 adultos jovens

saudáveis, sendo 9 homens e 2 mulheres, foram utilizadas a mesma quantidade de 710 ml de BE da marca Monster® contendo 240 mg de cafeína, 360 mg de sódio, 54 g de carboidratos, 2 000 mg de taurina em jovens adultos e saudáveis. O método de avaliação utilizado foi o de dilatação mediada por fluxo (FMD), e em ambos os trabalhos, houve deterioração da função endotelial, medida após 50 minutos e novamente após 90 minutos do consumo da BE. Nos estudos de Higgins a quantidade em volume de BE foi quase 3 vezes maior que a quantidade usada em nosso estudo, da mesma forma que o sódio, que por si só está relacionado com a disfunção endotelial (55). Os autores não fizeram associação dos resultados com o consumo de cafeína, mas com a possível combinação de ingredientes contidos nas BE.

Estudo conduzido por Molnar *et al* (45) com 19 adultos saudáveis entre 19 e 46 anos de idade por exemplo, utilizou 3 diferentes marcas e quantidades de BE, entre elas 250 ml de RB, e ainda as comparou com o consumo de 473 ml de café da marca Starbucks®. A quantidade de cafeína em cada uma das BE também foi diferente, sendo a primeira com 80 mg (Red Bull®), a segunda com 230 mg (5-hour Energy®), a terceira com 120 mg (NOS-high performance energy drink) e por fim, o café (Starbucks®) contendo 240 mg de cafeína. O efeito na função endotelial foi medido em dois momentos: 1,5 hora e 4 horas após o consumo das BE e café e a avaliação foi feita por tonometria arterial periférica digital (PAT), via microcirculação da pele do dedo. O resultado apontou para melhora na vasodilatação induzida por hiperemia pós reativa (HPR) após 1,5 hs e 4 horas após consumo de Red Bull® e da marca 5-hour Energy®. Entretanto, não houve melhora da vasodilatação com o consumo de café bem como, com consumo do energético “NOS”, mesmo com a metade de cafeína contida no café. A conclusão desse estudo foi de que nem todas as BE tiveram efeito na função endotelial e a cafeína provavelmente não foi responsável por essas diferenças. Os autores fizeram uma observação quanto ao resultado conflitante com outros estudos preliminares em relação aos efeitos da cafeína e associaram às diferentes metodologias utilizadas, o tempo de avaliação bem como, a inclusão de voluntários usuáries habituais e não habituais de cafeína, o que pode alterar os resultados.

Observa-se nos estudos anteriores de Akundova, Higgins e Molnar, a ausência de comparação com grupo controle de água o que difere de nossa abordagem, já que a ingestão de um fluido pode causar alterações autonômicas relacionadas à distensão gástrica e osmolaridade, que podem afetar as respostas vasculares (56).

Outro importante aspecto a se considerar nos estudos anteriores é o uso do método de dilatação mediada por fluxo (FDM) com imagem ultrassônica da artéria

braquial, a qual avalia a condutância macrocirculatória e possui um padrão distinto quando comparada a microcirculação analisada por laser speckle (57).

Outro método nos estudos de Worthley, foi a tonometria arterial periférica digital (PAT), que avalia ondas de pulso sistêmicas (58) o qual não necessariamente representa a microcirculação avaliada por laser speckle, utilizado em nosso estudo.

A maioria dos estudos avaliados, a amostra foi representada por homens e mulheres, de forma nem sempre balanceada. Nosso estudo por outro lado, foi realizado apenas com voluntários do sexo masculino. Em estudo anterior com grupo de voluntários jovens e saudáveis, demonstrou que indivíduos do sexo feminino apresentaram aumento da vasodilatação microcirculatória por estímulo de acetilcolina, quando comparado a indivíduos do sexo masculino (49). Ademais o hormônio estrogênio tem sido implicado na melhora da vasodilatação através de estímulo de prostaciclina e síntese de óxido nítrico, entre outros mecanismos (59). Como consequência efeitos agudos no endotélio vascular diferem entre homens e mulheres.

7.1 Limitações do estudo

Este estudo foi realizado entre os anos de 2019 à 2022, e foi drasticamente afetado pelo evento da pandemia de Covid 19, que impactou no número reduzido de voluntários disponíveis para pesquisa.

O estudo foi realizado utilizando apenas uma marca de BE com menor volume de 250 ml em comparação com outros estudos da mesma natureza. Em razão disso, a quantidade das substâncias potencialmente ativas como a cafeína, taurina, açúcares e sódio também foram menores que as demais o que pode ter afetado o resultado da pesquisa.

8 CONCLUSÃO

Uma lata de BE popular no mercado não induziu efeitos agudos na função microvascular sistêmica em homens saudáveis na população estudada. Estudos adicionais serão necessários para avaliar os efeitos vasculares de BE no mundo real, uma tarefa desafiadora considerando as diferenças nas composições das marcas e volumes disponíveis, bem como o consumo concomitante de outras substâncias. A avaliação simultânea de vasos de condutância e resistência após a ingestão de uma BE será importante para investigar as discrepâncias dos estudos prévios sobre o tema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santos I, Souza A, Santos O. Análise de composição química de bebidas energéticas em comparação com a rotulagem nutricional e legislações vigentes. *RBNE - Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*. 2017;11(63).
2. ABIR. ABIR – Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas <https://abir.org.br/o-setor/bebidas/energeticos/>: ABIR – Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas; 2022 [
3. Reissig CJ, Strain EC, Griffiths RR. Caffeinated energy drinks--a growing problem. *Drug Alcohol Depend*. 2009;99(1-3):1-10.
4. Higgins JP, Tuttle TD, Higgins CL. Energy beverages: content and safety. *Mayo Clin Proc*. 2010;85(11):1033-41.
5. Howard MA, Marczyński CA. Acute effects of a glucose energy drink on behavioral control. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2010;18(6):553-61.
6. Campbell B, Wilborn C, La Bounty P, Taylor L, Nelson MT, Greenwood M, et al. International Society of Sports Nutrition position stand: energy drinks. *J Int Soc Sports Nutr*. 2013;10(1):1.
7. Nadeem IM, Shanmugaraj A, Sakha S, Horner NS, Ayeni OR, Khan M. Energy Drinks and Their Adverse Health Effects: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sports Health*. 2021;13(3):265-77.
8. Steinke L, Lanfear DE, Dhanapal V, Kalus JS. Effect of “energy drink” consumption on hemodynamic and electrocardiographic parameters in healthy young adults. *Ann Pharmacother*. 2009;43(4):596-602.
9. Wiklund U, Karlsson M, Ostrom M, Messner T. Influence of energy drinks and alcohol on post-exercise heart rate recovery and heart rate variability. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2009;29(1):74-80.
10. Alford C, Cox H, Wescott R. The effects of red bull energy drink on human performance and mood. *Amino Acids*. 2001;21(2):139-50.
11. Bichler A, Swenson A, Harris MA. A combination of caffeine and taurine has no effect on short term memory but induces changes in heart rate and mean arterial blood pressure. *Amino Acids*. 2006;31(4):471-6.
12. Higgins JP. Endothelial function acutely worse after drinking energy beverage. *Int J Cardiol*. 2013;168(2):e47-9.
13. Worthley MI, Prabhu A, De Sciscio P, Schultz C, Sanders P, Willoughby SR. Detrimental effects of energy drink consumption on platelet and endothelial function. *Am J Med*. 2010;123(2):184-7.

