



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**Aline Barbedo Arouca**

“O efeito do extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus* sobre a performance em ratos adaptados e submetidos a treinamento de corrida em esteira”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Aline Barbedo Arouca  
[Assinatura]  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestra em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse

**CAMPINAS**  
**2012**

---

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Ar67e

Arouca, Aline Barbedo, 1974-

O efeito do extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus* sobre a performance em ratos adaptados e submetidos a treinamento de corrida em esteira / Aline Barbedo Arouca. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Dora Maria Grassi Kassinse.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Acanthopanax senticosus*. 2. Estresse fisiológico. 3. Adipócitos. 4. Teste de esforço. 5. Rato - Exercícios. I. Grassi-Kassinse, Dora Maria, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** The effect of standardized extract of *Eleutherococcus senticosus* on performance in rats adapted and submitted to training of treadmill running

**Palavras-chave em Inglês:**

*Acanthopanax senticosus*

Physiological stress

Adipocytes

Exercise test

Rats - Exercises

**Área de concentração:** Fisiologia

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Dora Maria Grassi Kassinse [Orientador]

Miguel Arcanjo Areas

Carlos Alberto Silva

**Data da defesa:** 06-08-2012

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

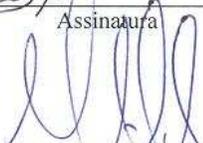
Campinas, 06 de agosto de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

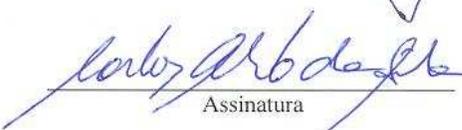
Prof. Dr. Dora Maria Grassi-Kassisse (Orientadora)

  
Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

  
Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Silva

  
Assinatura

Prof. Dr. Armindo Antônio Alves

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## **Viver**

Tempos atrás, você era um anjo que vivia no paraíso. Era mais ou menos como um atleta sentado no banco de reservas querendo participar da partida. De repente, você olhou para o planeta Terra e viu que o jogo estava difícil, o resultado era negativo, e então pediu ao Grande Técnico uma oportunidade para vir a Terra ajudar o time.

Agora você está em campo, disputando a partida da sua vida. Você se lembra do seu objetivo existencial? O Técnico continua dando as orientações, mas será que você as está seguindo?

Dentro de algum tempo, quando voltar ao vestiário e encontrar o Grande Técnico, ele vai lhe perguntar: “Como é que foi? Conseguiu realizar a sua missão?”

Qual será a sua resposta? (...)

**Roberto Shinyashiki**

## Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais maravilhosos Teófilo e Rita, às minhas irmãs Ana Elisa e Voluzinha, minhas sobrinhas Maitê e Liz, e meu sobrinho Pedro.

Aos avós: “Bastião” e “Beni”; e Arouca e Nilce (todos *in memorian*).

À minha madrinha Ana Stela e meu padrinho mais que especial Wagner. Meus tios Zé e Helena.

Aos amigos, pessoas, que contribuíram para que eu conseguisse concluir mais esta etapa! São anjos enviados por Deus, em cada momento da nossa vida!

Ao querido Kristof: seu apoio foi maravilhoso!

## Agradecimentos

Pra mim, esta parte do trabalho é muito especial... Agradeço a todos que contribuem para que minha *missão* seja realizada nesta vida... Pois juntos “chegaremos lá”!

Agradeço primeiramente a Deus, pela *força* e *coragem* que me dá em abundância todos os dias, pela minha *saúde*, pela minha *paz espiritual* e *alegria de viver* que vem de dentro do meu coração... Agradeço a missão que *Ele* escolheu para eu seguir, a qual é muito gratificante pra mim, e a sigo com muito *amor*.

À minha família maravilhosa, que sempre me ensinou os verdadeiros valores da vida... É por vocês que estou nesse caminho... Obrigada pela força, pelo total apoio que sempre me deram! E por compreender, porque muitas vezes eu queria estar com vocês, mas não podia. Saibam que são o meu maior tesouro, meu alicerce... São os eternos amores da minha vida! E um agradecimento especial à minha irmã Ana Elisa... Mana, se não fosse você insistir e acreditar em mim muito mais do que eu mesma, eu não estaria chegando até aqui. Você ajudou a mudar o curso de um rio na minha vida, para que esse rio “chegasse ao mar”. Todo agradecimento é pouco... Então, eu peço para que Deus abençoe toda sua vida, porque só Ele, poderá retribuir tudo que você fez por mim! Só Ele pode retribuir tudo que minha família faz por mim!

Aos meus professores, e incluo aqui todos que foram especiais, desde aqueles da graduação, como o Wilson, Olga, Nino, e da pós-graduação Denise Vaz de Macedo, Valéria Paschoal, Andreia Naves, entre outros, tão especiais! Aos professores que despertaram em mim o desejo de ensinar, como Miguel, Dora, Fernando e Denise.

Mas antes de continuar, preciso contar uma história...

Meu primeiro contato na Unicamp foi com professor Miguel, porque ele ministrou duas aulas de fisiologia pra minha turma no 2º ano de faculdade de Nutrição, na Puc. E então, por sua maneira única de dar aula, de uma forma “apaixonante”, me deixou com muita vontade de me tornar também uma professora. E logo que eu concluí a graduação, eu o procurei na Unicamp para tentar o mestrado. E naquela ocasião eu não estava entendendo

muito bem o propósito do mestrado, e então ele me questionou: “Aline, você quer o mestrado pra quê?” E a minha resposta não o convenceu... Eu simplesmente não soube responder. Então, naquela época eu não estava madura o suficiente, pois o mestrado é algo que requer muita responsabilidade e dedicação. E principalmente, eu coloco aqui também, amor. Eu acredito que em tudo que colocamos amor, nos impulsiona, nos dá energia, e alegria. E então, eu recuei. Eu sabia que ainda não era a hora certa. Deixei o desejo amadurecendo. No meio do caminho, eu fiz uma pós-graduação coordenada pela professora Denise para me especializar em fisiologia do exercício, e foi aí que conheci o meu atual co-orientador Fernando Catanho. Um brilho de professor, Deus deu a ele um dom incrível de ensinar e transmitir seus conhecimentos aos seus alunos. E então a professora Dora foi convidada para dar uma aula neste curso, e assim nos conhecemos.

E depois de 10 anos da minha graduação, olha quem estava batendo na porta novamente! E então, desta vez, eu sabia exatamente o que e por que eu queria o mestrado. E Deus abriu todas as portas que me levassem até o laboratório onde Miguel e Dora estavam... Mas que presente de Deus! O professor Miguel é único! Quem o conhece, e teve aula com ele sabe exatamente o que estou dizendo, que não é nenhum exagero. É uma pessoa maravilhosa, inteligente, com uma facilidade incrível pra ensinar e a gente aprende de verdade! É uma pessoa leve, que todos querem se aproximar!

E falando agora sobre Dora, a minha orientadora... “sem palavras”: só digo que Deus me dá muitos presentes, e ela é um deles na minha vida! É também um exemplo pra mim! Como pessoa, como profissional, e como mãe!!! Tomando um café com os colegas do laboratório, comentei com o prof. Miguel outro dia, sobre o quanto eu era feliz naquele ambiente, cercada de professores e pessoas incríveis, e então ele me explicou que nós somos atraídos pelas afinidades!

Me lembro quando faltavam ainda alguns meses para prestar a prova de ingresso no mestrado, e eu disse à professora Dora que eu queria “me casar com o mestrado”... E Dora respondeu com muita firmeza: “o mestrado é um casamento que deve ter uma data para terminar”... É verdade! E agora estamos caminhando rumo à reta final... Do mestrado! Dora,

que Deus abençoe toda sua vida, saiba que você é muito especial pra mim! Nossa **amizade e laço científico** serão eternos... Todo agradecimento é pouco, por tudo que fez por mim!

E Fernando Catanho, uma pessoa muito querida, assumiu de imediato a co-orientação! Pois toda a parte experimental da minha Pesquisa foi realizada no laboratório de Bioquímica, com a autorização da professora Denise, a qual ama bioquímica! Ela deu total liberdade para eu usar todo o espaço de seu laboratório, sala de treinamento dos ratos, biotério, me deixou assistir várias aulas para minha atualização profissional... Eu agradeço muito a confiança que eles (Fernando e Denise) depositaram em mim! Uma vez, eu estava realizando um grande experimento com uma equipe de cinco pessoas, me lembro que ela adorou aquele movimento em seu laboratório. E não posso deixar de citar aqui uma pessoa muito querida, que me ajudou muito durante o meu mestrado no laboratório de bioquímica... Ana Porto! Providenciou tudo que eu precisava para ter sucesso nos experimentos, e também me deu muita força naqueles dias que nada parecia dar certo...

Bem... falando um pouco dos amigos... eu conheci pessoas mais que especiais!

Marcela... que amiga mais linda! Me ensinou inglês para prestar a prova! Essa mocinha tem um dom maravilhoso pra ensinar! Muitas risadas durante as aulas... Ela teve uma paciência incrível, e sua família inteira teve um carinho enorme comigo!

Minha grande “amiga-irmã” Larissa... “oshxi, Lari-Line!!!” (eu já inventei vários apelidos pra ela: Dju-djuzinha, Dju-dju, Lari-Line, Larislina, Lalili)... Sabe aquela pessoa que quando você está na companhia dela, o dia fica mais feliz? É assim que eu me sinto! Ela tem uma luz especial, e leveza na alma! Eu adoro a companhia da Lari! Tivemos a oportunidade de morar juntas por alguns meses, e inventávamos muitos pratos especiais na cozinha... hummm!! E o café da manhã, então? Depois de comer tudo muito saudável, era a vez do “pão com nutella” e café!!! Bons tempos, irmãzinha Lari!!! E de vez em quando, um vinho pra comemorar a nossa própria existência, conversando sobre diversos assuntos, e muitas gargalhadas!

Ana Gaby... Estudamos praticamente juntas para passar na prova seletiva do mestrado... E tivemos muitos momentos alegres durante o mestrado!!! Adoro a sua amizade!

“Louwis Bronswers Wronsgsters”, meu amigo Luiz Alberto! Muito obrigada por todos os “cafezes”!! Seu café torna um simples momento em um momento único e feliz com os colegas do laboratório!!! Valeu muito mesmo por sua colaboração nos dias dos meus experimentos!!! Também adoro a sua amizade!

Aos colegas do laboratório: “Clodolino” (Clodoaldo), Gustavo (“Gusta”), Gustavo Santos (sempre bem humorado), Helô, Janir... todos, muito especiais! Aliás, o nosso Lab é especial!

Fernanda Peneireiro, sua amizade é muito valiosa pra mim!

Ao meu querido estagiário Gustavo Davanzo (“áááhh cavááálo”)! Nos momentos de maior estresse, esse rapaz conseguia me arrancar muitas gargalhadas... ou era o contrário... Sentirei saudade dos momentos de risos... Saiba que tem um coração lindo e eu torço por você!

Agradecimento especial ao Danilo (“Danilets chiclets”), por ter me ajudado com as análises do tecido adiposo, e por ter nos ensinado as técnicas!

Carol Normand... Simplesmente palavras não caberiam aqui pra agradecer o quanto eu gostaria! Você é incrível! Desejo que Deus abençoe a sua vida! Ensinou-me todas as técnicas que precisei no laboratório de bioquímica do exercício (LABEX)!

À todos os amigos de outros laboratórios: Aline Toneto, Laís Viana, Emiliane! Vocês são muito queridas! Amizade eterna!

À uma pessoa muito especial, que me ensinou a fazer a gavagem nos ratinhos: Rebeca Tomasin! E também me ajudou nos experimentos da SOD e da catalase.

Larissa “Jolie”, obrigada por todo seu apoio... em palavras, em ajuda nos experimentos... Nossa amizade está pra sempre no coração!

Daniela Ortolani... Nossa viagem ao Rio de Janeiro foi muito divertida! Saiba que você me deu muita força antes de eu entrar no mestrado... Nunca me esquecerei!

André Protzec! Me ajudou com os gráficos!!! Sempre muito atencioso e querido!

Fernando Canova; sempre atencioso e envolvido com a organização dos Cursos, os quais são um sucesso, e também o parabenizo por sua iniciativa! Saiba que me ajudou muito nas coisas do meu mestrado!!!

Aos colegas de outros laboratórios: Fernanda, Mirtes, Kell, Flaviane, Lázaro, Rubinho, sempre atenciosos, especialmente o Kell e o Rubinho durante meus experimentos.

Ao Bandeco!!! Claro! Comidinha que me sustentou, e me nutriu!

À Andréia (secretária da coordenação) e profa. Dra. Carmem Ferreira, muito atenciosas comigo!

Ao Ivo, sempre prestativo; aos funcionários da limpeza, sempre me dando um “bom dia feliz”...

Aos grandes amigos de longa data, que estão no coração: Claudinha (nossa amizade será eterna!), Matheus Vieira (irmão de alma), Rosângela e Rodrigo, agradeço muito todo carinho e apoio de vocês!

Aos primos Tati e ao Hélio, por me receberem de braços abertos sempre que precisei durante minha pós-graduação em São Paulo...

Ao amigo Fernando (pai do Dudú)! Me ajudou muito em vários momentos que precisei durante o mestrado!

Ao amigo Leandro Porto, por ter me ajudado a concluir a pós-graduação de Nutrição Clínica Funcional através da nossa parceria de trabalho.

À Luzia, um eterno obrigado por tudo que está fazendo por mim... Deus te ilumine sempre!

À Ana Paula Bulgarelli, minha madrinha de crisma e família! Amo vocês! Obrigada por todo apoio e carinho que sempre me deram!

À Empresa Farmacêutica Gamma Comércio Importação & Exportação Ltda, por ter cedido o *Eleutherococcus senticosus* para minha pesquisa.

À Andrea Perez, a pesquisadora que mais publicou artigos sobre os efeitos do *Panax ginseng* no Brasil! Sempre muito atenciosa, desde o início de tudo! Não tive ainda a oportunidade de conhecê-la pessoalmente, mas certamente nasceu uma grande amizade “científica”!

Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto, que se mostrou desde meu primeiro contato por telefone, um professor muito atencioso, e no decorrer de toda a pesquisa pude contar com ele para compreender os meus resultados e também colaborou com a análise de um importante biomarcador no meu trabalho.

As análises do tecido adiposo e da atividade enzimática antioxidante foram realizadas no laboratório da Profa. Maria Cristina Gomes Marcondes, a qual eu estimo muito!

Às professoras Cristina Vicente e Luciana de Hollanda, sempre atenciosas comigo!

Ao professor Hiroshi, que sempre se mostrou um professor atencioso em me ajudar.

Ao professor René, da Faculdade de Educação Física da Unicamp, que nos ajudou com as análises da performance no software MATLAB.

Aos professores Carlos Silva e Armindo, os quais foram muito atenciosos, e enriqueceram muito o meu trabalho com suas considerações e sugestões até a versão final da Tese! Muito obrigada professores!

Ao Dr. Paulo de Tarso Seixas e Daniel Gomes: gotinhas que me ajudaram em momentos de grandes decisões!

À todos os meus parceiros das trilhas de mountain bike! Momento único e especial, mais esperado da semana! Adoro a companhia, as trilhas, a natureza, o desafio de subir e descer montanhas... Inexplicável a sensação... Aliás, recomendo: andar de bicicleta com os amigos te faz um ser humano muito mais feliz!

Agradeço os meus parceiros de trabalho como Joaquim Germano, Raquel, Veridiana, Dra. Luciana, entre outros, pela oportunidade que me deram, e também aos meus pacientes/clientes, que ao longo do tempo, me ajudaram a ser uma profissional mais interessada e apaixonada pela Nutrição, em busca das “respostas” para ajudá-los a garantir mais “vitalidade” e alegria de viver na vida deles...

À todas aquelas pessoas que estiveram comigo ou passaram pela minha vida algum dia e fizeram parte da minha história, pois tudo que sou hoje é resultado das minhas experiências vividas...

À CAPES pela bolsa de estudo cedida durante os 24 meses de mestrado. Sem este apoio, não haveria condições para realizar esta Pesquisa, uma vez que precisamos de muita dedicação para realizar um trabalho como este.

À todos os ratinhos que morreram pela minha Pesquisa... Sem eles, este trabalho não seria possível. Eles foram especiais pra mim, e acredito que eu também fui pra eles. Eles me respeitaram, e eu os respeitei muito. Nunca tive medo. Aliás, eu tive amor. Amor pela minha Pesquisa. Em tudo, como um todo. Obrigada!

Ao eterno companheiro maravilhoso de todos os momentos: *Jesus Cristo*. É simplesmente tudo pra mim: o *Caminho*, a *Verdade* e a *Vida*... E junto com *Ele*, eu conseguirei concluir a minha missão...