14. Grasser EK, Yepuri G, Dulloo AG, Montani JP. Cardio- and cerebrovascular responses to the energy drink Red Bull in young adults: a randomized cross-over study. *Eur J Nutr.* 2014;53(7):1561-71.
15. Houben A, Martens RJH, Stehouwer CDA. Assessing Microvascular Function in Humans from a Chronic Disease Perspective. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(12):3461-72.
16. Cracowski JL, Roustit M. Current Methods to Assess Human Cutaneous Blood Flow: An Updated Focus on Laser-Based-Techniques. *Microcirculation.* 2016;23(5):337-44.
17. Heckman MA, Sherry K, De Mejia EG. Energy Drinks: An Assessment of Their Market Size, Consumer Demographics, Ingredient Profile, Functionality, and Regulations in the United States. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2010;9(3):303-17.
18. Brasil. Ministério da Saúde ANdVSRDCRnds. REGULAMENTO TÉCNICO PARA MISTURAS PARA O PREPARO DE ALIMENTOS E ALIMENTOS PRONTOS PARA O CONSUMO https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0273_22_09_2005.html: Brasil. Ministério da Saúde; 2005 [
19. Ramada R, Nacif M. AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE BEBIDAS ENERGÉTICAS POR ESTUDANTES DE UMA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-SP. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento.* 2019;13(77):151-6.
20. Monteiro CA, Cannon G, Levy R, Moubarac J-C, Jaime P, Martins AP, et al. Classificação dos alimentos. *Saúde Pública. World Nutrition.* 2016;7(1):28-40.
21. Breda JJ, Whiting HS, Encarnação R, Norberg S, Jones R, Reinap M, et al. Consumo de bebidas energéticas na Europa: Uma Revisão dos riscos , efeitos adversos à saúde e opções políticas para responder. *Frente Saúde Pública.* 2014;134:1-5.
22. Brasil. Ministério da Saúde ANdVS. Resolução Diretoria Colegiada RDC nº 273 de 22 setembro de 2005 https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1998/prt0868_03_11_1998.html: Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ; 2005 [
23. Hladun O, Papaseit E, Martin S, Barriocanal AM, Poyatos L, Farre M, et al. Interaction of Energy Drinks with Prescription Medication and Drugs of Abuse. *Pharmaceutics.* 2021;13(10).
24. De Sanctis V, Soliman N, Soliman AT, Elsedfy H, Di Maio S, El Kholy M, et al. Caffeinated energy drink consumption among adolescents and potential health consequences associated with their use: a significant public health hazard. *Acta Biomed.* 2017;88(2):222-31.
25. Yonamine M, Teng T. The consumption of energy drinks and their health effects. *RevSalus.* 2019;1:61-6.

26. Pound CM, Blair B, Canadian Paediatric Society N, Gastroenterology Committee OO. Energy and sports drinks in children and adolescents. *Paediatr Child Health*. 2017;22(7):406-10.
27. Massey MJ, Shapiro NI. A guide to human in vivo microcirculatory flow image analysis. *Crit Care*. 2016;20:35.
28. Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care*. 2004;8(6):462-8.
29. Taylor AE, Moore TM. Capillary fluid exchange. *Am J Physiol*. 1999;277(6 Pt 2):S203-10.
30. Tafner P, Chen FK, Rabello RF, Correa TD, Chaves RCF, Serpa AN. Recent advances in bedside microcirculation assessment in critically ill patients. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2017;29(2):238-47.
31. Yano K, Gale D, Massberg S, Cheruvu PK, Monahan-Earley R, Morgan ES, et al. Phenotypic heterogeneity is an evolutionarily conserved feature of the endothelium. *Blood*. 2007;109(2):613-5.
32. Carvalho MHC, Nigro D, Lemos VS, Tostes RCA, Fortes ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens*. 2001;8:76-88.
33. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
34. Girardi JM, Girardi FA, Peters VM. Endotélio vascular e efeitos das estatinas. *HU Rev, Juiz de Fora*. 2006;32(1):21-5.
35. Higashi Y. Assessment of endothelial function. History, methodological aspects, and clinical perspectives. *Int Heart J*. 2015;56(2):125-34.
36. Loader J, Meziat C, Watts R, Lorenzen C, Sigaucho-Roussel D, Stewart S, et al. Effects of Sugar-Sweetened Beverage Consumption on Microvascular and Macrovascular Function in a Healthy Population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(6):1250-60.
37. Braverman-Bronstein A, Camacho-Garcia-Formenti D, Zepeda-Tello R, Cudhea F, Singh GM, Mozaffarian D, et al. Mortality attributable to sugar sweetened beverages consumption in Mexico: an update. *Int J Obes (Lond)*. 2020;44(6):1341-9.
38. Higgins JP, Babu K, Deuster PA, Shearer J. Energy Drinks: A Contemporary Issues Paper. *Curr Sports Med Rep*. 2018;17(2):65-72.
39. Temple JL, Bernard C, Lipshultz SE, Czachor JD, Westphal JA, Mestre MA. The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. *Front Psychiatry*. 2017;8:80.

40. Efsa Panel on Dietetic Products N, Allergies, Turck D, Bresson JL, Burlingame B, Dean T, et al. Guidance on the preparation and submission of the notification and application for authorisation of traditional foods from third countries in the context of Regulation (EU) 2015/2283 (Revision 1). *EFSA J.* 2021;19(3):e06557.
41. Ehlers A, Marakis G, Lampen A, Hirsch-Ernst KI. Risk assessment of energy drinks with focus on cardiovascular parameters and energy drink consumption in Europe. *Food Chem Toxicol.* 2019;130:109-21.
42. Akhundova J, Kaya CT, Gerede Uludag DM. Acute effects of consumption of low-caffeine energy drinks on endothelial functions in healthy volunteers. *Anatol J Cardiol.* 2021;25(10):678-83.
43. Markon AO, Jones OE, Punzalan CM, Lurie P, Wolpert B. Caffeinated energy drinks: adverse event reports to the US Food and Drug Administration and the National Poison Data System, 2008 to 2015. *Public Health Nutr.* 2019;22(14):2531-42.
44. Higgins JP, Yang B, Herrin NE, Yarlagadda S, Le GT, Ortiz BL, et al. Consumption of energy beverage is associated with attenuation of arterial endothelial flow-mediated dilatation. *World J Cardiol.* 2017;9(2):162-6.
45. Molnar J, Somberg JC. Evaluation of the Effects of Different Energy Drinks and Coffee on Endothelial Function. *Am J Cardiol.* 2015;116(9):1457-60.
46. O'Doherty J, McNamara P, Clancy NT, Enfield JG, Leahy MJ. Comparison of instruments for investigation of microcirculatory blood flow and red blood cell concentration. *J Biomed Opt.* 2009;14(3):034025.
47. Heeman W, Steenbergen W, van Dam G, Boerma EC. Clinical applications of laser speckle contrast imaging: a review. *J Biomed Opt.* 2019;24(8):1-11.
48. Mahé G, Humeau-Heurtier A, Durand S, Leftheriotis G, Abraham P. Assessment of skin microvascular function and dysfunction with laser speckle contrast imaging. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2012;5(1):155-63
49. Cordovil I, Huguenin G, Rosa G, Bello A, Kohler O, de Moraes R, et al. Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvasc Res.* 2012;83(3):376-9.
50. Al-Basher GI, Aljabal H, Almeer RS, Allam AA, Mahmoud AM. Perinatal exposure to energy drink induces oxidative damage in the liver, kidney and brain, and behavioral alterations in mice offspring. *Biomed Pharmacother.* 2018;102:798-811.
51. Brown CM, Barberini L, Dulloo AG, Montani JP. Cardiovascular responses to water drinking: does osmolality play a role? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289(6):R1687-92.

52. Goldfarb M et al. Review of published cases of adverse cardiovascular events after ingestion of energy drink. *American Journal of Cardiology* 2014; 113: 168-72; Robertson D, Frolich et al; Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. *N. Engl J Medicine* 1978; 298; 181-6.
53. Franks AM, Schmidt JM, McCain KR, Fraer M. Comparison of the Effects of Energy Drink Versus Caffeine Supplementation on Indices of 24-Hour Ambulatory Blood Pressure. *Annals of Pharmacotherapy*. 2012;46(2):192-199. doi:10.1345/aph.1Q555.
54. Peçanha, D., et al., Increased systemic endothelial-dependent microvascular reactivity after ingestion of a high-carbohydrate snack in young, healthy volunteers. *Microvasc Res*, 2020. 129: p. 103962.
55. Dickinson, K.M., P.M. Clifton, and J.B. Keogh, Endothelial function is impaired after a high-salt meal in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 2011. 93(3): p. 500-5.
56. Brown, C.M., et al., Cardiovascular responses to water drinking: does osmolality play a role? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. 289(6): p. R1687-92.
57. Domsic, R.T., et al., Endothelial dysfunction is present only in the microvasculature and microcirculation of early diffuse systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol*, 2014. 32(6 Suppl 86): p. S-154-60.
58. Axtell, A.L., F.A. Gomari, and J.P. Cooke, Assessing endothelial vasodilator function with the Endo-PAT 2000. *J Vis Exp*, 2010(44)].
59. Tostes, R.C., et al., Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res*, 2003. 36(9): p. 1143-58.22.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Procedimento relacionado ao Projeto de pesquisa: “Efeitos agudos da ingestão de bebida energética na função endotelial em adultos saudáveis”

Termo de esclarecimento:

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é investigar as alterações na circulação sanguínea associadas com o consumo de uma bebida energética e de um suplemento do aminoácido taurina. Este projeto vai avaliar se o consumo de uma lata da bebida *Red Bull®* (RB) ou a ingestão de 1,5 gramas em cápsula de taurina causam mudanças na microcirculação, que são pequenos vasos sanguíneos, presentes em diversos locais do organismo. Os resultados podem ajudar a compreender melhor os mecanismos relacionados com o uso destas substâncias.

O protocolo de avaliação será realizado em 3 sessões, em dias diferentes. Em uma delas haverá o consumo de uma lata de RB. Em outra, o consumo do mesmo volume de água filtrada e na terceira, o consumo de um suplemento em cápsula com 1,5g de taurina, ingerido com água.

Em cada sessão, será feita uma avaliação da microcirculação antes e duas avaliações depois do consumo da substância (RB, água ou suplemento de taurina): uma após 1 hora e 30 minutos e outra após 4 horas.

Para a realização desse estudo, os seguintes procedimentos e exames serão realizados:

- Coleta de amostra de sangue, onde serão examinadas diversas substâncias cujos níveis são indicadores do seu estado de saúde, tais como o açúcar e a gordura no sangue.
- Exame do funcionamento dos seus vasos sanguíneos superficiais da pele com uma técnica de luz laser. Nesse exame sua pele não vai ser perfurada, nenhuma substância será injetada e você não vai sentir nenhuma dor ou desconforto. O exame exige somente que você fique deitado durante meia hora, sem se movimentar muito, para que o exame mostre como estão funcionando os pequenos vasos sanguíneos na sua pele.

Riscos e inconveniências:

Não existem riscos significativos decorrentes das técnicas de investigação do funcionamento dos seus vasos sanguíneos da pele.

A coleta de sangue será realizada com material descartável, existindo apenas risco de dor leve ou pequeno hematoma.

Adicionalmente, faremos um questionário para obtenção de informações sobre a sua saúde, dieta e nível de atividade física.

Não há benefício imediato para você. Em qualquer etapa do estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, o médico Dr. Daniel Kasal, através do telefone (21) 3037-2288. Também poderá ser contactado o médico responsável pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), Dr. Eduardo Tibiriçá, pelo telefone (21) 3037-2307. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o CEP do Instituto Nacional de Cardiologia.

É garantida a liberdade de não querer participar do projeto de pesquisa ou de retirar o consentimento a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer prejuízo.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações obtidas de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos voluntários.

Ao final do dia de exame, um lanche será oferecido, sem custo para você.

Haverá o armazenamento do material, caso seja necessário realizar experimentos futuros e repetições dos anteriores, para aumentar credibilidade dos dados. O material biológico obtido não será enviado ao exterior.

Termo de Consentimento:

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo citado acima que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o integrante da equipe _____, sobre minha decisão de participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo. Poderei retirar meu consentimento e solicitar o descarte do material referente à minha participação em qualquer momento, antes ou durante o estudo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Estou assinando este Termo em duas vias, uma delas ficará comigo e a outra no arquivo do estudo.