	<b>Página</b>
Resumo	<b>xii</b>
Abstract	<b>xiv</b>
Lista de abreviaturas	<b>xvi</b>
Lista de tabelas	<b>xviii</b>
Lista de figuras	<b>Xix</b>
Introdução	<b>01</b>
Objetivos	<b>10</b>
<i>Geral</i>	<b>10</b>
<i>Específico</i>	<b>10</b>
Materiais e Métodos	<b>11</b>
<i>Animais</i>	<b>11</b>
<i>Grupos</i>	<b>11</b>
<i>Tratamento</i>	<b>13</b>
<i>Suplementação</i>	<b>14</b>
<i>Protocolo de Treinamento de Corrida em Esteira</i>	<b>14</b>
<i>Teste de Performance</i>	<b>15</b>
<i>Cronograma dos Testes de Performance e das Coletas para Análises de Glicemia e Lactatemia</i>	<b>16</b>
<i>Coleta de Sangue, Hemáceas, Tecido Muscular, Hepático e Adiposo</i>	<b>17</b>
<i>Análise de Biomarcadores de Estresse Oxidativo</i>	<b>18</b>
<i>Análise de Biomarcadores de Estresse Metabólico</i>	<b>22</b>
<i>Anestésico</i>	<b>23</b>
<i>Análise Estatística</i>	<b>23</b>
Resultados e Discussão	<b>25</b>
Efeitos Toxicológicos	<b>48</b>
Considerações Nutricionais	<b>48</b>
Conclusões	<b>49</b>
Referências Bibliográficas	<b>50</b>
Anexos	<b>62</b>

## Resumo

O ginseng é um dos suplementos herbais mais populares do mundo. Investigações revelaram que o ginseng e seus produtos relacionados reduzem o processo inflamatório, produzem atividade adaptogênica promovendo a melhora na *performance* em ratos e camundongos. Das diferentes espécies de ginseng, o Siberiano (*Eleutherococcus senticosus*) é o que apresenta menor índice de efeitos colaterais, não produzindo excitação em pacientes, exercendo efeito protetor mais intenso sobre o sistema imune, e não desenvolvendo síndrome semelhante ao estresse, conforme já observado no *Panax ginseng* (ginseng Coreano). Desta forma, propomos neste trabalho, avaliar a eficácia da administração crônica de *Eleutherococcus senticosus* (ginseng Siberiano) sobre a *performance* de ratos adaptados à esteira de corrida 3 x/semana (10 m/minuto, durante 10 minutos) e submetidos a treinamento de corrida (incremento de velocidade e duração do treino até a 4ª semana, e depois mantendo 25 m/minuto, durante 60 minutos/dia até a 8ª semana), aplicando três testes de performance (teste incremental de velocidade sem inclinação) ao longo de 8 semanas de tratamento. Os resultados indicaram que não houve melhora da *performance* dos ratos dos grupos adaptados e corrida no segundo e no terceiro teste (meio e final do tratamento, respectivamente), e a *performance* do grupo corrida só foi maior que a do grupo adaptado quando os ratos foram suplementados com 100 mg/kg de peso/dia de extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus* (ES). O ganho de peso foi semelhante entre os grupos adaptado e corrida, entretanto o tratamento com o ES induziu a um menor ganho de peso dos ratos quando comparados com seus respectivos controles. A ingesta alimentar, por sua vez, foi significativamente menor no grupo Corrida e o tratamento com ES não alterou este resultado. A morfometria dos adipócitos indicou menor área dos adipócitos dos ratos suplementados em relação aos seus controles, sendo significativo no pâncreas epididimal para o grupo Adaptado. Em relação aos biomarcadores de estresse oxidativo, no grupo Corrida Suplementado foi observado uma tendência a menor produção de espécies reativas de oxigênio analisados pela concentração de TBARS plasmático e muscular, porém não estatisticamente diferentes. Quanto aos outros biomarcadores metabólicos (lactato e glicemia plasmáticos, e glicogênio hepático e muscular), e ao perfil lipídico (triacilglicerol e colesterol total plasmáticos), não observamos alterações significativas que demonstrassem a eficácia do tratamento com ginseng no exercício proposto. Especificamente os outros biomarcadores de estresse oxidativo (catalase e superóxido dismutase) não apontaram

aumento significativo na atividade antioxidante enzimática. Concluimos, portanto, que o tratamento com *Eleutherococcus senticosus* na forma de tratamento proposto foi eficiente em melhorar a *performance* no grupo treinado em esteira (Corrida Suplementado).

**Palavras chave:** *Eleutherococcus senticosus* (ginseng Siberiano), *performance*, estresse, adipócitos, corrida em esteira, ratos.

## Abstract

Ginseng is one of the most popular herbal supplements in the world. Investigations revealed that ginseng and its related products reduce inflammation, produce adaptogenic activity promoting improvement in performance in rats and mice. Of different species of ginseng, Siberian (*Eleutherococcus senticosus*) is due to a lower rate of side effects, not producing arousal in patients, exerting stronger protective effect on the immune system, and not developing like syndrome to stress, as observed in *Panax ginseng* (*Korean ginseng*). Thus, we propose in this work was to evaluate the efficacy of chronic administration of *Eleutherococcus senticosus* (Siberian ginseng) on the performance of rats adapted to treadmill running 3 x/week (10 m/min for 10 min) and subjected to running training (increment of speed and duration of the training until the 4th week, and then maintaining 25 m/minute for 60 minutes / day to 8 weeks) by applying three performance tests (Test incremental speed without inclination) over 8 weeks treatment. The results indicated that there was no improvement of the performance of rats in groups adapted and running in the second and third test (middle and end of treatment, respectively) and running performance only group was higher than the group adapted when the rats were treated with 100 mg/kg/day of standardized extract of *Eleutherococcus senticosus* (ES). Weight gain was similar between groups adapted and race, however treatment with ES induced a lower weight gain of rats when compared to their respective controls. The food intake, in turn, was significantly lower in the group racing and ES treatment did not alter this result. The adipocyte morphometry showed the smallest area of adipocytes supplemented rats compared to their controls, with significant difference in panniculus epididymal isolated of Adapted group. Regarding biomarkers of oxidative stress in Race Supplemented group was observed a trend to lower production of reactive oxygen species analyzed by plasma and muscular TBARS concentration, but not statistically different. As for other metabolic biomarkers (plasma lactate and glucose, and liver and muscle glycogen), and lipid profile (total cholesterol and plasma triacylglycerol), we observed no significant changes to demonstrate the efficacy of treatment with ginseng in the proposed exercise. Specifically other biomarkers of oxidative stress (catalase and superoxide dismutase) showed no significant increase in antioxidant enzyme activity. We therefore conclude that

treatment with *Eleutherococcus senticosus* as proposed treatment was effective in improving performance in the group trained on a treadmill (Race Supplemented).

**Keywords:** *Eleutherococcus senticosus* (Siberian ginseng), performance, stress, adipocytes, treadmill running, rats.

## Lista de Abreviaturas

AGL – Ácidos graxos livres

AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina

ATP – Adenosina trifosfato

CAT – Catalase

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

CS – Corrida suplementado

CT – Colesterol total

CYP3A4 - membro da família de enzimas microsossomais do citocromo P450

CYP2D6 – membro da família de enzimas microsossomais do citocromo P450

desoxiHbFe<sup>3+</sup> – desoxi-hemoglobina

ES – *Eleutherococcus senticosus*

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GPX – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

G115 – Extrato padronizado de *Panax ginseng*

HDL – Lipoproteína de alta densidade

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

KRBA – Solução tampão bicarbonato Krebs-Ringer adicionado de albumina

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LH - Hormônio luteinizante

MDA – Malondialdeído

nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal

NOS – Óxido nítrico sintase

oxiHbFe<sup>2+</sup> – oxi-hemoglobina (saturada de oxigênio)

PBS – Solução tampão (phosphate buffer saline)

PCr – Fosfocreatina

PG – *Panax ginseng*

PQQ – Pyrroloquinoline quinone

Rb2 – ginsenosídeo panaxadiol

RER – Quociente respiratório (taxa de troca respiratória)

RPE - Taxa de esforço percebido

SS - Adaptado suplementado

SOD – Superóxido dismutase

SOD1 – Superóxido dismutase Cu<sup>+</sup>/Zn<sup>+</sup> dependente

SOD2 - Superóxido dismutase Mn<sup>+</sup> dependente

SOD3 - Superóxido dismutase Cu<sup>+</sup>/Zn<sup>+</sup> dependente

TP – Teste de Performance

TEP – Tetraetoxipropano

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

VE – Ventilação

V<sub>E</sub> - Volume expiratório

VE<sub>max</sub>- Volume expiratório máximo

VO<sub>2</sub> - Captação de oxigênio

VO<sub>2máx</sub> - Máxima captação de oxigênio

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1.** Descrição da manipulação dos animais de acordo com a idade em semanas. **13**

**Tabela 2.** Tabela demonstrativa do protocolo de treinamento de corrida em esteira **15**  
durante oito semanas.

## Lista de Figuras

- Figura 1:** *Panax ginseng* (A) planta inteira e (B) raiz (disponível em: [http://www.jadeinstitute.com/jade/herbal-detail-page.php?show=88&order=common\\_name;](http://www.jadeinstitute.com/jade/herbal-detail-page.php?show=88&order=common_name;) <http://www.kcweb.com/herb/ginseng.htm>) 4
- Figura 2:** *Eleutherococcus senticosus* (A) planta e (B) raiz (disponível em: [http://images/uploaded/eleuterokokas.jpg;](http://images/uploaded/eleuterokokas.jpg) [http://www.theherbdepot.com/standard/eleuthero-root\\_eleuthero-root\\_1124.html](http://www.theherbdepot.com/standard/eleuthero-root_eleuthero-root_1124.html)) 4
- Figura 3.** Estrutura química dos ginsenosídeos, presentes no *Panax ginseng*. Existem dois grupos maiores: panaxadiol (A) e panaxatriol (B). Rh3, como mostrado na parte de baixo de (A), difere a partir de outro panaxadiol ao lado da cadeia. Ginsenosídeo Ro, como uma saponina não esteroideal é mostrado em (C). (ATELLE et al., 1999). 6
- Figura 4.** Estrutura química dos eleutherosídeos B e E, presentes no *Eleutherococcus senticosus* (FENG et al., 2005). 7
- Figura 5.** Curva padrão em diferentes concentrações de TEP no plasma. 19
- Figura 6.** Curva padrão em diferentes concentrações de TEP no homogenato (gastrocnêmio vermelho). 20
- Figura 7.** Evolução da *performance* ao longo do tratamento entre os testes 1, 2 e 3 observadas entre os animais de um mesmo grupo. 25
- Figura 8.** Análise de *performance* entre os grupos nos Testes 1 (a), 2 (b) e 3 (c). 27
- Figura 9.** Dados de *performance*, em todos os momentos juntos. 28
- Figura 10.** Lactatemia (mmol/L) avaliada “logo após” (relacionado à produção) e “5 minutos após” (relacionado à remoção) os términos dos testes de *performance* (TP) 1 e 3 em todos os grupos: Adaptado (a), Adaptado Suplementado (b), Corrida (c) e Corrida Suplementado (d). 31
- Figura 11.** Glicemia (mg/dL) avaliada antes (basal) e logo após os Testes de *Performance* 1 e 3 em todos os grupos: Adaptado (a), Adaptado Suplementado (b), Corrida (c) e Corrida Suplementado (d). 33
- Figura 12.** Peso (gramas) dos ratos no início (a) e ao final (b) dos diferentes tipos de tratamento. 35
- Figura 13.** Ganho de peso (gramas) dos ratos ao longo dos diferentes tipos de 36

tratamento.

- Figura 14.** Quantidade de ração padrão (gramas/ dia/ rato) ingerida pelos ratos submetidos aos diferentes protocolos de tratamento. **36**
- Figura 15.** Medidas de área (a) e diâmetro (b) dos adipócitos isolados dos panículos adiposos epididimais, mesentéricos e peri-renais de ratos submetidos aos diferentes protocolos de tratamento. **38**
- Figura 16.** Concentração plasmática de glicose realizada antes da eutanásia. **40**
- Figura 17.** Análises de concentração do glicogênio hepático (a), gastrocnêmio branco (b) e sóleo (c). **41**
- Figura 18.** Concentração plasmática de triacilglicerol (a) e colesterol total (b) analisados em todos os grupos antes da eutanásia. **43**
- Figura 19.** Concentração plasmática de TBARS. **45**
- Figura 20.** Concentração de TBARS no músculo gastrocnêmio vermelho. **45**
- Figura 21.** Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) no músculo gastrocnêmio vermelho. **45**
- Figura 22.** Atividade da enzima antioxidante catalase no eritrócito, analisada em todos os grupos. **46**

## Introdução

A prática de atividade física vem crescendo como resultado do incentivo de especialistas objetivando a saúde e a qualidade de vida (MARQUES, 2007). Muitos artigos científicos apresentam a atividade física como prática regular e adequada para promoção da saúde e para prevenção de muitas doenças cardíacas e metabólicas, e as revistas de circulação popular e programas de televisão também buscam esclarecer e divulgar estas informações. Entretanto, a prática da atividade física deve ser executada de maneira adequada para se evitar exageros e, conseqüentemente, lesões (MARQUES, 2007).

Os estudos com atletas objetivam esclarecer os limites do corpo humano como também a constante melhora da *performance* na atividade física. Existem vários artigos em revistas indexadas tentando esclarecer os limites do corpo (artigos relacionados com as palavras chave: *exercise performance* e *athletic performance*; PubMed).

No tocante a *performance*, a utilização de suplementos alimentares vem crescendo de maneira exponencial e nem sempre acompanhada de estudos adequados validando a real eficácia dos diferentes tratamentos (CARVALHO, 2003).

Burke & Read (1993), propuseram um sistema de classificação que separa os suplementos nutricionais em duas grandes categorias: suplementos alimentares e suplementos com auxílio ergogênico. O suplemento alimentar é caracterizado como um produto que pode ser usado para resolver problemas fisiológicos ou nutricionais resultantes do desporto. Pode fornecer um meio conveniente ou prático do consumo de requisitos especiais de nutrientes para o exercício, ou pode ser usado para prevenir/inverter deficiências nutricionais que ocorrem geralmente entre os atletas. O suplemento com auxílio ergogênico por muitas vezes é utilizado para atingir um objetivo fisiológico/nutricional melhorando o desempenho esportivo, fornecendo substâncias que não fariam parte da demanda nutricional, alterando processos metabólicos e genéticos (BURKE & READ, 1993).

Atualmente existe uma imensa variedade de suplementos com auxílio ergogênico para a melhora da *performance*, que podem conter um ou mais dos itens a seguir em sua formulação: carboidratos, proteínas, aminoácidos, compostos de aminoácidos, metabólitos provenientes de aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, minerais (CARVALHO, 2003) e, também, podem estar associados com fitoterápicos ou outros compostos químicos. São

inúmeras categorias de suplementos alimentares que prometem a melhora do rendimento esportivo, e mais de 200 tipos de suplementos disponíveis no mercado (<http://www.revistasuplementacao.com.br/?mode=materia&id=371>) para esta finalidade.

Infelizmente, muitas promessas de resultados feitas pelos fabricantes, geralmente, não possuem qualquer respaldo científico ou são embasadas em pesquisas encomendadas pelos fabricantes dos suplementos comercializados, sem a adequada supervisão e regulamentação podendo, ainda, conter substâncias proibidas a fim de maximizar os efeitos dos outros componentes presentes na formulação. Tal fato foi demonstrado em um estudo financiado pelo COI (Comitê Olímpico Internacional), mostrando que de 634 suplementos analisados pelo Laboratório Antidoping de Colônia, provenientes de 215 fornecedores de 13 países, 94 deles (14,8%) continham precursores de hormônios não declarados em seus rótulos e que poderiam gerar casos positivos para doping (CARVALHO, 2003).

Com este conhecimento nos propusemos a avaliar a eficácia do tratamento de um suplemento alimentar com auxílio ergogênico na *performance* de ratos. Este trabalho está relacionado à nutrição e esporte, e busca enriquecer os conhecimentos na área principalmente ligada a suplementação.

O laboratório de estudos do estresse (Labeest) há alguns anos vem estudando a atividade física como agente estressor avaliando as respostas metabólicas, vasculares e endócrinas de ratos submetidos a diferentes modelos de natação e comparando a estressores como choque nas patas e a ingestão de dieta hiperlipídica (FARIAS-SILVA et al., 1999; VERAGO et al., 2001; FARIAS-SILVA et al., 2002; BARROS, 2003; MOREIRA 2005; ESTRELA 2007; MARTINELLI, 2009). Entretanto, sempre utilizamos o modelo de natação com protocolos apresentando variações na duração e/ou frequência da atividade, bem como na temperatura da água (SAMPAIO-BARROS et al., 2003; MOREIRA 2005; HATORE 2006; ESTRELA 2007; MARTINELLI, 2009).

Neste trabalho, escolhemos o protocolo de treinamento de corrida em esteira sem inclinação, por apresentar facilidade em relação à mensuração da intensidade do esforço (controlado pela velocidade), nos permitindo quantificar a *performance* do animal de maneira independente da variação da sua massa (peso do rato) (GOBATTO, 2008; HOHL et al., 2009).