Nome do sujeito da pesquisa

Data:___ /___ /___

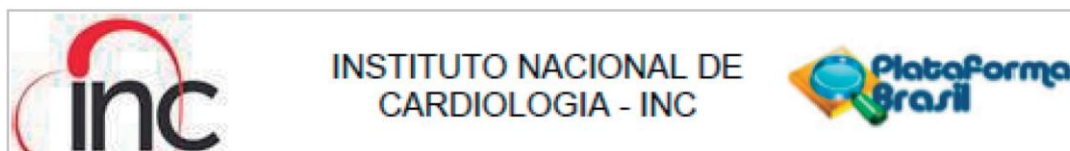
Assinatura do sujeito da pesquisa

Nome do Pesquisador

Data:___ /___ /___

Assinatura do pesquisador

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos agudos da ingestão de bebida energética na função endotelial em adultos saudáveis

Pesquisador: Daniel Arthur Barata Kasal

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 13135219.0.0000.5272

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Cardiologia - INC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Envio de relatório parcial do projeto de pesquisa intitulado: Efeitos agudos da

Data do Envio: 13/01/2021

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.530.539

Apresentação da Notificação:

Relatório Parcial da Pesquisa

Objetivo da Notificação:

Relatório Parcial da Pesquisa

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Relatório Parcial da Pesquisa

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Relatório Parcial da Pesquisa

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Relatório Parcial da Pesquisa

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

E-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com



INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGIA - INC



Continuação do Parecer: 4.530.539

Recomendações:

Relatório Parcial da Pesquisa

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Relatório Parcial da Pesquisa. Houve redução no recrutamento de participantes em função da pandemia de COVID-19, sendo necessário ampliar o período de recrutamento. Já selecionado sete sujeitos de um total previsto de trinta.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	Relatorio_parcial_CAAE1313521900000 5272_jan2021.pdf	13/01/2021 09:44:41	Daniel Arthur Barata Kasal	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 09 de Fevereiro de 2021

Assinado por:
Eduardo Vera Tibiriçá
(Coordenador(a))

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

E-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com

ANEXO C – SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO À REVISTA *MICROCIRCULATION*

Dear EDUARDO TIBIRICA,

Your manuscript entitled "Evaluation of systemic microvascular reactivity after ingestion of an energy drink in young male volunteers" has been successfully submitted online and is being delivered to the Editorial Office of *Microcirculation* for consideration.

You will receive a follow-up email with further instructions from our electronic editorial office platform, ScholarOne Manuscripts, typically within one business day. That message will confirm that the Editorial Office has received your submission and will provide your Manuscript ID.

Thank you for submitting your manuscript to *Microcirculation*

Sincerely,
The Editorial Staff at Microcirculation

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more by reading our data protection policy. In case you don't want to be contacted by this publication again, please send an email to mamayo@wiley.com.

ANEXO D – ARTIGO CIENTÍFICO**Evaluation of systemic microvascular reactivity after ingestion of an energy drink
in young male volunteers**

Liliana Skaf-Gonçalves¹, Daniela Peçanha¹, Daniel Kasal^{1,2}, Eduardo Tibiriçá^{1†*}

†The last two authors contributed equally to this work.

¹National Institute of Cardiology, Rio de Janeiro, Brazil

²State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author:

Eduardo Tibiriçá

Instituto Nacional de Cardiologia

Rua das Laranjeiras, 374

22240-006, Rio de Janeiro, Brazil

E-mail: etibi@uol.com.br

Running title:

Acute effects of an energy drink on microvascular reactivity

ABSTRACT

Objective: Energy drinks (EDs) are nonalcoholic beverages whose main ingredients are sugar, taurine, and caffeine. Their consumption is rising worldwide, with only few conflicting studies examining their vascular effects in young adults. We evaluated microvascular reactivity (MR) before and after ED in young healthy male volunteers.

Methods: Systemic MR was evaluated in the skin of the forearm using laser speckle contrast imaging with acetylcholine (ACh) iontophoresis before, 90 and 180 minutes after the consumption of one can of ED or the same volume of water (control), followed by postocclusive reactive hyperemia (PORH).

Results: Twenty-two volunteers were evaluated (age 25 ± 4.8 years). In both ACh-induced and PORH-induced MR, there was no significant change in vasodilation after one ED in any of the intervals analyzed.

Conclusions: Our data suggest that the ingestion of one ED can does not acutely affect the microvascular endothelial function of young healthy men. Variability of brand, volume ingested, method of vascular evaluation employed and inclusion criteria may explain the discrepancies of studies of vascular effects of ED. Previous reports of adverse effects of ED may in part have been due to the concomitant consumption of other substances not employed in the present study.

Key words: microvascular endothelial function, energy drinks, laser speckle, microvascular reactivity.

Abbreviations

ACh: acetylcholine

APU: arbitrary perfusion units

AUC: area under the curve

CVC: cutaneous vascular conductance

DBP: diastolic blood pressure

EDs: energy drinks

EDysf: endothelial dysfunction

HDL: high-density lipoprotein

LDL: low-density lipoprotein

LSCI: laser speckle contrast imaging

MR: microvascular reactivity

PORH: postocclusive reactive hyperemia

SBP: systolic blood pressure

Introduction

Energy drinks (EDs) are ready to drink nonalcoholic beverages, and their main ingredients are sugar, taurine, and caffeine [1]. These products are marketed as boosters of mental and physical performance and are increasingly used in Western societies, especially by young adults [2]. Case reports of adverse effects related to ED consumption affecting the cardiovascular system have been described in otherwise healthy young individuals, including arrhythmia [3], coronary artery vasospasm [4], and heart infarction [5]. These data support the hypothesis that endothelial dysfunction (EDysf) plays a role in ED cardiovascular effects and have prompted studies to evaluate the actions of these drinks on the circulation, with conflicting results [6-9]. A noninvasive study approach based on skin microcirculation may be appropriate in this setting. Accordingly, skin microcirculation has been proposed as the earliest segment of the vascular system affected by EDysf [10], with a pattern that mirrors systemic microcirculation, including coronary vessels [11]. The present study aimed to evaluate the microvascular reactivity (MR) before and after one can of ED compared to a control (water) consumed by the same individuals, young healthy male volunteers.

Methods

The present study was undertaken in accordance with the Helsinki Declaration, revised in 2013, and was approved by the Institutional Review Board (IRB) of the National Institute of Cardiology, Rio de Janeiro, Brazil, under protocol # CAAE 13135219.0.0000.5272. Once deemed eligible to participate in the study, all subjects read and signed an informed consent document approved by the IRB.

The study included twenty-two young, healthy male volunteers. The clinical characteristics of the volunteers are described in Table 1. The inclusion criteria were age between 18 and 35 years and no relevant findings in the medical history. The exclusion criteria were as follows: being a competitive athlete; being on regular medication; using illicit drugs; being allergic to coffee, taurine or any of the components of the selected energy drink; and having a body mass index ≥ 30 kg/m². Venous blood samples were obtained for biochemical testing in the morning after a 12-hour fast.

Study protocol

The study was carried out in two sessions on separate days, with the ingestion of 250 ml of the energy drink (Red Bull®) or control (mineral water Minalba®), defined by simple randomization with an interval of at least two weeks between them. The ingredients of the commercially available energy drink used (250 ml) were 20 g of sugar, 100 mg of taurine, 600 mg of glucuronolactone, 80 mg of caffeine (equivalent to a cup of coffee) and B vitamins.