## ***Eleutherococcus senticosus* – ginseng Siberiano**

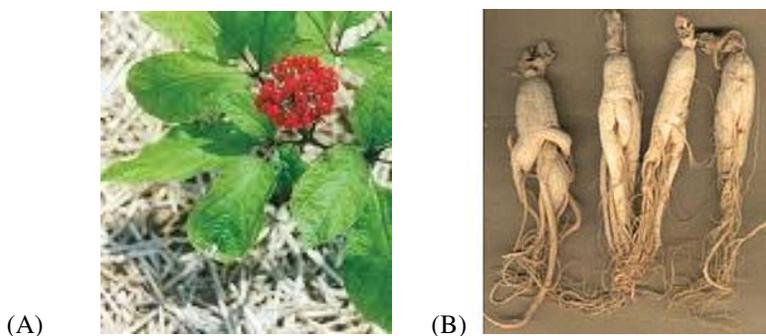
### ***Histórico e identificação***

O ginseng é um dos suplementos herbais mais populares do mundo (BAHRKE et al., 2009). Existem várias espécies conhecidas de ginseng: Americano, Chinês, Coreano, Japonês e Siberiano (BAHRKE & MORGAN, 2000). Três espécies são atualmente as mais estudadas: *Panax ginseng* C.A. Meyer (ginseng Chinês ou Coreano, uma erva indígena das florestas montanhosas da Ásia oriental); *Panax japonicus* C.A. Meyer (ginseng Japonês, encontrado na Índia, no sul da China e Japão); *Panax quinquefolius* (ginseng Americano, encontrado em florestas da região centro-oeste e central dos Estados Unidos e Canadá) (BAHRKE & MORGAN, 2000).

As raízes da planta são conhecidas e utilizadas há mais de 5000 anos no Oriente. Referenciada pela primeira vez na Dinastia Han, a planta iria ser conhecida mais tarde como Jen Sheng, a raiz celestial, ou Ginseng, que possui forma semelhante à de uma figura humana (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ginseng>).

Ginseng Siberiano ou russo, *Eleutherococcus senticosus*, pertence à família da planta *Araliaceae*, assim como outros tipos de ginseng, termo genérico dado a todas as espécies de *Panax*. O *Eleutherococcus senticosus* também é mundialmente conhecido como *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.), levando este nome em consideração aos seus descobridores, os dois botânicos russos Carl Johann Maximowicz e Franz Josef Ruprecht. Carl Johann Maximowicz descreveu e nomeou mais de 2.300 plantas que antes eram desconhecidas para a ciência, e o *Eleutherococcus senticosus* foi uma delas, e está descrito no The International Plant Names Index 2005 (<http://www.ipni.org>) ([http://en.wikipedia.org/wiki/Eleutherococcus\\_senticosus](http://en.wikipedia.org/wiki/Eleutherococcus_senticosus)).

Apesar de o *Eleutherococcus senticosus* pertencer a esta mesma família e possuir efeito tônico e estimulante como outros tipos de ginseng, ele é uma planta de aparência totalmente diferente (GOULET & DIONNE, 2005). O ginseng Siberiano apresenta uma coloração preta, diferente da vermelha apresentada pelo fruto do *Panax* (Figura 1), e o arbusto pode chegar a dois metros de altura (Figura 2) (BOON & SMITH, 1999).



**Figura 1:** *Panax ginseng* (A) planta inteira e (B) raiz (disponível em: [http://www.jadeinstitute.com/jade/herbal-detail-page.php?show=88&order=common\\_name](http://www.jadeinstitute.com/jade/herbal-detail-page.php?show=88&order=common_name); <http://www.kcweb.com/herb/ginseng.htm>)



**Figura 2:** *Eleutherococcus senticosus* (A) planta e (B) raiz (disponível em: <https://images/uploaded/eleuterokokas.jpg>; [http://www.theherbdepot.com/standard/eleuthero-root\\_eleuthero-root\\_1124.html](http://www.theherbdepot.com/standard/eleuthero-root_eleuthero-root_1124.html))

*Panax ginseng* é uma planta considerada medicinal, amplamente utilizada na medicina popular e tradicional para efeitos no sistema cardiovascular, imunológico, nervoso e endócrino. Sua composição química tem sido investigada e seus ginsenosídeos presentes são conhecidos por exercerem vários efeitos terapêuticos. Durante muito tempo, seu uso foi empírico (em acreditar que é uma panacéia que promove longevidade), com efeitos benéficos como um suplemento dietético para o tratamento de fadiga (ATTELE et al., 1999).

Os principais constituintes ativos das espécies *Panax* são reconhecidos por serem glicosídeos triterpenóides ou saponinas, denominado ginsenosídeos por pesquisadores japoneses e panaxosídeos por pesquisadores russos, cuja estrutura e distribuição variam com as espécies. As saponinas do *Panax* têm sido bem investigadas, e no mínimo 13 saponinas foram isoladas a partir de extrato de raiz de *Panax* através de métodos de cromatografia, utilizado para detectar e diferenciar estas saponinas. As principais saponinas do *Panax ginseng*

são nomeadas como Rx, onde “x” corresponde à: a, b1, b2, c, d, e, f, g1, g2, g3, h1, h2 ou o (Figura 3) (BAHRKE et al., 2009). A maioria das ações farmacológicas do *Panax* é atribuída aos ginsenosídeos (ATELLE et al., 1999), e cada saponina possui uma ação farmacológica própria (BAHRKE & MORGAN, 2000).

Devido ao fato do *Panax ginseng* ser muito dispendioso para ser utilizado como fonte de matéria prima em produtos farmacêuticos (BAHRKE et al., 2009; BAHKKE & MORGAN, 2000) um grupo de pesquisadores russos identificou o *Eleutherococcus senticosus* ao final de 1950, tornando-se uma nova planta medicinal, também conhecida como ginseng Siberiano ou Russo, Ciwujia, eleuthero, eleuthero ginseng, *Acanthopanax senticosus*, não-me-toque ou arbusto do diabo (BAHRKE et al., 2009; ESCHBACH et al., 2000).

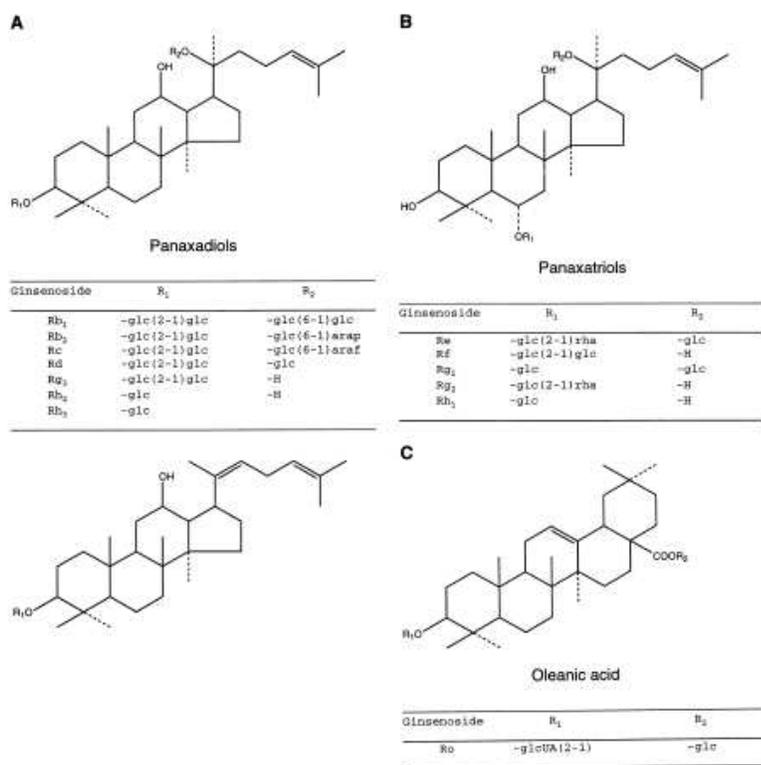
Revisando o uso medicinal de ginseng e plantas relacionadas da união Soviética, Baranov (1982) concluiu que a administração crônica de ginseng Siberiano é vantajosa em relação ao *Panax ginseng*, pois apresenta menor índice de efeitos colaterais; isto é, o ginseng Siberiano não produz excitação em pacientes, tem efeito protetor mais intenso sobre o sistema imune, e não desenvolve síndrome semelhante ao estresse.

Existem relatos descrevendo a utilização do ginseng Siberiano pelos chineses há 2000 anos como remédio medicinal para o tratamento de infecções, da fadiga e pela melhora da resistência imunológica (SZLOMICKI et al., 2000) e recentemente foi incluído na Farmacopéia Européia como medicamento derivado de plantas sendo, portanto apto para utilização em medicamentos tradicionais a base de plantas e associações da mesma (Jornal Oficial da União Européia, JO L 328 de 6.12.2008, p. 42). O regulamento de 1994 (DSHEA) para suplementos dietéticos para a saúde e educação permite a comercialização direta do *Eleutherococcus senticosus* (ES) como suplemento para o consumo nos Estados Unidos. Ambas, segurança e eficácia do suplemento de ES foram avaliadas sobre as atividades do CYP2D6 do citocromo P450 e do CYP3A4 (BROSEN, 1996), sugerindo que o extrato de ES na dose como normalmente é recomendada, não afeta as vias do metabolismo do CYP2D6 ou CYP3A4, e, portanto não oferece risco à saúde do indivíduo (DONOVAN et al., 2003). Com base na autorização do ES como um suplemento dietético, muitos produtos a base de ES foram surgindo no mercado (YAN-LIN, 2011).

Embora o extrato de *Eleutherococcus senticosus* possa conter várias substâncias incluindo vitaminas, minerais, celulose e etanol, as substâncias responsáveis em induzir várias

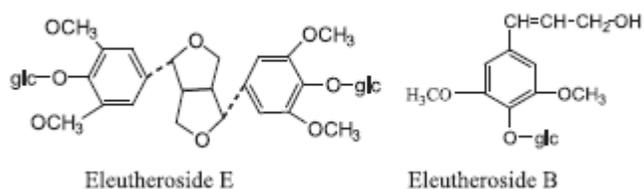
respostas fisiológicas são os eleutherosídeos (presentes na raiz) e os ciwujianosídeos (presentes na folha) (GOULET & DIONNE, 2005).

Inicialmente os eleutherosídeos foram codificados de A a F (ELYAKOV et al., 1964). Hikino et al., (1986), estudou sete eleutherosídeos de ginseng Siberiano codificados em A, B, C, D, E, F e G, e através da hidrólise ácida destes constituintes, obtiveram a formação de glicosídeos, tais como ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose e glicose. Com base em numerosos trabalhos, Wagner et al. (1994) classificou os componentes do *Eleutherococcus senticosus* como sendo compostos fenilpropanos, lignanas, cumarinas, polissacarídeos e outros compostos, como ácido oleanólico, óleos aromáticos e açúcar (SZLOMICKI et al., 2000). A estrutura química dos principais eleutherosídeos (B e E, GAFFEY et al, 2001) é completamente diferente daquela dos ginsenosídeos (ATELLE et al., 1999; BAHRKE et al, 2009; BAHRKE & MORGAN, 2000).



**Figura 3.** Estrutura química dos ginsenosídeos, presentes no *Panax ginseng*. Existem dois grupos maiores: panaxadiol (A) e panaxatriol (B). Rh3, como mostrado na parte de baixo de

(A), difere a partir de outro panaxadiol ao lado da cadeia. Ginsenosídeo Ro, como uma saponina não esteroidal é mostrado em (C). (ATELLE et al., 1999).



**Figura 4.** Estrutura química dos eleutherosídeos B e E, presentes no *Eleutherococcus senticosus* (FENG et al., 2005).

O extrato de *Eleutherococcus senticosus* é padronizado em 0,6 a 0,8% de eleutherosídeos presentes, dependendo do método de extração do extrato seco (APERS et al., 2005). Os eleutherosídeos presentes no extrato padronizado que utilizamos foram B e E (Figura 4) conforme proposto por Yat et al., 1998, sendo que os componentes restantes que completam a formação, são os constituintes descritos por Wagner et al., 1994.

Infelizmente não há nenhum dado sobre as quantidades de uma determinada classe desses compostos secundários que uma espécie pode produzir. Estes compostos incluem, mas não estão limitados a fenilpropanóides (siringina, ácido caféico, álcool sinapil, aldeídoconiferílico), lignanas (sesamina, siringoresinol e seu glicosídeo), saponinas (daucosterol,  $\beta$ -sitosterol, hederasaponina B), cumarinas (isofraxidina e seu glicosídeo) e vitaminas E e betacaroteno (DAVYDOV & KRIKORIAN, 2000).

*Eleutherococcus* não sintetizam somente lignanas como siringina, siringoresinol e sesamina, mas também faz e acumula precursores de lignanas tais como ácido caféico-hidroxicinâmico e outros compostos intermediários como coniferilaldeído. Estes precursores têm demonstrado possuir significativa atividade antioxidante (DAVYDOV & KRIKORIAN, 2000).

Os ginsenosídeos do *Panax ginseng* pertencem ao um mesmo grupo de substâncias químicas, mas quanto aos eleutherosídeos, Wagner (1980), na tentativa de trazer uma ordem à estes compostos químicos, os dividiu em duas classes: 1. Saponinas triterpênicas, que são glicosídeos de ácido oleanóico (referido como eleutherosídeos I, K, L e M); e 2. Derivados

fenilpropano (eleutherosídeos B, B1, D e E), que na maioria são glicosilados (DAVYDOV & KRIKORIAN, 2000). Seis compostos secundários encontrados em *Eleutherococcus* têm demonstrado efeitos antioxidantes (tais como siringina, ácido caféico, ácido caféico etílico aldeído, coniferil aldeído), quatro demonstraram ter efeitos antioxidantes no câncer (sesamina,  $\beta$ -sitosterol, isofraxidina), três têm demonstrado atividades hipocolesterolêmicas (sesamina,  $\beta$ -sitosterol, e  $\beta$ -sitosterol 3-D-glicosídeo), duas têm demonstrado atividade imunoestimulatória (sesamina e siringina), uma possui atividade colerética (isofraxidina), uma possui capacidade de diminuir níveis de insulina ( $\beta$ -sitosterol e seu glicosídeo), pelo menos uma (siringina) demonstrou propriedade radioprotetora, uma demonstrou atividade anti-inflamatória e anti-pirética ( $\beta$ -sitosterol) e ainda um outro demonstrou atividade como agente antibacteriano (ácido caféico) (DAVYDOV & KRIKORIAN, 2000).

Os compostos sesamina,  $\beta$ -sitosterol e seu glicosídeo  $\beta$ -sitosterol  $\beta$ -D-glucopiranosídeo possuem atividade hipocolesterolêmica, a qual pode ser explicada pela participação deles nas reações antioxidantes sobre a LDL (lipoproteína de baixa densidade), e também, a sesamina possui um efeito direto sobre a síntese do colesterol “*de novo*”. O  $\beta$ -sitosterol também possui importante efeito sobre a estrutura do colesterol, reduzindo a sua absorção (como demonstrado em humanos) e diminuindo os níveis de insulina, além de efeito anti-câncer. A ação anti-hiperglicemiante do  $\beta$ -sitosterol e de seu glicosídeo pode ser explicada pela inibição competitiva enzimática na quebra da glicose, mas não acabam as possibilidades para esta propriedade (DAVYDOV & KRIKORIAN, 2000).

### **Efeitos do ginseng**

Estudos prévios têm documentado os efeitos positivos do ginseng sobre o comportamento, exercício e desempenho psicomotor, além da melhora na resposta ao estresse em animais. Estas investigações revelaram que o ginseng e seus produtos relacionados podem reduzir processo inflamatório no músculo esquelético após exercício exaustivo, ou seja, diminuição das concentrações de proteína carbonilada, de nitrato e de NO (CABRAL DE OLIVEIRA et al., 2005), produzir atividade adaptogênica, anti-estresse, e aumentar a *performance* em ratos e camundongos (BAHRKE & MORGAN, 2000; BAHRKE et al., 2009).

Nesse contexto, e devido à pesquisa escassa acerca dos efeitos da utilização do extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus* (GOULET & DIONNE, 2005), propomos sua utilização sobre biomarcadores de estresse oxidativo, estresse metabólico, perfil lipídico, glicemia e análise morfométrica em adipócitos isolados das regiões epididimal, mesentérica e peri-renal, utilizando protocolo de treinamento físico.

## **Biomarcadores**

Para o estudo de biomarcadores do estresse oxidativo (ALESSIO & GOLDFARB, 1988; YU, 1994; ANDRADE et al., 1998; CLANTON, 1999; FINAUD et al., 2006) foram quantificadas substâncias relacionadas ao ataque oxidativo, ou seja, a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, que foram analisadas tanto no plasma como no tecido muscular dos ratos (TBARS; YAGI 1976; OHKAWA et al., 1979; HALLIWELL et al., 1999), a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD; TANG et al., 2002), que foi quantificada no tecido muscular, e a atividade da enzima antioxidante catalase, que foi quantificada nos eritrócitos (CAT: COHEN et al., 1970).

Para investigar a intensidade do esforço e a caracterização metabólica nos testes de *performance* quantificamos o lactato no sangue fresco (DONOVAN & BROOKS, 1983; ROBERGS, 2001; BROOKS, 1985), e para as análises das concentrações do substrato energético, quantificamos o glicogênio tanto no tecido muscular como no hepático (HASSID & ABRAHAM, 1957, GOBETTO, 1993; ESCHBACK et al., 2000; HATORE, 2006).

Para verificar possíveis alterações no perfil lipídico e glicêmico dos ratos treinados ou não e submetidos à administração crônica de extrato de ginseng Siberiano foram avaliadas as concentrações séricas de triacilgliceróis, colesterol total e de lipoproteínas (BELMONTE & AOKI, 2005; SPRIET & WATT 2003; JEUKENDRUP 2002; HOROWITZ & KLEIN 2000; PITANGA, 2001; HARDMAN, 1998; JEUKENDRUP et al., 1998; MARTIN 1996; BERG et al., 1994), e da glicose (KUO et al., 2010; MARZZOCO & TORRES, 2007; ESCHBACH et al., 2000).

Como estudos com atividade física relatam alteração no peso corporal dos animais, neste estudo também avaliamos o peso corporal dos ratos ao longo dos tratamentos bem como realizamos análises morfométricas nos adipócitos isolados dos diferentes depósitos de gordura, já que o adipócito é uma célula que armazena lipídeos na forma de triacilglicerol

(TAG), podendo alterar acentuadamente seu tamanho (área e diâmetro) conforme a quantidade de TAG acumulado em seu interior (COSTA, 2010).

Não há relatos na literatura relacionados à avaliação da eficácia da administração crônica de *Eleutherococcus senticosus* (ginseng Siberiano) sobre a *performance* em ratos com protocolo de treinamento em esteira de corrida, investigando os biomarcadores propostos neste trabalho.

## **Objetivos**

### ***Geral***

Investigar a eficácia do tratamento com extrato de *Eleutherococcus senticosus* (ginseng Siberiano) ao longo de 8 semanas sobre a *performance* de ratos treinados ou não em esteira de corrida.

### ***Específico***

Investigar os efeitos do extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus* (ginseng Siberiano) sobre a *performance* em ratos adaptados e submetidos a um protocolo de treinamento de corrida em esteira ao longo de 8 semanas sobre os seguintes parâmetros bioquímicos:

- produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- atividade das enzimas de defesa antioxidante catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD);
- lactatemia;
- quantificação de glicogênio muscular e hepático;
- perfil lipídico - triacilgliceróis (TAG) e colesterol total (CT);
- glicemia;
- análise morfométrica de adipócitos isolados das regiões epididimal, peri-renal e mesentérica.

## **Materiais e Métodos**

### ***Animais:***

Ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com 3 semanas de idade e peso  $51,62 \pm 1,41$  gramas, foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP por três semanas para adaptação ao biotério e mais duas semanas para adaptação à esteira de corrida antes do início dos ensaios (Hohl et al., 2009). Os animais foram mantidos em ambiente com a temperatura controlada entre 18 e 22°C e fotoperíodo de 12 horas com ciclo claro-escuro *invertido*. Durante os experimentos, os ratos foram tratados de acordo com as normas descritas por Olfert et al., (1993) para uso de animais para Pesquisa e Educação. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Unicamp – nº 2332-1, anexo 1). Durante as oito semanas do protocolo experimental foram realizados controle de peso corporal e de consumo de ração, três vezes por semana, no período entre 09h00 – 10h00.

### ***Grupos:***

Os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas (três animais por gaiola), alimentados com ração padrão para laboratório contendo 4 % de gordura e 0% de colesterol, marca Labina-Purina, Brasil, e água *ad libitum*. Trinta e dois ratos fizeram parte da pesquisa, sendo divididos da seguinte maneira:

- **Adaptado (A, n=6)**: os animais realizaram adaptação à esteira, e durante as oito semanas de tratamento, foram submetidos à esteira de corrida três vezes por semana, durante 10 minutos a uma velocidade de 10m/min (como preparação para realizar os Testes de Performance), foram submetidos à gavagem gástrica com solução salina (0,9%) durante todo o tratamento, realizaram os Testes de Performance, e foram sacrificados ao final (17 semanas de idade, n=6) do protocolo experimental;

- **Adaptado Suplementado (AS, n=6)**: os animais realizaram adaptação à esteira, e durante as oito semanas de tratamento, foram submetidos à esteira de corrida três vezes por semana, durante 10 minutos a uma velocidade de 10m/min (como preparação para realizar os Testes de Performance); realizaram os Testes de Performance; foram submetidos à gavagem gástrica de solução salina (0,9%) com extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus*

(ginseng Siberiano) durante todo o tratamento, e foram sacrificados ao final (17 semanas de idade, n=6) do protocolo experimental;

- **Corrida (C, n=6)**: os animais realizaram adaptação à esteira, foram submetidos à gavagem gástrica com solução salina (0,9%), foram submetidos ao protocolo de treinamento de corrida em esteira durante oito semanas, e somente 4 animais foram sacrificados ao final (17 semanas de idade), pois ocorreu perda amostral de dois animais antes do término do período experimental;

- **Corrida Suplementado (CS, n=6)**: os animais realizaram adaptação à esteira, foram submetidos ao protocolo de treinamento de corrida em esteira durante oito semanas, realizaram os Testes de Performance, foram submetidos à gavagem gástrica de solução salina (0,9%) com extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus* (ginseng Siberiano) durante todo o tratamento e foram sacrificados ao final (17 semanas de idade, n=6) do protocolo experimental.

Considerando que as variáveis: adaptação em esteira e a gavagem diária poderiam ser fenômenos estressantes aos ratos o que poderia comprometer a interpretação dos resultados, foram incluídos dois sub-grupos de ratos para avaliar as possíveis alterações nos indicadores. Sendo assim tivemos também grupo Controle (C, n=6) – definido como tal, ou seja, os animais não foram submetidos a procedimentos experimentais, e alguns ratos foram sacrificados no início (com 9 semanas de idade, n=2), no meio (com 13 semanas de idade, n=2) e ao final (com 17 semanas de idade, n=2) do período experimental; e um segundo grupo denominado Gavagem (G, n=4): onde os animais foram submetidos somente à gavagem gástrica com solução salina (0,9%) durante as oito semanas de tratamento, e alguns ratos foram sacrificados no meio do tratamento (13 semanas de idade, n=2) e ao final do tratamento (com 17 semanas de idade, n=2). Os parâmetros avaliados nestes grupos não foram alterados assim pudemos confirmar que os procedimentos realizados (adaptação e a gavagem) não caracterizaram como eventos estressantes não interferindo desta forma na interpretação dos resultados. Os resultados obtidos não foram incluídos na versão final da tese, e estão disponíveis para assessores ou referees de revistas caso venham a ser questionados.

**Tratamento:**

Após 3 semanas de adaptação ao Biotério com ciclo claro/escuro invertido, os animais dos grupos Adaptado (A), Adaptado Suplementado (AS), Corrida (C) e Corrida Suplementado (CS) fizeram adaptação à esteira de corrida com choque durante 15 dias (10 minutos/dia, em velocidade de 12 m/minuto, Hohl et al., 2009). Após esta adaptação, os animais realizaram o primeiro teste de *performance* (protocolo experimental de incremento de velocidade, vide Teste de Performance). E a partir deste momento os animais dos grupos A e AS foram submetidos à esteira de corrida 3 x/semana por 10 minutos em velocidade de 10 m/minuto, enquanto os animais dos grupos C e CS foram submetidos ao treinamento de corrida (vide protocolo de treinamento de corrida em esteira) até o final do tratamento. Os grupos (A, AS, C e CS) foram submetidos a mais dois testes de *performance*, sendo um logo após a quarta semana (que corresponde a metade do período de tratamento), e o outro logo após a oitava semana de tratamento (final).

Ao final do período experimental eles foram sacrificados para obtenção das amostras de sangue, tecido muscular e hepático (para as análises dos biomarcadores investigados no projeto) e tecido adiposo (para análise morfométrica de adipócitos isolados).

Período de Adaptação		Protocolo Experimental (tratamento: 8 semanas)			Após Protocolo Experimental
3 <sup>a</sup> a 6 <sup>a</sup> semana de idade	7 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semana de idade	9 <sup>a</sup> semana de idade (primeira semana de tratamento)	13 <sup>a</sup> semana de idade (após concluir a 4 <sup>a</sup> sem de tratamento)	17 <sup>a</sup> semana de idade (72h após concluir a última sessão de esteira)	48h após concluir o 3 <sup>o</sup> Teste de Performance
Adaptação em biotério com ciclo claro/escuro invertido	Adaptação em esteira de corrida	1 <sup>o</sup> Teste de Performance	2 <sup>o</sup> Teste de Performance	3 <sup>o</sup> Teste de Performance	Coleta de tecidos e morte por eutanásia

**Tabela 1.** Descrição da manipulação dos animais de acordo com a idade em semanas.

### ***Suplementação***

O extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus* (ginseng Siberiano) contendo 0,9% de eleutherosídeos presentes, codificados nas formas B e E, foi fornecido para esta Pesquisa pela Empresa Farmacêutica Gamma Comércio Importação & Exportação Ltda, cujo CNPJ 03.177.596/0001-98, que também forneceu um laudo com todas as especificações sobre o insumo farmacêutico (anexo 2). O suplemento utilizado, *Eleutherococcus senticosus*, foi administrado aos ratos dos grupos Adaptado Suplementado (AS) e Corrida Suplementado (CS), diariamente (cinco vezes por semana) durante as oito semanas do protocolo experimental, entre 11h00 e 12h00 am. Todos os animais, receberam 1 mL de solução salina fisiológica via gavagem gástrica, sendo que esta mesma solução foi usada para dissolver o extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus* para os grupos suplementados na dose de 100 mg por quilograma de peso (Adaptado de VOCES et al., 1999; Adaptado de CABRAL DE OLIVEIRA et al., 2005).

A quantidade de eleutherosídeos presentes no *Eleutherococcus senticosus* de nossa pesquisa foi de 0,9%, desta forma, como foi administrada por gavagem a dose de 100 mg/por Kg de peso/dia, a quantidade de ativos farmacológicos (compostos eleutherosídeos B e E) foi de 0,9 mg/Kg de peso/dia.

### ***Protocolo de Treinamento de Corrida em Esteira***

O protocolo de treinamento em esteira de corrida proposta por Hohl et al. (2009) é de oito semanas (como demonstrado na tabela abaixo), mas, para estabelecer um desequilíbrio entre estímulo e recuperação nos animais treinados, o autor submeteu treinamento aos animais até a 11ª semana, ou seja, três semanas a mais de treinamento, sendo estas com aumento das sessões diárias de treinamento, (2, 3, 4 vezes, respectivamente a cada semana), com diminuição no tempo de recuperação entre as sessões (4, 3, e 2 h, respectivamente). Em nosso protocolo, utilizamos o treinamento até a oitava semana, com uma sessão diária de treino, aumentando a duração bem como a velocidade ao longo das primeiras quatro semanas, e posteriormente mantendo a velocidade e duração (25 m/min, durante 60 minutos) até a oitava semana, conforme observado na tabela 2.

SEMANAS EXPERIMENTAIS	VELOCIDADE DO TREINO (m/min)	DURAÇÃO DO TREINO (minutos)	TESTE PERFORMANCE
Adaptação (15 dias)	12	10	Na 1ª semana de tratamento
1ª	15	20	
2ª	20	30	
3ª	22,5	45	
4ª	25	60	Após concluir a 4ª semana de tratamento
5ª	25	60	
6ª	25	60	
7ª	25	60	
8ª	25	60	Após concluir a 8ª semana de tratamento

**Tabela 2.** Tabela demonstrativa do protocolo de treinamento de corrida em esteira durante oito semanas.

### Teste de *Performance*

Para avaliar a melhora da *performance* dos animais utilizamos um Teste que quantificou o desempenho do animal de maneira independente da variação de sua massa (peso do rato). Segundo Alexander (2005), toda força é proporcional ao peso do corpo durante o movimento e a velocidade é proporcional à rapidez da corrida do animal. Portanto, a potência mecânica é o produto entre a massa e velocidade e o trabalho mecânico realizado é o produto entre potência e tempo. Com a distância total “D” percorrida nos estágios  $i= 1, 2, 3, 4...$  na velocidade “ $V_i$ ” durante tempos “ $T_i$ ” é  $D = \sum D_i = \sum V_i T_i$  podemos calcular uma grandeza relacionada ao trabalho mecânico realizado durante o teste multi-estágio (equação 1):

$$W = \sum W = m D \quad \text{equação 1}$$

onde: (W) representa o trabalho mecânico total realizado pelo rato; (m) = massa; (D) = distância total percorrida pelo rato ao longo do teste. W não é o trabalho mecânico definido pela física, mas uma quantificação proporcional ao trabalho. Ao envolver a massa do animal esta variável W permitiu comparar os desempenhos dos ratos longitudinalmente. Neste projeto W foi expresso em kg.m.

O Teste de Performance consiste de um teste de incremento de velocidade. Inicia-se com os animais andando na esteira sem inclinação durante 3 minutos na velocidade de 10 m/min. Após três minutos, aumenta-se a velocidade para 12 m/min, e a cada dois minutos, incrementa-se 1 m/min até atingir 20 m/min. A partir dessa velocidade o incremento da esteira passa a ser de 2 m/min a cada 3 minutos de Teste, até a exaustão do animal, que é definida no momento em que o rato é incapaz de sustentar o exercício, tocando a grade eletrificada da esteira por mais de cinco vezes em um minuto (LIU et al., 2000; HOHL, 2007; Adaptado de HOHL et al., 2009).

O desempenho foi quantificado através do produto entre a massa corporal (Kg) e a distância percorrida (metros), (Kg.m), até o momento em que o animal não se sustentava correndo sobre a esteira (encostando cinco vezes na grade traseira em menos de um minuto), para possibilitar comparação longitudinal individualizada (HOHL, 2007), utilizando o software MATLAB.

### ***Cronograma dos Testes de Performance e das Coletas para Análise da Glicemia e Lactatemia***

O primeiro Teste de *Performance* ocorreu após cinco semanas da chegada dos animais ao Biotério (3 semanas referentes à adaptação ao biotério, e 2 semanas referentes à adaptação à esteira); o segundo, ocorreu logo após concluir a quarta semana de tratamento (referente ao meio do tratamento); e o terceiro, ocorreu 72 horas após concluir o último dia de tratamento (logo após a oitava semana de tratamento, referente ao final do tratamento). No primeiro e no terceiro Teste de *Performance* foram realizadas as análises de lactato e glicemia em amostras sanguíneas frescas retiradas através de uma pequena incisão na cauda dos ratos, em três momentos: antes do Teste (“basal”), imediatamente após o Teste (“logo após”), e cinco minutos após o término do Teste de *Performance*.

### **Coleta de sangue, separação de hemácias, dissecação dos tecidos muscular e hepático e coleta do tecido adiposo**

Após 72 horas do último teste de *performance* os animais foram anestesiados via intraperitoneal com Zoletil 50<sup>®</sup> (cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam), na dose de 1,16 mL por quilograma de peso, e Anasedan<sup>®</sup> na dose de 0,48 mL por quilograma de peso. Após o efeito do anestésico, com seringa descartável e agulha hipodérmica (BD) 0,80 X 25 mm realizamos a coleta de todo sangue possível ( $10 \pm 1$  mL), por punção cardíaca, coletada do ventrículo esquerdo, sendo transferidos 9 mL para tubos de coleta de plasma heparinizados. Após centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos, alíquotamos amostras de 500  $\mu$ L de plasma, mantendo-as estocadas em biofreezer, a  $-75^{\circ}\text{C}$  para as análises bioquímicas. Os animais não fizeram jejum para a coleta de materiais para as análises. Sob anestesia, após a coleta de sangue e dissecação dos tecidos (muscular, hepático e adiposo), retiramos o coração e o fígado realizando eutanásia nos ratos. Para as análises nas hemáceas, de acordo com o método descrito acima, após a centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos, 2.000  $\mu$ L de amostras foram lavadas em solução PBS e posteriormente hemolisadas (água milliquet/pellet hemácea na razão 1:1). Foram alíquotadas, e estocadas em biofreezer a  $-75^{\circ}\text{C}$  para as análises bioquímicas.

Para as análises do estresse oxidativo no tecido muscular, o músculo gastrocnêmio total esquerdo foi cuidadosamente dissecado sendo homogeneizado sobre banho de gelo com um homogeneizador Politron (Politron PT-MR 2100, Kinematica, Switzerland) na razão 1:10 (peso/vol) com solução de KCl (1,15%) para análise de TBARS; e para as análises da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) foi utilizado o homogeneizador OMNI International uH, adicionando tampão PBS à amostra numa razão de 4:1.

Para as análises do estresse metabólico no tecido muscular e hepático, após o sacrifício dos animais utilizando Zoletil 50<sup>®</sup> e Anasedan<sup>®</sup>, uma porção do músculo gastrocnêmio branco, uma porção do músculo sóleo e uma porção do fígado, foram cuidadosamente extraídas e imediatamente digeridas em solução de KOH a 30% e à quente, para determinação do glicogênio.

Para a coleta do tecido adiposo, os tecidos adiposos dos panículos mesentérico, peri-renal e epididimal foram isolados, e posteriormente pesados (2 a 3 gramas), picados e digeridos em tubo falcon (50 mL) contendo 6 mL de tampão KRBA, com a adição de 1 mg/mL de colagenase (tipo 2, *Clostridium histoliticum*).