Volunteers were asked to fast for 12 hours before the examination and to not consume caffeine-containing beverages within the previous 12 hours. They were also advised not to exercise strenuously for 12 hours before the examination. The examinations were performed between 8:00 am and 1:00 pm at a controlled temperature

of 21 °C (± 2) in a quiet room. Volunteers were then asked to lie down in a supine position for 10 minutes. Subsequently, blood pressure and heart rate measurements were obtained with a validated and calibrated automatic sphygmomanometer (Omron M7, Omron Health care, Hoofddorp, The Netherlands). The assessment of skin microvascular flow and reactivity was achieved before and 90 and 180 minutes after consumption of the energy drink or control. Before each evaluation, blood pressure and heart rate were measured again.

Evaluation of microvascular flow and reactivity

The microcirculatory tests were performed in an undisturbed quiet room with a stable temperature (23 ± 1 °C) after a 20-minute rest period in the supine position. Microvascular reactivity was evaluated using a laser speckle contrast imaging (LSCI) system with a laser wavelength of 785 nm (PeriCam PSI system, Perimed, Järfälla, Sweden), and continuous recordings of cutaneous microvascular perfusion changes were measured in arbitrary perfusion units (APU). The images were analyzed using PIMSoft software (Perimed, Järfälla, Sweden). One skin site on the ventral surface of the forearm was randomly chosen for the recordings. Hair, broken skin, areas of skin pigmentation and visible veins were avoided, and two drug-delivery electrodes were installed using adhesive discs (LI 611, Perimed, Järfälla, Sweden). Acetylcholine (ACh) 2% w/v (Sigma Chemical CO, St. Louis, USA) iontophoresis was performed using a micropharmacology system (PF 751 PeriIont USB Power Supply, Perimed, Sweden) using increasing anodal currents of 30, 60, 90, 120, 150 and 180 μ A, which were administered for 10-second intervals spaced 1 minute apart. The total charges for the above currents were 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 and 1.8 mC, respectively. The dispersive electrode was attached approximately 15 cm from the electrophoresis chamber. Skin

blood flow measurements in APU were divided by mean arterial pressure values to yield cutaneous vascular conductance (CVC) in APU/mmHg.

Statistical analysis

The results are presented as the means $\pm$ SD. Variables without a Gaussian distribution, which was determined with the Shapiro–Wilk normality test, are presented as the medians (25th - 75th percentile). Statistical analyses of most microvascular parameters were performed using two-way ANOVA followed by multiple comparisons (Sidak's multiple comparisons test), where we considered the interactions of time (before and 90 or 180 min after ingestion) and intervention (control or energy drink). The values of basal CVC were analyzed using the unpaired *t* test. Statistical analyses of the curves of vasodilation induced by ACh iontophoresis were performed using two-way ANOVA followed by multiple comparisons (Tukey's multiple comparisons test), where we considered the interactions of time (before and 90 or 180 min after ingestion) for each intervention (control or energy drink). P values <0.05 were considered statistically significant. The Prism version 7.0 statistical package was used for statistical analyses (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Effects of the energy drink on cardiovascular parameters

The effects of the acute ingestion of energy drinks on arterial pressure and heart rate are described in Table 1. There were slight decreases in heart rate in the control (0.0369) and energy drink (0.0223) groups and a mild increase in systolic blood pressure (0.0347) in the energy drink group.

Effects of the energy drink on skin microvascular flow and reactivity

The skin iontophoresis of acetylcholine (ACh) induced current-dependent increases in microvascular cutaneous vascular conductance both in the control and energy drink groups (Figure 1 A and B). There were no differences in microvascular responses recorded during baseline, 90 or 180 min either in the control group ($P=0.1880$) or energy drink ($P=0.8152$).

The baseline skin microvascular flow values were not different between the control group (0.32 ± 0.09 APU/mmHg) and the energy drink group (0.31 ± 0.12 APU/mmHg; $P=0.8550$; Figure 2A). In the control group, the areas under the curve (AUCs) of microvascular vasodilation induced by ACh iontophoresis were $20,621 \pm 4,873$ APU/s before and $16,985 \pm 4,873$ APU/s and $18,468 \pm 4,978$ APU/s after 90 and 180 min, respectively (Figure 2B). In the energy drink group, the AUC values were $19,656 \pm 5,876$ APU/s before and $18,765 \pm 7,321$ APU/s and $18,343 \pm 6,880$ APU/s after 90 and 180 min, respectively ($P=0.8724$, two-way ANOVA between the two groups) (Figure 2B).

The peak values of microvascular flow induced by ACh iontophoresis in the control group were 0.62 ± 0.15 APU/mmHg before and 0.58 ± 0.21 and 0.58 ± 0.19

APU/mmHg after 90 and 180 min, respectively (Figure 2C). In the energy drink group, the values were 0.59 ± 0.21 APU/mmHg before and 0.59 ± 0.22 and 0.55 ± 0.23 APU/mmHg after 90 and 180 min, respectively (Figure 2C) ($P=0.7590$, two-way ANOVA between the two groups). The delta values (peak minus baseline) of microvascular flow induced by ACh iontophoresis in the control group were 0.30 ± 0.16 APU/mmHg before and 0.34 ± 0.19 and 0.31 ± 0.16 APU/mmHg after 90 and 180 min, respectively (Figure 2D). In the energy drink group, the values were 0.28 ± 0.19 APU/mmHg before and 0.32 ± 0.17 and 0.29 ± 0.21 APU/mmHg after 90 and 180 min, respectively (Figure 2D) ($P=0.6861$, two-way ANOVA between the two groups).

The peak values of microvascular flow induced by postocclusive reactive hyperemia (PORH) in the control group were 0.96 ± 0.22 APU/mmHg before and 0.77 ± 0.17 and 0.86 ± 0.33 APU/mmHg after 90 and 180 min, respectively (Figure 2E). In the energy drink group, the values were 0.84 ± 0.19 APU/mmHg before and 0.81 ± 0.19 and 0.80 ± 0.20 APU/mmHg after 90 and 180 min, respectively (Figure 2E) ($P=0.3993$, two-way ANOVA between the two groups). The delta values (peak minus baseline) of microvascular flow induced by PORH in the control group were 0.60 ± 0.19 APU/mmHg before and 0.46 ± 0.13 and 0.46 ± 0.13 APU/mmHg after 90 and 180 min, respectively (Figure 2F). In the energy drink group, the values were 0.48 ± 0.14 APU/mmHg before and 0.49 ± 0.15 and 0.48 ± 0.15 APU/mmHg after 90 and 180 min, respectively (Figure 2F) ($P=0.2721$, two-way ANOVA between the two groups).

Discussion

In the present study of a cohort of young adult healthy male volunteers, ED did not induce acute effects on MR. Although the acute rise in blood pressure is consistent with previous studies [7-9], the literature regarding the effects of ED on endothelial function is conflicting. An analysis of the experimental conditions may aid in understanding the differences in the studies and suggest potential improvements.

The pioneer study of Worthley et al. found a decrease in the reactive hyperemia index using a peripheral arterial tone (PAT) method one hour after the ingestion of one can of an ED [7]. The authors employed an ED with a similar composition to the beverage used in our study, except that it was sugar-free. Recent data from our group have shown that high carbohydrate ingestion increases microcirculatory vasodilation in healthy subjects, an effect possibly related to insulin stimulus [12]. As a consequence, the sugar content in the ED in our study could have counterbalanced the vasoconstrictive effects. Furthermore, the PAT evaluates systemic pulse waves [13], which do not necessarily represent the microcirculation milieu evaluated with laser speckle in our study.

Previous results from another group suggested the induction of EDysf after one ED [9, 14, 15]. The three studies employed the consumption of one can of a different ED (Monster Energy®), which provided twice the volume used in our study and contained increased sodium, an ingredient that has been implicated in acute EDysf [16]. In addition, the lack of water control differed from our approach. Accordingly, the ingestion of a fluid may cause autonomic changes related to gastric distention and osmolality, which may affect vascular responses [17].

Another important aspect in most previous studies was the use of flow-mediated dilation with ultrasound imaging of the brachial artery, which evaluates conductance of the macrocirculation, previously reported as displaying a distinct pattern when compared to microcirculation analyzed with laser speckle [10]. The loss of coherence between macro- and microcirculation has been described in pathological states, such as sepsis [18, 19]. An interesting approach would be to simultaneously evaluate both vascular territories after ED consumption to clarify these apparent inconsistencies.

In the study of Grasser et al., the microcirculation was evaluated with laser Doppler flowmetry two hours after ED consumption [8]. The authors found an increased response to ACh-induced vasodilation employing the same brand of our study, but with a higher volume can (355 ml vs. 250 ml in present study). To the best of our knowledge, the present study is the first to evaluate the vascular effects of an ED in microcirculation employing the LSCI, a method that combines laser Doppler flowmetry and laser Doppler imaging. This is a highly reproducible technique for blood flow imaging [20], often preferred because of its ease of use and its ability to enable wide skin area evaluation for fast vessel mapping [21].

All previous studies evaluated a cohort composed of men and women in a balanced fashion. Our present study design differed by evaluating only male subjects. A previous study by our group with young healthy volunteers showed that female individuals displayed increased vasodilation to ACh at the microcirculation when compared to male participants [22]. Indeed, estrogen has been implicated in improved vasodilation through the stimulus of prostacyclin and nitric oxide synthesis, among other mechanisms [23]. As a consequence, vascular acute ED effects may differ in men and women. Furthermore, the possibility of the existence of harmful ED effects during

pregnancy [24] would also make it difficult to include young women in the study for ethical reasons.

Study limitations

The present study aimed to evaluate the microcirculatory effects of a popular ED formulation. In the real world, however, ED consumption is frequently performed in volumes far beyond one can and in association with alcohol or illicit substances [25, 26]. These factors can contribute to the adverse effects reported with ED consumption and were not evaluated in the present study.

Conclusions and perspectives

One of the popular brands of ED did not induce acute effects on the systemic microvascular function of healthy male subjects. Further studies are needed to evaluate the vascular effects of ED in the real world, a challenging task considering the differences in brand compositions, different available volumes and concomitant consumption of other substances. The simultaneous evaluation of conductance and resistance vessels after the ingestion of an ED is warranted to investigate discrepancies in previous studies.

Acknowledgments

The authors would like to thank Marcio Marinho Gonzalez for his excellent technical assistance.

Ethics approval and consent to participate

The present study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, revised in 2013, and was approved by the Institutional Review Board (IRB) of the National Institute of Cardiology, Rio de Janeiro, Brazil, under protocol # CAAE 13959019.0.0000.5272. The informed consent form was also approved was by the Institutional Review Board (IRB) of the National Institute of Cardiology, Rio de Janeiro, Brazil, phone: +55-21-3037-2307, e-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com, address: Rua das Laranjeiras 374 – fifth floor, Laranjeiras, Rio de Janeiro, Brazil, zip code: 22.240-006.

Competing interests

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Funding

This investigation was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, E.T. grant #311680/2021-6) and FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro), E.T. grant #E-26/200.976/2022).

Authors' contributions

LSG, DK and ET contributed to the conception and design of the study, and to the analysis and interpretation of data; LSG and DP performed the experiments; LSG, DP, DK and ET were involved in the drafting of the manuscript, and literature review. All authors have given final approval of the version to be published and are publicly responsible for its content.

Table 1: Clinical characteristics of the healthy volunteers (n=22).

Age (years)	25.1 ± 4.8
Body weight (kg)	76.5 ± 10.9
Height (cm)	176.4 ± 8.9
Body mass index (kg/m ²)	24.6 ± 2.3
Waist circumference (cm)	84.1 ± 7.7
Eutrophic n (%)	13 (59)
Overweight n (%)	9 (41)
Fasting glucose (mg/dL)	89 ± 8
Total cholesterol (mg/dL)	162 ± 29
LDL-Cholesterol (mg/dL)	106 ± 26
HDL-Cholesterol (mg/dL)	51 (42-58)
Triglycerides (mg/dL)	67 ± 21
Creatinine (mg/dL)	0.95 ± 0.13
Urea (mg/dL)	28 ± 7
SAP (mmHg)	120 ± 8
DAP (mmHg)	72 ± 8
MAP (mmHg)	88 ± 7
Heart rate (bpm)	64 ± 10

The results are presented as the means ± SD. Values that did not follow a Gaussian distribution are presented as the medians (25th - 75th percentiles; Shapiro–Wilk normality test).

Abbreviations; SAP, systolic arterial pressure; DAP, diastolic arterial pressure; MAP, mean arterial pressure.

Table 2: Effects of the acute ingestion of mineral water (CONTROL) or energy drink on cardiovascular parameters of healthy volunteers.

CONTROL				
Parameter	Baseline	90 min	180 min	P values
SAP (mmHg)	120 ± 9	120 ± 6	122 ± 7	0.4479
DAP (mmHg)	70 ± 8	71 ± 8	71 ± 8	0.5445
MAP (mmHg)	86 ± 7	87 ± 7	88 ± 7	0.3435
HR (beats/min)	62 ± 10	60 ± 11	58 ± 10*	0.0369
ENERGY DRINK				
Parameter	Baseline	90 min	180 min	P values
SAP (mmHg)	121 ± 7	122 ± 6	124 ± 7*	0.0347
DAP (mmHg)	72 ± 8	73 ± 7	72 ± 8	0.7827
MAP (mmHg)	88 ± 7	89 ± 6	90 ± 7	0.5221
HR (beats/min)	62 ± 10	60 ± 10	59 ± 11*	0.0223

The results are presented as the means ± SD (according to the Shapiro–Wilk normality test). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

*p<0.05 compared to baseline values.

Abbreviations: SAP, systolic arterial pressure; DAP, diastolic arterial pressure; MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate.