#### ***Análise morfológica de adipócitos isolados***

Os procedimentos de isolamento e morfometria de adipócitos dos panículos mesentérico, peri-renal e epididimal foram realizados segundo Pinheiro et al. (2007), descritos a seguir. Adipócitos foram isolados dos respectivos panículos adiposos, por uma modificação no procedimento original de Rodbell (1964). Após a digestão do tecido adiposo em tubo falcon (50 mL) contendo 6 mL de tampão KRBA, e com a adição de 1 mg/mL de colagenase (tipo 2, *Clostridium histoliticum*), o tubo foi agitado em banho metabólico, com 60 ciclos/min a 37 °C, durante 45 minutos. A suspensão celular resultante foi filtrada através de uma malha de nylon (200 µm) para um novo falcon. Com o auxílio de uma pipeta de 5 mL, o infranadante foi removido, permanecendo no interior do tubo apenas as células. Em seguida, adicionamos 6 mL do tampão KRBA e esperamos 3 minutos até que a maioria dos adipócitos flutuassem. Este procedimento de aspiração do KRBA infranadante e lavagem de células foi repetido por mais 3 vezes (FARIAS-SILVA et al., 1999; FARIAS-SILVA et al., 2002; FARIAS-SILVA et al., 2004; SALERNO et al., 2007). Após a última lavagem, o volume de 1 mL do sobrenadante de células foi pipetado para outro tubo falcon, e o volume deste foi preenchido até 12,5 mL (adaptado de Rodbell, 1964). Uma alíquota de 100 µL da suspensão celular final foi pipetada em um tubo de ensaio contendo 900 µL de KRBA (diluição de 1:10). Desta nova suspensão celular, foram pipetados 10 µL em uma câmara de Mallassez para registro fotográfico e posterior medição utilizando o software IMAGE PRO PLUS ANALYSER após captura de imagem através do microscópio Leica (área analisada de 632 µm).

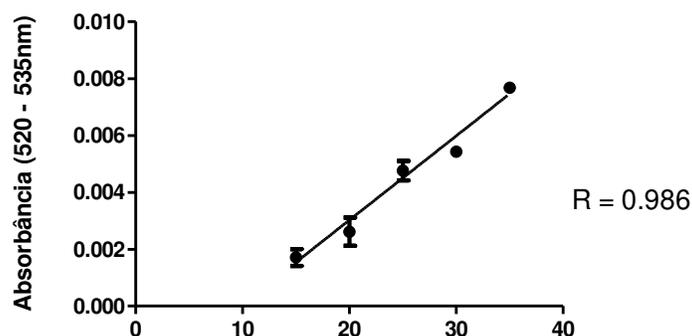
#### **Análise de Biomarcadores de Estresse Oxidativo**

##### ***Quantificação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)***

##### ***Concentração Plasmática de TBARS***

Produtos finais da peroxidação lipídica incluem aldeídos de baixo peso molecular, que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBA), formando complexos coloridos que podem ser quantificados, podendo ser medidos por espectrofotometria ou por fluorescência (YAGI, 1976; OHKAWA et al., 1979), e são amplamente utilizados como biomarcadores da ocorrência de peroxidação lipídica em sistemas biológicos (tecidos e sangue).

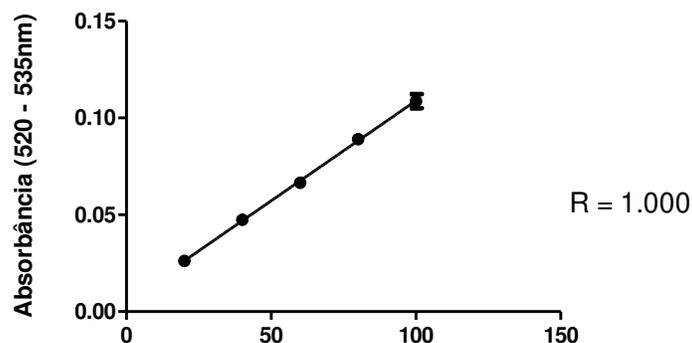
O método utilizado foi adaptado de Yagi (1976). Foram misturados 20  $\mu$ L de plasma com 4,0 mL de  $H_2SO_4$  0,04 M, e posteriormente adicionado 0,5 mL de ácido fosfotungstíco 10% à mistura, que foi agitada. Após o descanso em temperatura ambiente por 5 minutos, a mistura foi centrifugada à 3000  $x$  g por 10 minutos, onde o sobrenadante foi descartado e o precipitado misturado com 2,0 mL de  $H_2SO_4$  0,04M e 0,3 mL de ácido fosfotungstíco 10%. Essa nova mistura foi novamente centrifugada a 3000  $x$  g por 10 minutos. O precipitado foi ressuspensão com 4,0 mL de água destilada, mais 1,0 mL do reagente TBA (uma mistura de igual volume de solução de TBA aquoso 10% e ácido acético glacial). A mistura foi aquecida à 95°C por 60 minutos em banho-maria. Após ser resfriado com água durante 5 minutos, foi adicionado 5 mL de n-butanol, agitando vigorosamente. Após a centrifugação a 3000  $x$  g por 15 minutos, a camada superficial (1 mL) de n-butanol foi quantificada no espectrofotômetro em cubeta de vidro nos seguintes valores de comprimentos de onda: 520 e 535nm, o qual o primeiro valor de absorvância (520nm) é subtraído do segundo (535nm), pois, o valor desta subtração é onde ocorre o maior pico de absorvância, e portanto, de peroxidação. O cálculo da concentração de TBARS foi realizado por meio de uma equação definida pela curva-padrão de tetraetoxipropano (TEP) demonstrado na figura 5.



**Figura 5.** Curva para TBARS no plasma: Curva padrão em diferentes concentrações de tetraetoxipropano (TEP) no plasma.

### ***Concentração Muscular de TBARS***

O TBARS foi quantificado após adaptação dos métodos descritos por Ohkawa (1979) e Mihara & Uchiyama (1978). Após o preparo do homogenato do músculo gastrocnêmio esquerdo, 40 µL de amostra foram colocadas em um tubo de ensaio juntamente com 130 µL de KCl (1,15%), 1 mL de ácido fosfórico (0,1%) e 333 µL de ácido tiobarbitúrico (0,6%). Posteriormente, a superfície dos tubos de ensaio foi protegida com papel alumínio e levados ao banho-maria, onde permaneceram na temperatura de 97°C durante 60 minutos. Após o resfriamento das amostras em temperatura ambiente, foram adicionados 1,3 mL de butanol. A seguir, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos, em 3.500 rpm. Ao final, foram aliqotados 1000 µL do sobrenadante para as análises no espectrofotômetro. No ensaio os produtos resultantes do ataque oxidativo às estruturas celulares (peróxidos lipídicos), reagem com o ácido 1-tiobarbitúrico (TBARS), formando bases de Schiff. A interação entre os peróxidos lipídicos e o TBARS forma um complexo colorido, mensurado em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 520 e 535 nm, o qual o primeiro valor de absorvância (520 nm) é subtraído do segundo (535 nm), pois, o valor desta subtração é onde ocorre o maior pico de absorvância, e portanto, de peroxidação. Para isso as amostras foram homogeneizadas em KCL (1,15%) na razão 1:10 (peso/vol), sendo adicionados posteriormente a uma solução contendo ácido fosfórico, KCl, ácido tiobarbitúrico e butanol. O cálculo da concentração de TBARS foi realizado por meio da equação definida pela curva-padrão de tetraetoxipropano (TEP) demonstrado na figura 6.



**Figura 6.** Curva para TBARS no homogenato: Curva padrão em diferentes concentrações de tetraetoxipropano (TEP) no homogenato (gastrocnêmio vermelho).

#### *Quantificação da Atividade Enzimática da Catalase (CAT)*

##### *Atividade da CAT nos Eritrócitos*

Após o preparo do hemolisado conforme descrito na metodologia de coleta de sangue, 10  $\mu$ L de amostra foram utilizadas para a determinação da atividade enzimática da catalase. O procedimento bioquímico para determinação da atividade enzimática na amostra foi realizado pela presença de peróxido de hidrogênio e leitura em 480 nm, segundo método de Cohen et al. (1970). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias por  $\mu$ g de proteína tecidual por minuto. A proteína tecidual foi quantificada por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976).

#### *Quantificação da Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)*

##### *Atividade da SOD no tecido Muscular*

Após o preparo do homogenato do músculo gastrocnêmio esquerdo conforme descrito na metodologia da dissecação do tecido muscular, 10  $\mu$ L de amostra foram

utilizados para a determinação da enzima SOD. O resultado obtido foi realizado por meio de leitura em espectrofotômetro (540 nm), segundo método de TANG et al., 2002. A proteína tecidual foi quantificada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976).

## **Análise de Biomarcadores de Estresse Metabólico**

### ***Concentração Plasmática de Lactato***

As concentrações plasmáticas de lactato foram analisadas utilizando o kit Accutrend® Plus (Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse 116 D-68305 Mannheim, Germany) em amostra de sangue retirado através de uma pequena incisão na cauda do animal e colocado em tira de teste para leitura no aparelho, cuja concentração é expressa em mmol/L (0,8 - 21,7 mmol/L para valor sanguíneo).

### ***Quantificação de Glicogênio Muscular e Hepático***

Frações pesando entre 200-250 mg do músculo sóleo foram retiradas imediatamente após a eutanásia e foram digeridas em 0,5 mL de KOH 1N durante 20 minutos. Posteriormente, foram adicionadas 20 µL de solução saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o glicogênio foi precipitado por meio de duas passagens de 2,5 mL de etanol fervente, seguida de centrifugação. A determinação colorimétrica foi realizada com a adição de 20 µL de fenol a 80% e 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, após fervura de 15 minutos. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro 490 nm (DUBOIS et al., 1956).

As diferenças na determinação do glicogênio hepático, em relação ao tecido muscular, foram as seguintes: as frações de tecido hepático retirado após a eutanásia pesaram aproximadamente 500 mg, portanto, com necessidade de digestão em 2 mL de solução KOH 30%. A precipitação do glicogênio hepático foi realizada em 0,1 mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 7 mL de etanol. Após a extração o precipitado foi suspenso em 25 mL de água deionizada. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro 490nm (DUBOIS et al., 1956; ARAÚJO, 2010).

### ***Concentração Plasmática de Glicose***

As concentrações plasmáticas de glicose foram analisadas antes da administração da anestesia, onde por meio de uma pequena incisão na cauda do rato foi retirada uma amostra de sangue fresco e imediatamente colocada em tira de teste para leitura no aparelho Accu-Chek Active<sup>®</sup> (Roche Diagnostics GmbH D-68298 Mannheim, Germany), cuja faixa de medição é expressa em mg/dL, de 10 a 600 mg/dL (0,6-33,3 mmol/L).

### **Análise do Perfil Lipídico**

#### ***Concentração Plasmática de Triacilgliceróis (TAG) e Colesterol Total (CT)***

Antes de administrar a anestesia, os animais foram submetidos às análises de triacilglicerol (TAG) e colesterol total (CT). Por meio de uma pequena incisão na cauda do rato foram retiradas duas amostras de sangue e colocadas em tiras testes específicas para TAG e CT para leitura no aparelho Accutrend<sup>®</sup>Plus (Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse 116 D-68305 Mannheim, Germany). As concentrações são expressas em mg/dL, onde o intervalo de leitura é realizado entre 70 a 600mg/dL (0,80 – 6,86 mmol/L) para TAG; e 150 a 300 mg/dL (3,88 – 7,76 mmol/L) para CT.

### **Anestésico**

O anestésico utilizado foi Zoletil 50<sup>®</sup> (Virbac Saúde Animal – Virbac do Brasil, Jurubatuba, São Paulo, licenciado no Ministério da Agricultura sob nº 5856 em 31/01/97, Registro 021-SP/97), fórmula composta por: cloridrato de tiletamina 125,0 mg; cloridrato de zolazepam 125,0 mg; excipiente qsp 660,0 mg; na dose de 1,16 mL por quilograma de peso (Machado et al., 2009); e Anazedan<sup>®</sup> (Divisão Vetbrands Saúde Animal – Paulínia, São Paulo, licenciado no Ministério da Agricultura sob nº 6.589 em 03/11/98), fórmula composta por: cloridrato de xilazina 2,3 g (equivalente a 2 g de xilazina base); veículo q.s.p. 100 mL; na dose de 0,48 mL por quilograma de peso, por administração intramuscular na pata dianteira.

### **Análise Estatística**

Para o cálculo do trabalho realizado pelos ratos (dados dos testes de *performance*) foi utilizado o software MATLAB. Para conduzir as outras análises estatísticas e a construção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism®. As variáveis propostas no presente estudo foram submetidas ao teste de normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov.

O teste utilizado foi ANOVA one-way para as variáveis consideradas normais (análise paramétrica), seguido do pós-teste de Tukey, e teste *t* Student foi utilizado para análise pareada. Estes resultados foram apresentados como média e erro padrão das médias. E para dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's (aplicado nas análises de *performance*, glicose - antes da eutanásia, glicogênio, e TBARS). Os resultados não paramétricos estão apresentados em mediana e os respectivos percentis. A significância foi considerada quando os valores de *p* foram menores do que 0,05.

## **Resultados e Discussão**

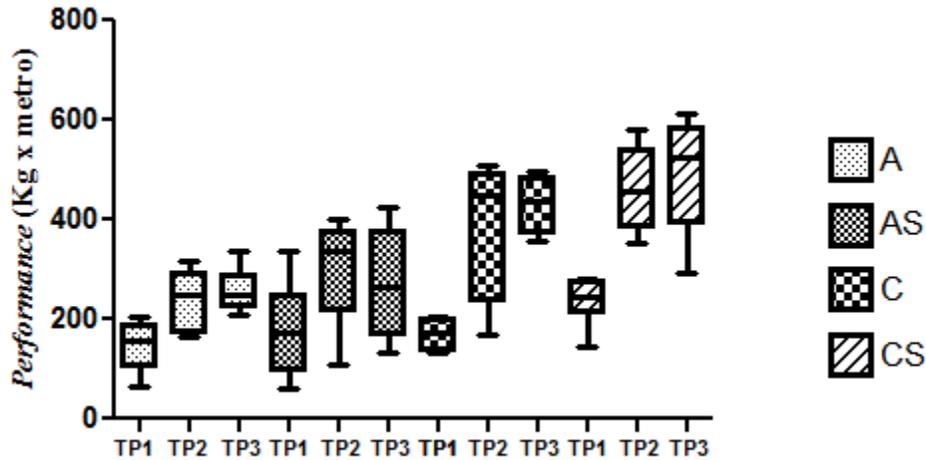
Os resultados estão apresentados e serão discutidos considerando o protocolo utilizado bem como os itens avaliados. Assim, nesta descrição para melhor compreensão dos resultados, optamos em apresentar em cada um dos índices, se o treinamento em esteira produziu alguma alteração no indicador apresentado, e, em seguida, o efeito do tratamento do *Eleutherococcus senticosus* sobre este indicador.

### **Avaliação da *Performance***

Iniciamos a descrição com os resultados de *performance* para demonstrar a eficiência do treinamento físico em esteira. Por ser muito utilizada em estudos com animais, a corrida em esteira rolante se mostra uma importante modalidade de exercício envolvendo ratos (GOBATTO et al., 2008). Para avaliar a melhora da *performance* dos animais foi necessário realizar um teste que quantificasse o desempenho do animal de maneira independente da variação da sua massa corporal (peso do rato), e, que apresentasse extrema facilidade com relação à mensuração da intensidade do esforço, sendo controlada pela velocidade, inclinação ou associação desses elementos (GOBATTO, 2008). No protocolo experimental definido para esta tese utilizamos somente o incremento de velocidade conforme descrito na metodologia, e fizemos adaptação de um protocolo de 11 semanas de treinamento e *overtraining* já descrito na literatura (HOHL et al., 2009).

Em uma análise comparativa entre todos os grupos em cada teste, podemos destacar os resultados (Figuras 7, 8 e 9):

- no Teste de Performance 1: a performance de todos os grupos foi semelhante;
- no Teste de Performance 2: o grupo Corrida Suplementado demonstrou melhor performance que o grupo Adaptado, enquanto que o grupo Corrida não apresentou esta diferença significativa sobre este grupo;
- no teste Performance 3: o grupo Corrida Suplementado demonstrou melhor performance que o grupo Adaptado e Adaptado Suplementado; enquanto o grupo Corrida demonstrou diferença significativa somente sobre o seu controle (A).



**Figura 7.** Evolução da *performance* ao longo do tratamento entre os testes 1, 2 e 3 observadas entre os animais de um mesmo grupo. Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.

Análise por Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn's:

\* $p < 0,05$  = A TP3 vs TP1;

\* $p < 0,05$  = CS TP2 e TP3 vs TP1.

Análise por ANOVA one-way, seguido do pós teste de Tukey:

\* $p < 0,05$  = S TP2 e TP3 vs S TP1;

\* $p < 0,05$  = C TP2 e TP3 vs C TP1;

\* $p < 0,05$  = CS TP2 e TP3 vs CS TP1.

TP1 – Primeiro teste de *performance* - após cinco semanas da chegada dos animais ao Biotério (3 semanas referentes à adaptação ao biotério, e 2 semanas referentes à adaptação à esteira);

TP2 – Segundo teste de *performance* - após concluir a quarta semana de tratamento (referente ao meio do tratamento);

TP3 – Terceiro teste de *performance* - 72 horas após concluir o último dia de tratamento (logo após a oitava semana de tratamento, referente ao final do tratamento).