FIGURE 1: Effects of skin acetylcholine (ACh) iontophoresis on the cutaneous microvascular conductance of the healthy volunteers (n=22), expressed in arbitrary perfusion units (APU) divided by mean arterial pressure in mmHg, representing endothelium-dependent microvascular vasodilation before and after acute ingestion of mineral water (A) (CONTROL) or energy drink (B).

The values are expressed as the medians (95% CI).

Statistical analyses were performed using two-way ANOVA followed by multiple comparisons (Tukey's multiple comparisons test), where we considered the interactions of time (before, 90 and 180 min after ingestion) for each intervention (control or energy drink). There were no statistically significant differences in cutaneous microvascular flow before or after administration of the control or energy drink.

FIGURE 2: (A) Baseline cutaneous microvascular conductance (CVC) and effects of the acute ingestion of mineral water (CONTROL) or energy drink on the microvascular reactivity of healthy volunteers (n=22); (B) area under the curve of microvascular vasodilation induced by skin acetylcholine (ACh) iontophoresis; peak effects (C) and delta (peak minus baseline) (D) of cutaneous acetylcholine iontophoresis. Peak effects (E) and delta (peak minus baseline) (F) of postocclusive reactive hyperemia (PORH).

CVC is expressed as arbitrary perfusion units (APU) divided by mean arterial pressure in mmHg.

The results are shown as the means $\pm$ SD (Shapiro–Wilk normality test).

Statistical analyses were performed using two-way ANOVA followed by multiple comparisons (Sidak's multiple comparisons test), where we considered the interactions of time (before, 90 and 180 min after ingestion) and intervention (control or energy drink). There were no statistically significant differences before or after ingestion in any microvascular parameter.

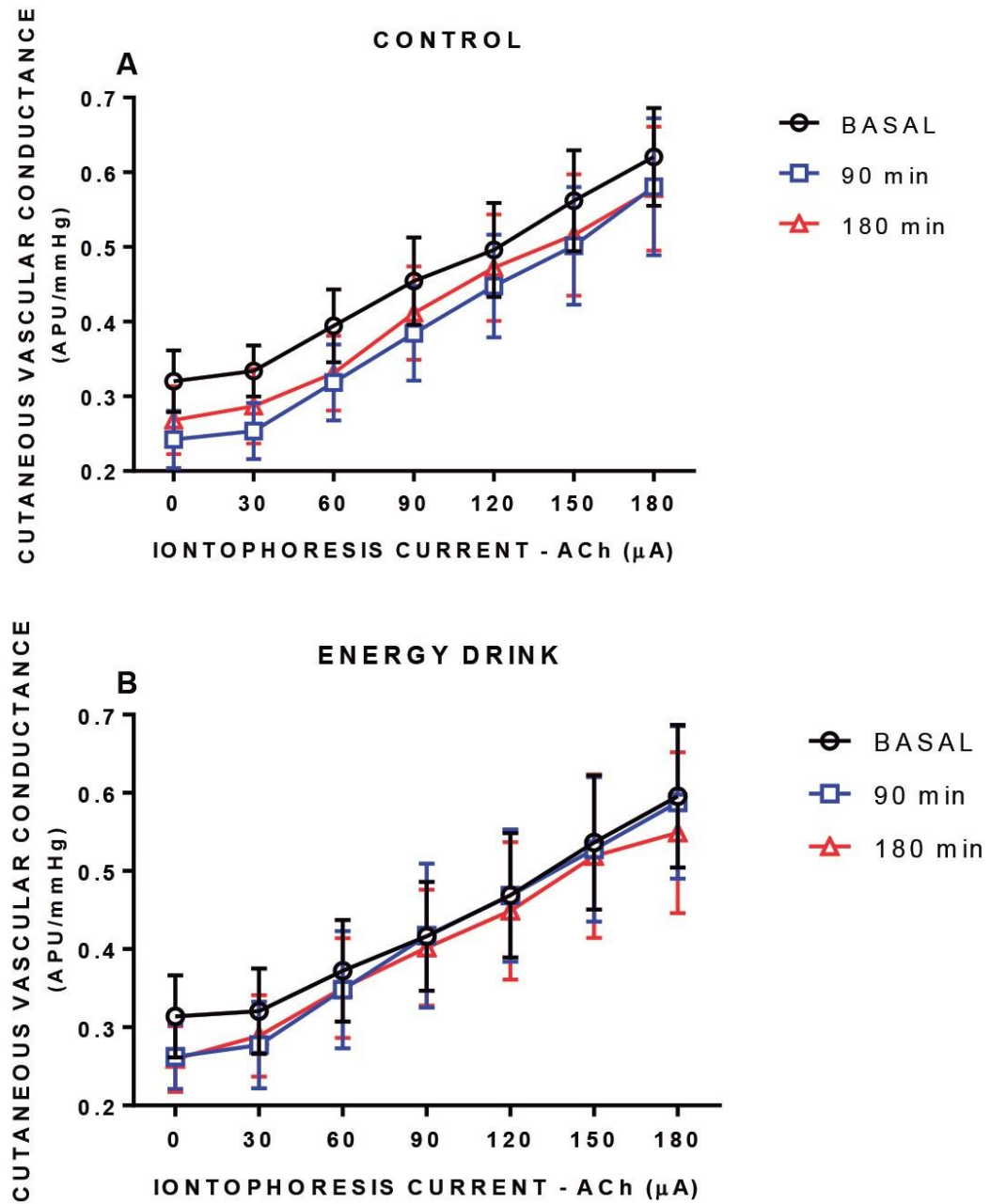
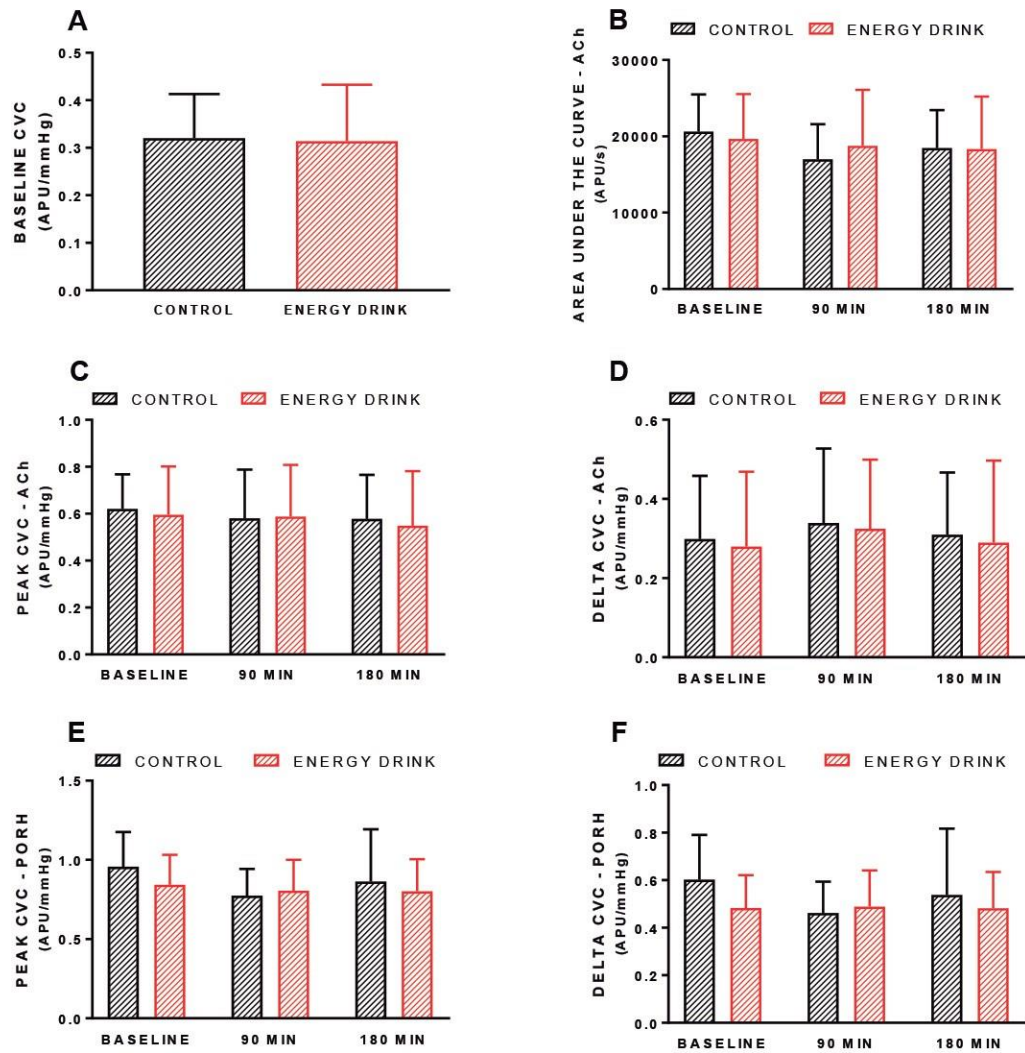
FIGURE 1