Analisando a *performance* entre os animais de um mesmo grupo, ao longo do tratamento, observamos que os ratos do grupo Adaptado (A) apresentaram melhora da *performance* no TP2 e no TP3 em relação ao TP1 (Figura 7). Tal fato pode ser devido ao próprio processo natural de maturação do animal. Já o grupo Corrida (C), apesar de este grupo possuir valores absolutos maiores em todos os testes em relação ao grupo A, quando comparamos esses valores dentre eles mesmos ao longo do tratamento, através de análise não paramétrica de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's, os valores não foram estatisticamente diferentes, mas quando são analisados pelo teste ANOVA one-way seguido do pós teste de Tukey, observa-se diferença no TP2 e TP3 em relação ao TP1.

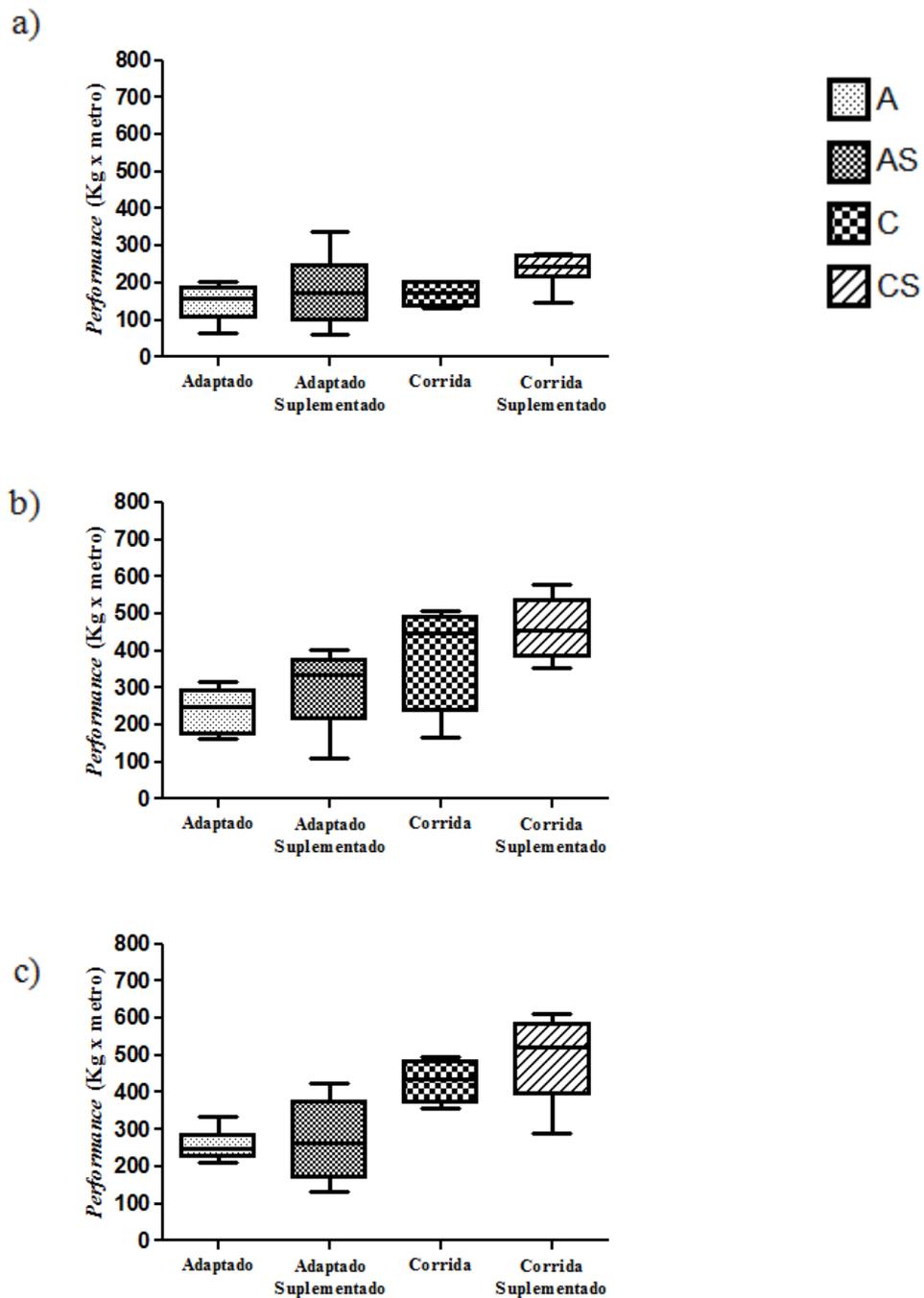
Já no grupo Adaptado Suplementado (AS), observamos valores absolutos superiores em relação ao grupo A em todos os testes, mas estes valores também não estatisticamente diferentes quando analisado dentre eles mesmos.

Em relação ao grupo Corrida Suplementado (CS), este grupo apresenta melhora significativa da *performance* nos testes TP2 e TP3 em relação ao TP1.

Este é o primeiro trabalho utilizando *Eleutherococcus senticosus* (ES) sobre a *performance* com análise de biomarcadores em ratos submetidos a treinamento de corrida em esteira. Em trabalhos anteriores com ratos, utilizando protocolo de exercício físico de natação, o ES demonstrou melhora da *performance* (NISHIBE et al., 1990).

Outro dado importante em nosso estudo demonstrado na figura 7 foi que quatro semanas de treinamento mostraram-se suficientes para evolução do desempenho, uma vez que não ocorreu aumento de *performance* nos animais entre TP2 e TP3, tornando assim desnecessário a aplicação de um terceiro teste.

Em humanos, alguns estudos utilizando suplementação de *Eleutherococcus senticosus* relatam melhora na recuperação da frequência cardíaca, melhora na capacidade de remoção e no limiar de lactato, aumento no consumo máximo de oxigênio, aumento na utilização de lipídios como fonte de energia e, principalmente, melhora na *performance* (CAMPBELL et al., 1997; WU et al., 1996; ESCHBACH et al., 2000; KUO et al., 2010). Estes autores atribuem estas melhoras à ação de substâncias responsáveis em induzir várias respostas fisiológicas, denominadas eleuterossídeos, presentes na raiz do *Eleutherococcus senticosus* (GOULET & DIONNE, 2005).



**Figura 8.** Análise de *performance* entre os grupos nos Testes 1 (a), 2 (b) e 3 (c). Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.

Análise por Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn's:

\* $p < 0,05$  = CS TP2 vs A TP2;

\* $p < 0,05$  = CS TP3 vs A e AS TP3.

Análise por ANOVA one-way, seguido do pós teste de Tukey:

\* $p < 0,05$  = CS TP2 vs A TP2;

\* $p < 0,05$  = C TP3 vs A TP3;

\* $p < 0,05$  = CS TP3 vs A TP3.

De acordo com os resultados demonstrados na figura 8 (a, b, c), para análise não paramétrica, utilizando Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, podemos fazer as seguintes observações:

- Comparando os dados de performance entre A e AS, as medianas do AS no TP2 são de domínio superior se comparado ao TP1, embora não demonstrado estatisticamente;

- O grupo CS não teve melhor *performance* do que o grupo C, sugerindo que o poder ergogênico do *Eleutherococcus senticosus* pode estar mais atrelado às variáveis metabólicas e biológicas do que propriamente o desempenho entre os grupos submetidos a treinamento;

- O grupo C no TP3 demonstra forte tendência para a melhora de *performance* sobre o seu grupo controle (A), apesar deste dado não ser demonstrado pela estatística;

- A melhora da *performance* é obtida no TP3 quando o CS se diferencia do A e do AS, no entanto, nota-se no grupo CS, que a mesma *performance* que ocorreu no C em relação ao A, já é obtida no TP2, ou seja, o tratamento com *Eleutherococcus senticosus* antecipou o ganho de *performance*.

Utilizando o teste ANOVA one-way, os resultados da figura 8 (c) indicam que houve diferença significativa da *performance* do grupo C no TP3 em relação ao seu grupo controle (A).

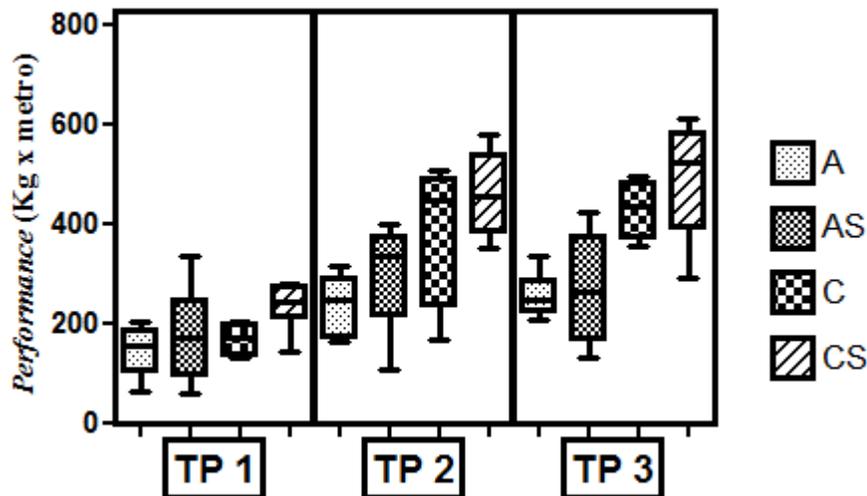


Figura 9. **Dados de performance, em todos os momentos juntos.** Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.

Análise por Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn's:

\* $p < 0,05$  = CS TP2 vs A TP2;

\* $p < 0,05$  = CS TP3 vs A e AS TP3.

Análise por ANOVA one-way, seguido do pós teste de Tukey:

\* $p < 0,05$  = CS TP2 vs A TP2;

\* $p < 0,05$  = C TP3 vs A TP3;

\* $p < 0,05$  = CS TP3 vs A TP3.

### Análises de Lactatemia

A aplicação das análises de lactato foi com o objetivo de investigar a intensidade do esforço e a caracterização metabólica nos testes de *performance* (1 e 3), bem como inferir na produção (“logo após”) e na remoção (5 minutos após) do lactato após o término dos testes, uma vez que esta medida indica a predominância metabólica do exercício.

Os valores das concentrações plasmáticas de lactato encontradas nos animais logo após o Teste de *Performance*, indicou um teste de predominância aeróbia tanto no TP1 como no TP3.

Após os diferentes tipos de tratamento, considerando os resultados do TP3 para o grupo Adaptado, este grupo apresentou menor produção de lactato, enquanto o grupo Adaptado Suplementado no TP3 apresentou valores significativamente maiores em relação

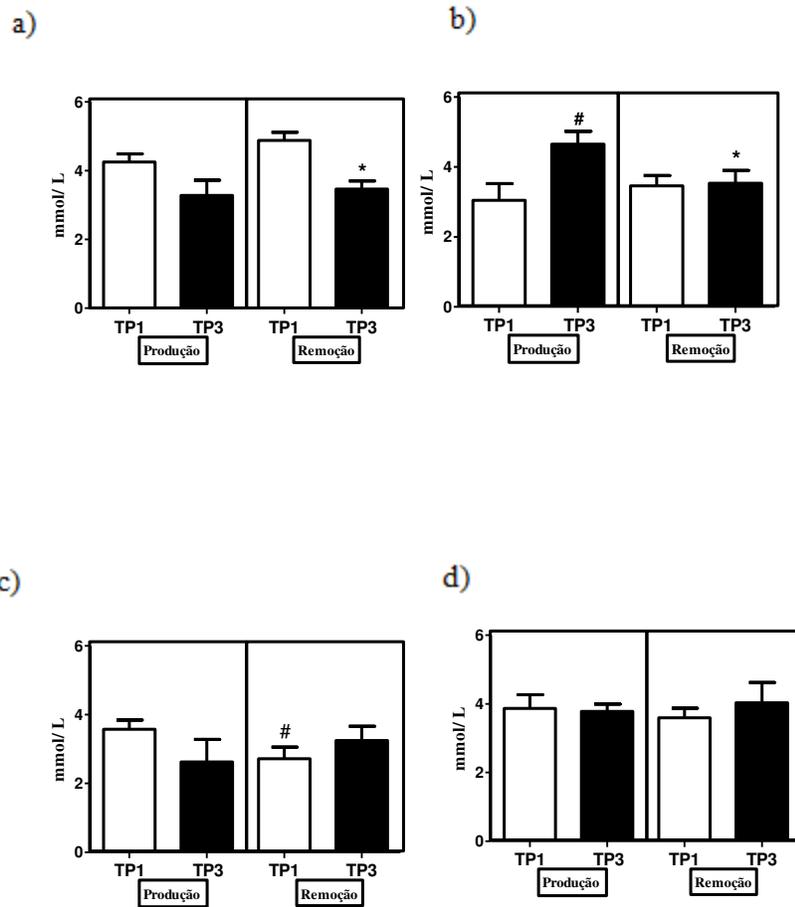
ao grupos Corrida, no momento “logo após”, e em relação a ele mesmo no TP1 (no mesmo momento).

Os valores para a concentração de lactato (mmol/L) encontrados nos animais dos diferentes grupos do modelo experimental que utilizamos estão de acordo com os encontrados na literatura, em testes de corrida em esteira realizados por Gobatto et al. (2008) ( $3,9 \pm 0,3$  mmol/L), diferente dos valores relatados para ratos nadadores em exercício de intensidade máxima (5,5 mmol/L) (GOBATTO et al., 2001; MANCHADO et al., 2005; GOBATTO et al., 2008).

Alguns estudos utilizando suplementação de ginseng Siberiano em humanos relatam melhora na capacidade de remoção e no limiar de lactato e melhora na *performance* (FORGO & KIRCHDORFER, 1982; WU et al., 1996; CAMPBELL et al., 1997; ESCHBACH, 2000), mas em nosso estudo não observamos a influência do treinamento de corrida, bem como da suplementação, sobre a capacidade de produção e remoção de lactato.

A produção do lactato está associada com o potencial redox (óxido-redução), para a manutenção da produção de ATP intramuscular e da *performance*. Durante a contração muscular, a molécula de energia ATP (adenosina trifosfato) é usada pela enzima ATPase para permitir a ligação entre as pontes cruzadas (actina e miosina) resultando na contração muscular. As concentrações de ATP são normalmente baixas, e com repetidas contrações os estoques de fosfocreatina (PCr) no músculo são utilizados para a ressíntese e manutenção das concentrações de ATP, mas com o aumento do número de contrações, a concentração de PCr (fosfocreatina) diminui, resultando em uma necessidade de utilizar outros combustíveis para gerar energia (CAIRNS, 2006). Consequentemente, a glicogenólise é ativada, gerando piruvato e ATP. Com o aumento da intensidade do exercício, esta via é mais utilizada para produzir o ATP necessário para atender a demanda, para permitir a contração muscular (aumento da atividade da ATPase) e o bombeamento de íons ( $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase e  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  - ATPase) (CAIRNS, 2006). Com a diminuição da intensidade do exercício, o piruvato é oxidado dentro da mitocôndria, pelo metabolismo aeróbio. Por ser a mitocôndria incapaz de oxidar todo o piruvato produzido durante o exercício intenso, o piruvato se converte em lactato no mioplasma (CAIRNS, 2006). Este acúmulo de lactato está diretamente associado à produção de  $\text{H}^+$  levando a uma acidose

intramuscular, mas a formação de  $H^+$  ocorre durante as reações glicolíticas que envolvem a hidrólise do ATP, e não durante a produção de lactato a partir do piruvato (ROBERGS et al., 2004; ROBERGS et al., 2005; CAIRNS, 2006). A seguir, num sistema de co-transporte, o lactato leva os prótons para fora da célula através de uma proteína canal integral de membrana, o MCT (Transportador de Monocarboxilato) (ROBERGS, 2001).