FIGURE 2

References

1. McLellan, T.M. and H.R. Lieberman, *Do energy drinks contain active components other than caffeine?* Nutr Rev, 2012. **70**(12): p. 730-44.
2. Vercammen, K.A., J.W. Koma, and S.N. Bleich, *Trends in Energy Drink Consumption Among U.S. Adolescents and Adults, 2003-2016*. Am J Prev Med, 2019. **56**(6): p. 827-833.
3. Nagajothi, N., et al., *Energy drink-related supraventricular tachycardia*. Am J Med, 2008. **121**(4): p. e3-4.
4. Wilson, R.E., et al., *A case of caffeine-induced coronary artery vasospasm of a 17-year-old male*. Cardiovasc Toxicol, 2012. **12**(2): p. 175-9.
5. Scott, M.J., M. El-Hassan, and A.A. Khan, *Myocardial infarction in a young adult following the consumption of a caffeinated energy drink*. BMJ Case Rep, 2011. **2011**.
6. Molnar, J. and J.C. Somberg, *Evaluation of the Effects of Different Energy Drinks and Coffee on Endothelial Function*. Am J Cardiol, 2015. **116**(9): p. 1457-60.
7. Worthley, M.I., et al., *Detrimental effects of energy drink consumption on platelet and endothelial function*. Am J Med, 2010. **123**(2): p. 184-7.
8. Grasser, E.K., et al., *Cardio- and cerebrovascular responses to the energy drink Red Bull in young adults: a randomized cross-over study*. Eur J Nutr, 2014. **53**(7): p. 1561-71.
9. Higgins, J.P., et al., *Energy Drink Effects on Hemodynamics and Endothelial Function in Young Adults*. Cardiology, 2021. **146**(2): p. 258-262.
10. Domsic, R.T., et al., *Endothelial dysfunction is present only in the microvasculature and microcirculation of early diffuse systemic sclerosis patients*. Clin Exp Rheumatol, 2014. **32**(6 Suppl 86): p. S-154-60.
11. Tibirica, E., et al., *Reduced systemic microvascular density and reactivity in individuals with early onset coronary artery disease*. Microvasc Res, 2015. **97**: p. 105-8.
12. Peçanha, D., et al., *Increased systemic endothelial-dependent microvascular reactivity after ingestion of a high-carbohydrate snack in young, healthy volunteers*. Microvasc Res, 2020. **129**: p. 103962.
13. Axtell, A.L., F.A. Gomari, and J.P. Cooke, *Assessing endothelial vasodilator function with the Endo-PAT 2000*. J Vis Exp, 2010(44).
14. Higgins, J.P., *Endothelial function acutely worse after drinking energy beverage*. Int J Cardiol, 2013. **168**(2): p. e47-9.
15. Higgins, J.P., et al., *Consumption of energy beverage is associated with attenuation of arterial endothelial flow-mediated dilatation*. World J Cardiol, 2017. **9**(2): p. 162-166.
16. Dickinson, K.M., P.M. Clifton, and J.B. Keogh, *Endothelial function is impaired after a high-salt meal in healthy subjects*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(3): p. 500-5.
17. Brown, C.M., et al., *Cardiovascular responses to water drinking: does osmolality play a role?* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(6): p. R1687-92.
18. Ince, C., *Hemodynamic coherence and the rationale for monitoring the microcirculation*. Crit Care, 2015. **19** Suppl 3: p. S8.
19. Bakker, J. and C. Ince, *Monitoring coherence between the macro and microcirculation in septic shock*. Curr Opin Crit Care, 2020. **26**(3): p. 267-272.
20. Roustit, M., et al., *Excellent reproducibility of laser speckle contrast imaging to assess skin microvascular reactivity*. Microvasc Res, 2010. **80**(3): p. 505-11.
21. Cracowski, J.L. and M. Roustit, *Current Methods to Assess Human Cutaneous Blood Flow: An Updated Focus on Laser-Based-Techniques*. Microcirculation, 2016. **23**(5): p. 337-44.
22. Cordovil, I., et al., *Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging*. Microvasc Res, 2012. **83**(3): p. 376-9.
23. Tostes, R.C., et al., *Effects of estrogen on the vascular system*. Braz J Med Biol Res, 2003. **36**(9): p. 1143-58.

24. Al-Basher, G.I., et al., *Perinatal exposure to energy drink induces oxidative damage in the liver, kidney and brain, and behavioral alterations in mice offspring*. Biomed Pharmacother, 2018. **102**: p. 798-811.
25. De Sanctis, V., et al., *Caffeinated energy drink consumption among adolescents and potential health consequences associated with their use: a significant public health hazard*. Acta Biomed, 2017. **88**(2): p. 222-231.
26. Trabulo, D., S. Marques, and E. Pedroso, *Caffeinated energy drink intoxication*. BMJ Case Rep, 2011. **2011**.