**Figura 10.** Lactatemia (mmol/L) avaliada “logo após” (relacionado à produção) e “5 minutos após” (relacionado à remoção) os términos dos testes de *performance* (TP) 1 e 3 em todos os grupos: Adaptado (a), Adaptado Suplementado (b), Corrida (c) e Corrida Suplementado (d). Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6. Análises dentro de um mesmo grupo, no mesmo momento, no TP1 e no TP3: logo após (produção): \*p<0,05= AS TP1 vs AS TP3; 5’após (remoção): \*p<0,05= A TP1 vs A TP3; Análise entre todos os grupos no mesmo momento,

nos TP1 e no TP3: logo após (produção): #p<0,05= AS TP3 vs C TP3 5' após (remoção):  
#p<0,05= A TP1 vs C TP1

## **Análises de Glicemia**

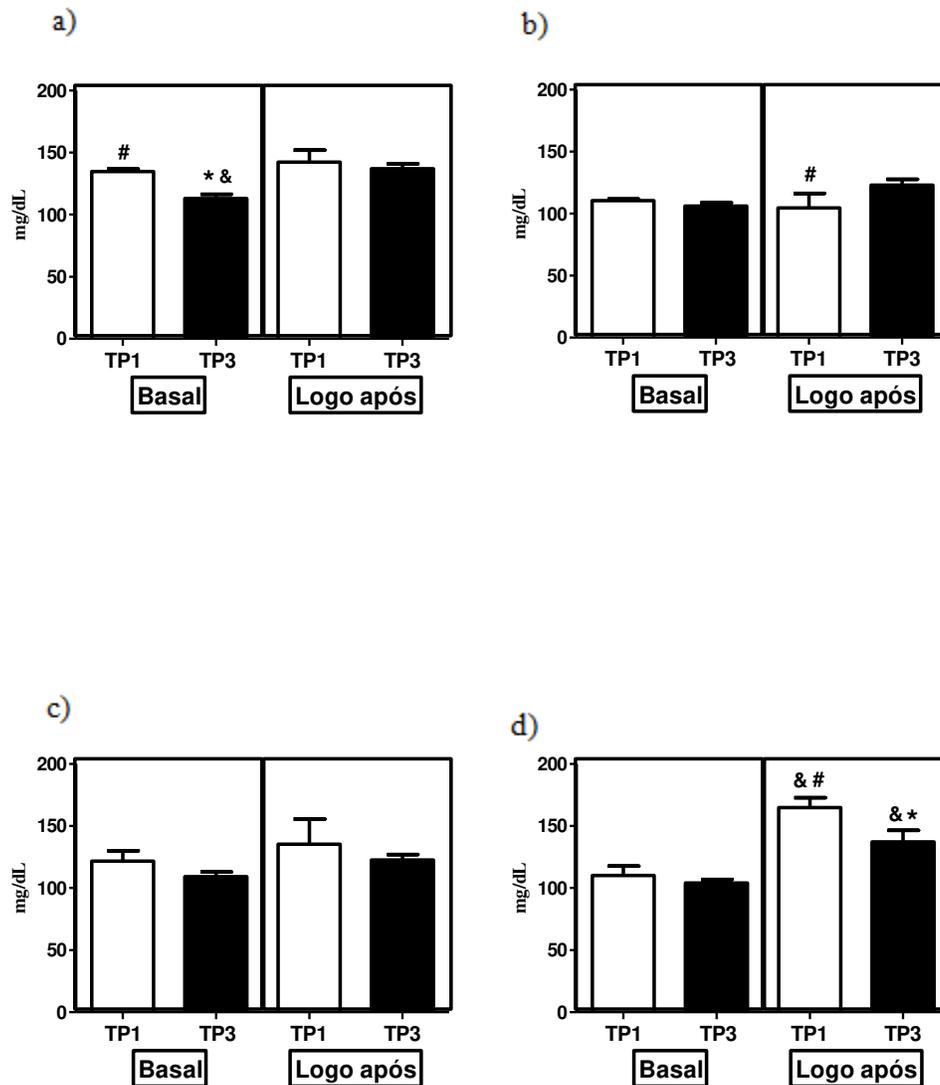
Os ratos não permaneceram em jejum antes dos testes de *performance* devido ao tipo de exercício que eles seriam submetidos, que poderia comprometer a própria performance e as análises dos biomarcadores investigados (lactatemia e glicemia).

O grupo Adaptado apresentou valores de glicemia no momento anterior ao teste de performance significativamente maiores do que os grupos AS e CS no TP1; e maior que os grupos AS, C e CS no momento “basal” no TP3. Pelo fato destes animais não terem sido submetidos ao jejum antes do teste, sugerimos que a hiperglicemia basal do grupo A pode ser devida à alimentação.

No momento “logo após” não existe diferença entre os animais do grupo Corrida no TP3 vs Corrida Suplementado no TP1.

Conforme observado, nos animais do grupo AS houve aumento da glicemia ao final do exercício no TP3, enquanto que nos animais do grupo C houve uma diminuição significativa no mesmo momento do teste anterior. Baseado neste resultado, podemos afirmar que o exercício proposto exerceu um importante efeito em diminuir a glicemia. No grupo CS também foi observado uma significativa diminuição da glicemia no momento “logo após” no TP3, em relação ao TP1, demonstrando que, de fato, o ginseng sozinho não foi capaz de exercer um efeito significativo na diminuição da glicemia, mas aliado ao exercício, tal efeito pôde ser observado.

KUO et al. (2010), em seu estudo utilizando ginseng Siberiano em humanos, encontrou concentrações de glicose diminuídas significativamente, assim como Jung et al. (2009) em um trabalho anterior, onde demonstrou significativa redução da insulina e da glicose plasmática, resultando em melhorias na sensibilidade à insulina.



**Figura 11.** Glicemia (mg/dL) avaliada antes (basal) e logo após os Testes de Performance 1 e 3 em todos os grupos: Adaptado (a), Adaptado Suplementado (b), Corrida (c) e Corrida Suplementado (d) Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.

\*p<0,05 = Análise comparativa entre animais de um mesmo grupo no mesmo momento:

Basal: \*p<0,05= A TP1 vs A TP3 e Logo após: \*p<0,05= CS TP1 vs CS TP3.

#p<0,05 = Análise entre todos os grupos no mesmo momento, no TP1 e no TP3:

Basal: #p<0,05= A TP1 vs AS TP1; #p<0,05= A TP1 vs CS TP1; #p<0,05= A TP1 vs AS TP3; #p<0,05= A TP1 vs C TP3; #p<0,05= A TP1 vs CS TP3.

Logo após: #p<0,05= AS TP1 vs CS TP1; #p<0,05= CS TP1 vs AS TP3.

&p<0,05= Análise comparativa entre momentos “basal” e “logo após” em animais de um mesmo grupo:

&p<0,05= A TP3 basal vs A TP1 logo após e TP3 logo após.

&p<0,05= CS TP1 logo após vs CS TP1 basal e CS TP3 basal; CS TP3 logo após vs CS TP3 basal.

## **Ganho de peso corporal e ingesta alimentar**

Todos os ratos dos diferentes grupos ganharam peso significativamente ao longo das 8 semanas, entretanto, o ganho de peso dos ratos que foram tratados com *Eleutherococcus senticosus* (ES) foi significativamente menor que o ganho de peso dos respectivos controles. Os ratos separados para serem adaptados suplementados apresentaram o peso no início do tratamento significativamente maior em relação ao grupo Corrida (C), e, ao final, o ganho de peso ao longo do tratamento foi igual aos animais do grupo C, demonstrando que a suplementação com *Eleutherococcus senticosus* exerceu um efeito tão importante quanto o treinamento de corrida em esteira durante 8 semanas. Em relação ao peso final do tratamento, foi observada diferença significativa entre os animais do grupo Corrida Suplementado (CS) e Adaptado (A), onde CS teve o peso significativamente menor que o grupo A, mas não entre C e AS.

Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Rhie e Won (2004), que confirmaram o potente efeito do *Eleutherococcus senticosus* sobre o ganho de peso dos ratos, onde demonstraram além da significativa redução, uma diminuição das concentrações de colesterol plasmático (YAN-LIN et al., 2011).

Uma hipótese para este importante efeito na redução do peso poderia ser explicada pela atuação do *Eleutherococcus senticosus* sobre o metabolismo da glicose e insulina (KUO et al., 2010), além do efeito de diminuir as concentrações de corticosterona em ratos (KIMURA & SUMIYOSHI, 2004; YAN-LIN et al., 2011).

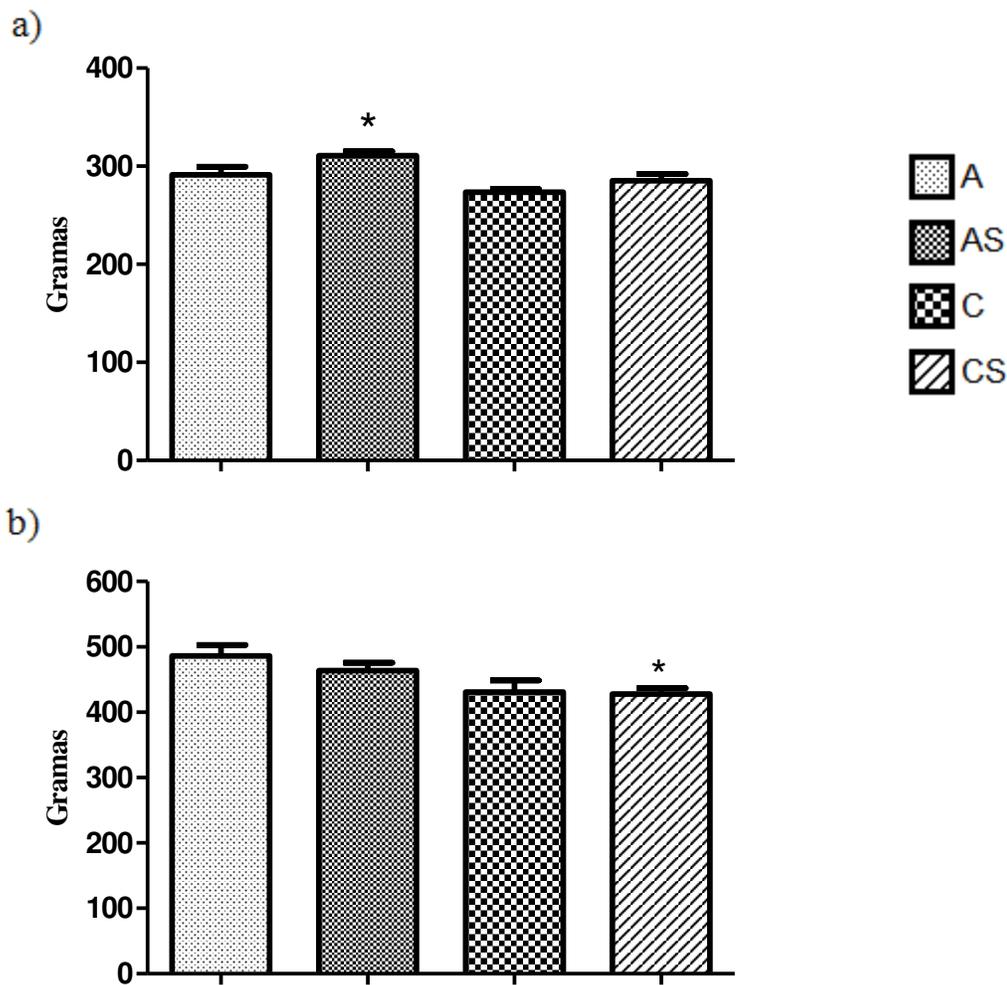


Figura 12. **Peso (gramas) dos ratos no início (a) e ao final (b) dos diferentes tipos de tratamento.** Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.

Peso inicial (Pi): \* $p < 0,05 = AS \text{ vs } C \text{ e } CS$ ;

Peso final (Pf): \* $p < 0,05 = CS \text{ vs } A$

Observações:

Pi = peso dos ratos medido após três semanas de adaptação e duas à esteira;

Pf = peso dos ratos no dia da eutanásia, após 8 semanas de tratamento.

O grupo Adaptado Suplementado (AS) iniciou o tratamento com o peso significativamente maior que o grupo Corrida (C), e ao final, o ganho de peso ao longo do tratamento foi semelhante a este grupo, demonstrando importante efeito da suplementação sobre esta variável.

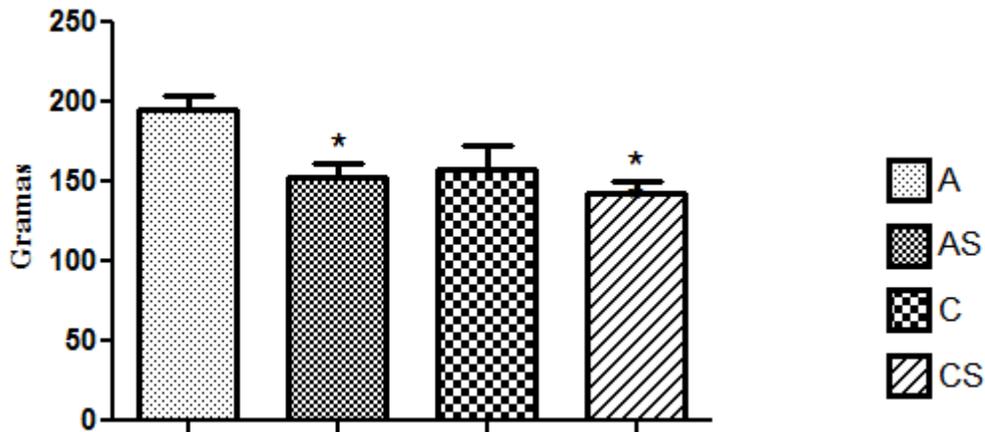


Figura 13. Ganho de peso (gramas) ao longo dos diferentes tipos de tratamento. Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.

\* $p < 0,05 = AS \text{ vs } A; CS \text{ vs } A.$

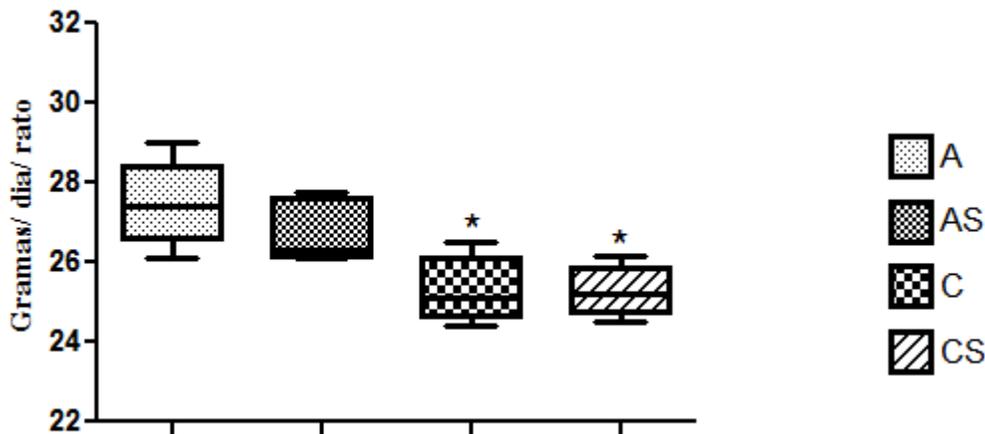


Figura 14. Quantidade de ração padrão (gramas/ dia/ rato) ingerida pelos ratos submetidos aos diferentes protocolos de tratamento. Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.

\* $p < 0,05 = C \text{ e } CS \text{ vs } A.$

Os grupos AS e CS apresentaram um menor ganho de peso ao longo do tratamento em relação ao grupo A, entretanto, este menor ganho de peso entre os animais do grupo AS

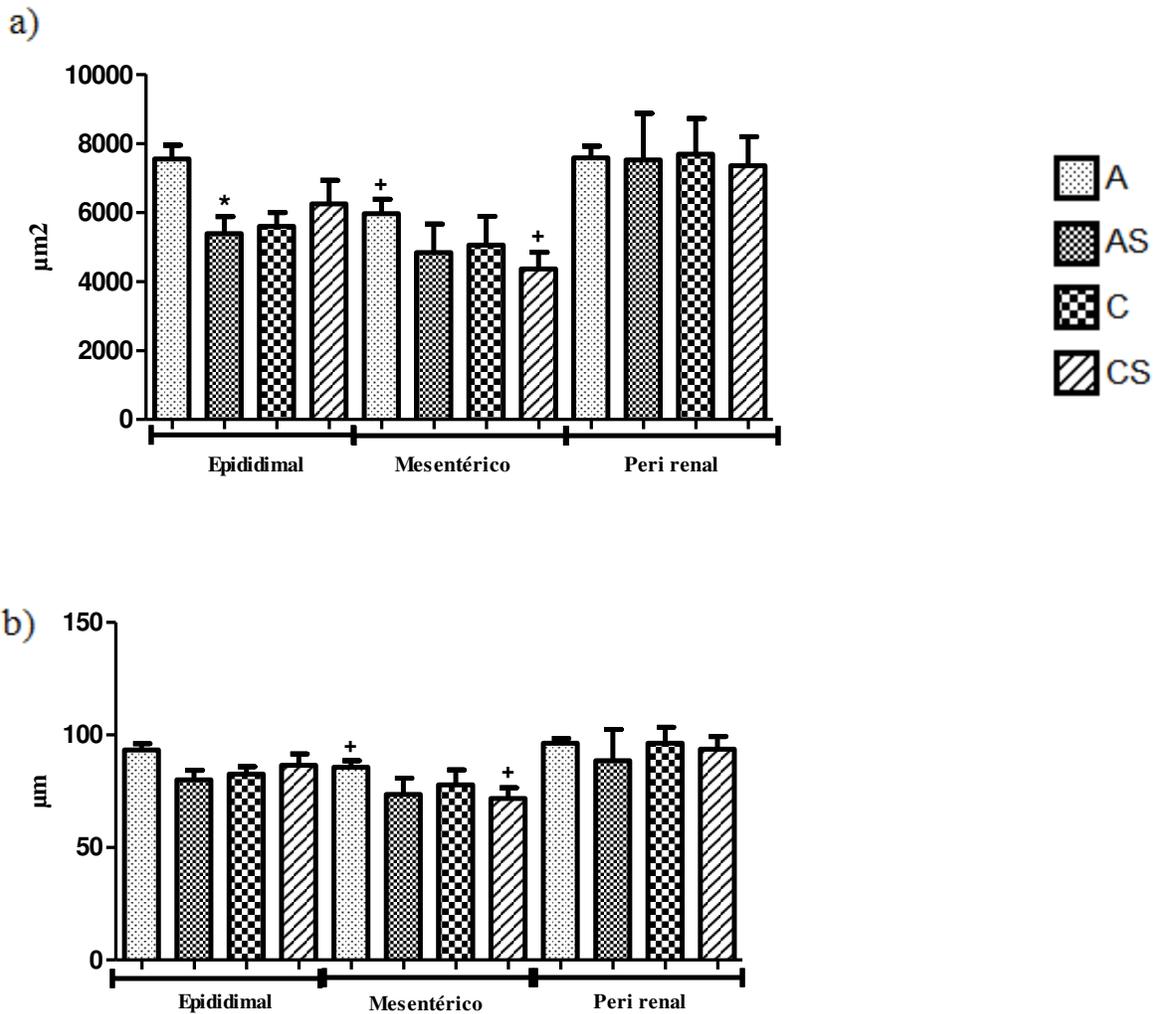
e A não foi devido a menor ingestão de ração. Houve menor consumo de ração dos grupos que participaram do treinamento de corrida C e CS, em relação ao grupo A.

## **Análise morfométrica dos Adipócitos Isolados de diferentes panículos**

Cheik et al. (2006), demonstraram em seu estudo com ratos que o exercício realizado ao longo de oito semanas (90 minutos de natação, 5x/semana, 3 a 5% sobrecarga) foi capaz de causar uma significativa diminuição da gordura e do diâmetro dos adipócitos nos panículos epididimal e mesentérico. Os autores sugerem que isto se deve ao fato de que o exercício físico aeróbio de longa duração e intensidade moderada aumenta a atividade da enzima lipase hormônio sensível via AMPc e a capacidade oxidativa muscular, sendo os ácidos graxos livres (AGL) o principal substrato energético.

Não houve diminuição da área, bem como do diâmetro dos panículos analisados dos animais submetidos ao treinamento de corrida. Mas uma redução significativa na área do panículo epididimal dos ratos do grupo Adaptado Suplementado foi observada em relação ao grupo Adaptado. Tal fato pode estar de acordo com os dados de Rhie e Won (2004), que confirmaram o potente efeito do *Eleutherococcus senticosus* (ES) sobre a redução do peso (YAN-LIN et al., 2011). Outros autores também demonstraram que o ES possui efeito hipolipidêmico maior que a taurina, a carnitina, e vários outros extratos de ervas medicinais (SONG et al., 2002; CHOI et al., 2008; YAN-LIN et al., 2011).

Em trabalhos realizados com humanos, Szolomicki et al. (2000) demonstraram significativa redução nas concentrações de colesterol total e LDL colesterol; redução dos ácidos graxos livres, triacilglicerol e glicose sanguínea.



**Figura 15.** Medidas de área (a) e diâmetro (b) dos adipócitos isolados dos panículos adiposos epididimais, mesentéricos e peri-renais de ratos submetidos aos diferentes protocolos de tratamento. Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.

Área ( $\mu\text{m}^2$ ):

\* $p < 0,05$  quando avaliado o mesmo tecido em diferentes tratamentos

+ $p < 0,05$  quando avaliado o mesmo grupo em diferentes panículos.

\* $p < 0,05 = \text{AS vs A}$ ;

+ $p < 0,05 = \text{A mesentérico vs epididimal}$ ;  $\text{A mesentérico vs peri renal}$ ;  $\text{CS mesentérico vs peri renal}$ .

Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ):

\* $p < 0,05$  quando avaliado o mesmo tecido em diferentes tratamentos.

+ $p < 0,05$  quando avaliado o mesmo grupo em diferentes panículos.

+ $p < 0,05 = \text{A mesentérico vs peri renal}$ ;  $\text{CS mesentérico vs peri renal}$ .

## **Análise de Biomarcadores de Estresse Metabólico**

Em todos os grupos analisados, foi encontrada uma maior quantidade no conteúdo de glicogênio do tecido hepático, em relação aos outros diferentes tecidos (gastrocnêmio branco e sóleo). Não existe diferença significativa entre os grupos A, AS, C e CS para o conteúdo de glicogênio dos três tecidos analisados (glicogênio hepático, gastrocnêmio branco e sóleo), e, em relação às concentrações de glicose, não houve diferença entre os grupos.

Em uma pesquisa com humanos, Wu et al. (1996) observaram nos sujeitos avaliados um aumento da contribuição energética de 43% a partir do metabolismo de gordura, concluindo que o uso de ciwujia (presente na folha do *Eleutherococcus senticosus*) pode ter consequências positivas para os atletas devido a um efeito poupador de glicogênio e aumento no limiar anaeróbio.

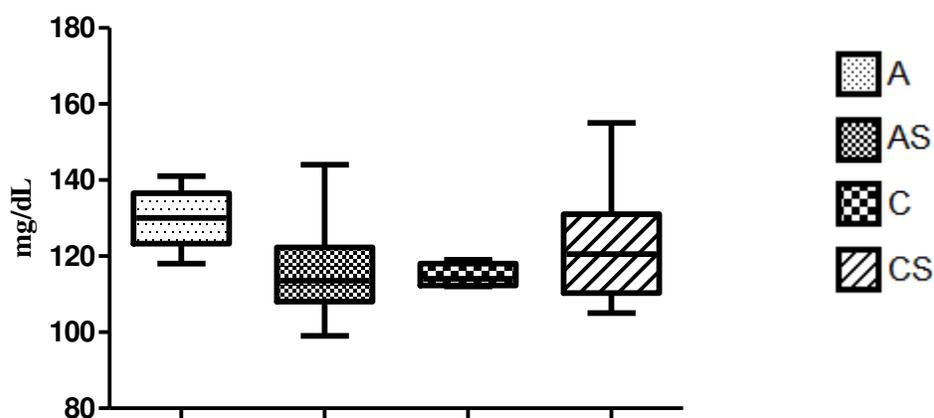
A média dos valores para concentração de glicogênio no músculo sóleo em ratos que participaram dos Testes de *Performance* em nosso estudo foi de  $0,225 \pm 0,02$  (mg/100mg), maior que o encontrado no estudo de Voltarelli et al. (2004), quando submeteu animais alimentados ao treinamento de natação ( $0,092 \pm 0,03$  mg/100mg).

Não observamos efeito hipoglicemiante utilizando *Eleutherococcus senticosus* entre os diferentes tratamentos, mas o fato de não ter aplicado o jejum antes do momento do sacrifício dos animais, nos impossibilitou uma análise mais criteriosa. Isto ocorreu devido às outras análises, onde os resultados poderiam ser afetados com o jejum dos animais. Dantas et al. (2006), em um estudo investigando a glicemia no estado alimentado de 64 ratos Wistar, demonstraram os valores de  $136 \pm 11,3$  mg/dL, enquanto em nosso trabalho o valor foi de  $120,81 \pm 3,47$  mg/dL.

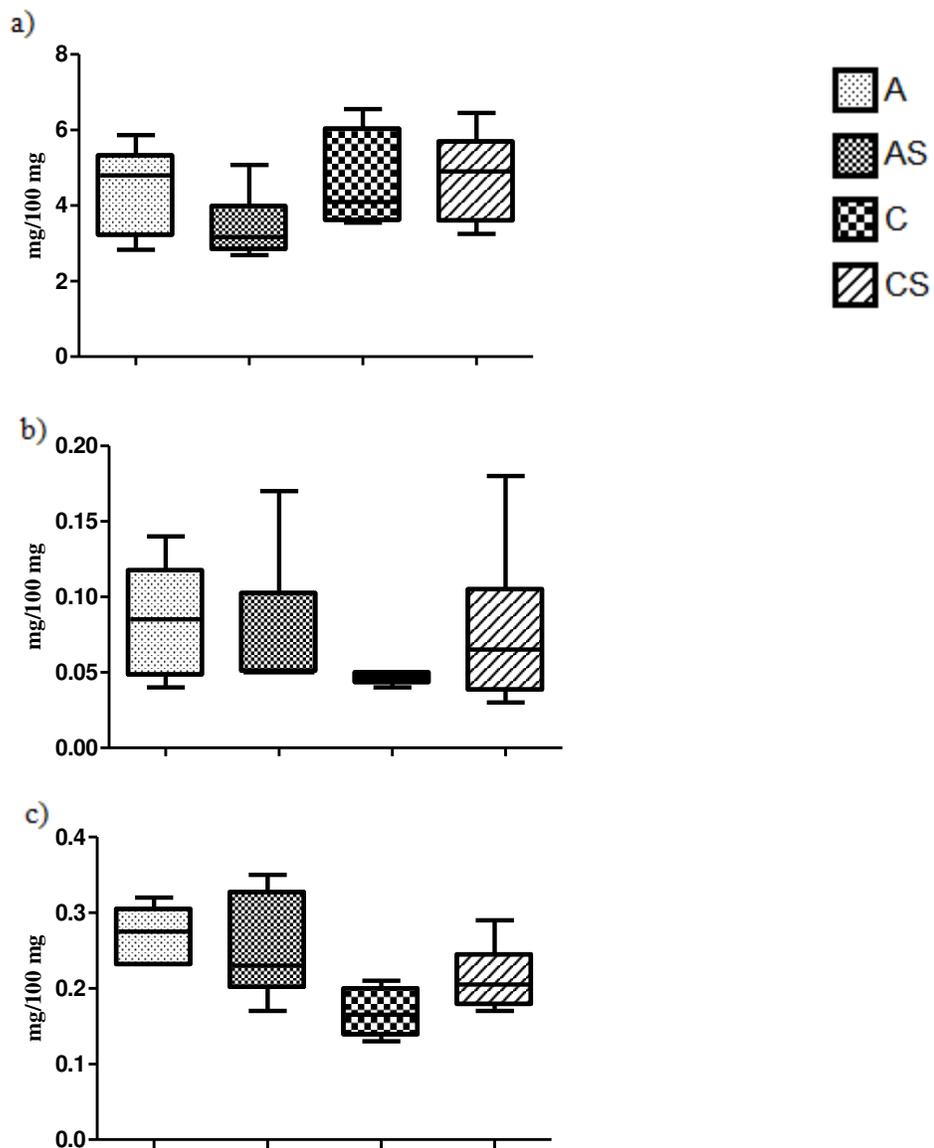
Uma grande quantidade de pesquisas revelou que o *Panax ginseng* pode diminuir as concentrações de glicose sanguínea em animais normais e hiperglicêmicos devido à ação dos glicopeptídeos presentes nos polissacarídeos do ginseng. Os polissacarídeos contêm 1,6% a 27% de glicopeptídeos, e segundo pesquisadores, esta é uma quantidade considerável (WANG et al., 2003). Da mesma forma, o *Eleutherococcus senticosus* possui 6 glicanas (compostos eleuterossídeos) em seus polissacarídeos com propriedade hipoglicemiante (HIKINO et al., 1986).

A homeostasia metabólica é essencial e determinante da *performance* no exercício, neste contexto, tem sido sugerido que o ginseng Siberiano (*Eleutherococcus senticosus*) possa ter efeito ergogênico, uma vez que, seus componentes químicos podem exercer ação expressiva no metabolismo energético (BAHRKE; MORGAN, 2000). Dentre os substratos que podem estar envolvidos na ação do ginseng é sugestivo o aumento na utilização de lipídeos, com efeito poupador dos estoques de glicogênio (ESCHBACH et al., 2000).

De acordo com nossos resultados, para as concentrações de glicogênio nos músculos gastrocnêmio branco (representado pelas fibras glicolíticas) e sóleo (representado pelas fibras oxidativas), observamos um maior domínio das médias do grupo CS em relação ao grupo C, que, apesar de não apresentar diferença estatística, indica uma tendência à supercompensação, contribuindo para a maior concentração de glicogênio nas fibras musculares. Este efeito da supercompensação também poderia justificar a melhor *performance* do grupo CS nos testes de *performance* 2 e 3.



**Figura 16.** Concentração plasmática de glicose realizada antes da eutanásia Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6..



**Figura 17.** Análises de concentração do glicogênio hepático (a), e nos músculos gastrocnêmio branco (b) e sóleo (c). Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.

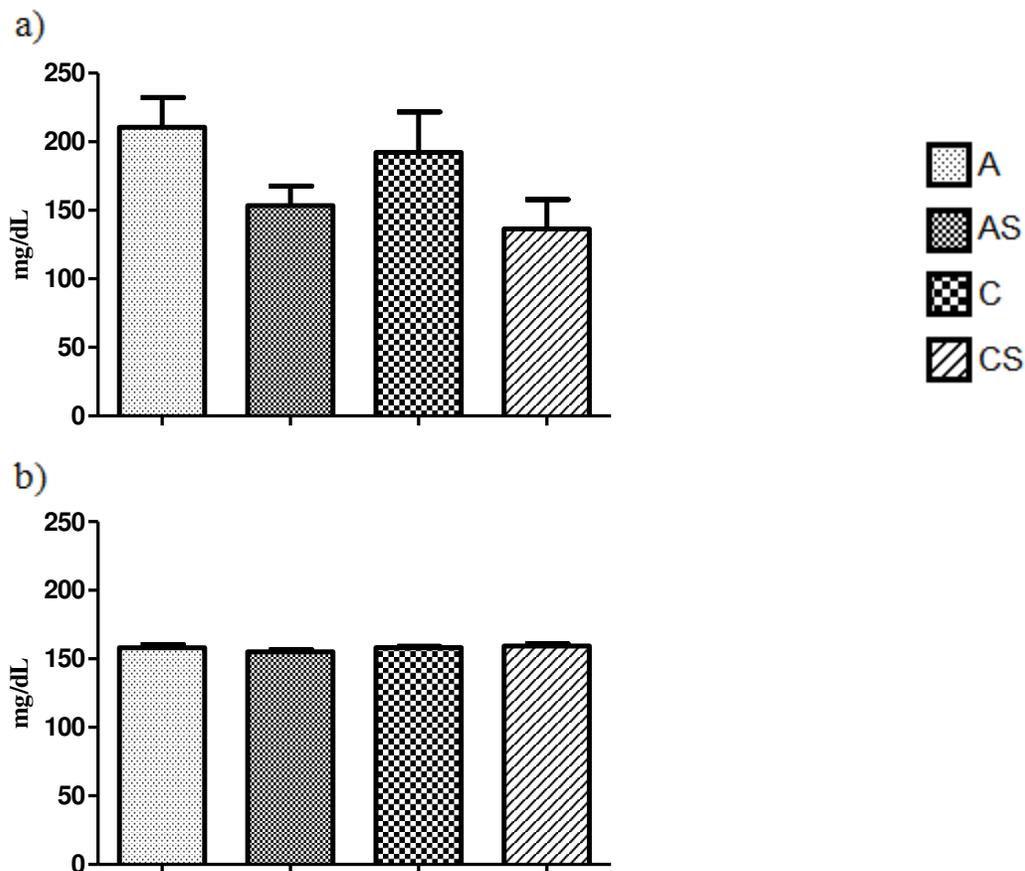
### Análise de Perfil Lipídico

Através da sinalização de alguns hormônios em algumas condições, tais como baixa ingestão calórica, jejum, ou em atividade física intensa, ocorre a mobilização da reserva dos

triacilgliceróis e sua consequente degradação. O triacilglicerol presente nos adipócitos é hidrolisado em glicerol e ácidos graxos através da ação catalítica da enzima lipase lipoproteica (LPL) (BELMONTE & AOKI, 2005). A partir da sua hidrólise, uma parcela dos ácidos graxos liberados é captada pelas células do tecido muscular, e o restante é carregado para a corrente sanguínea ligada à albumina plasmática para suprir a demanda energética de outros tecidos. O ácido graxo seja proveniente do tecido adiposo ou do triacilglicerol encontrado nas lipoproteínas, uma vez captado pelo músculo, ele pode ser reesterificado ou sofrer oxidação na mitocôndria para contribuir com o fornecimento de energia (BELMONTE, 2005).

Uma vez que o metabolismo de substratos é fundamental à *performance* do exercício, o ginseng Siberiano pode ter efeito ergogênico por promover um aumento na utilização de gordura como fonte de energia, com subsequente efeito poupador dos estoques de glicogênio, como sugerido no trabalho de Eschbach (2000) em humanos. Bahrke e Morgan (2000) evidenciaram a eficácia do ginseng na *performance* a partir de estudos com animais, enquanto que Kim e Park (2003) estudando os efeitos do *Panax ginseng* (PG) sobre o metabolismo lipídico em humanos, e observaram diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol total (CT), triacilglicerol (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL), e aumento do HDL (lipoproteína de alta densidade), quando foi administrado *Panax ginseng* durante 8 semanas (6g/dia). Estes resultados afirmam que o *Panax ginseng* tem um potencial efeito hipolipidêmico.

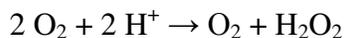
Não houve diferença significativa entre os diferentes tipos de tratamento no perfil lipídico dos animais. Comparando as concentrações de triacilgliceróis (173,14±17,08 mg/dL) e colesterol total (157,64±0,92 mg/dL) de nosso trabalho, com as concentrações de triacilgliceróis (n=38, 83±24,7 mg/dL) e colesterol total (n=51, 87±18,1 mg/dL) da pesquisa de Dantas et al. (2006), observamos que nossos valores encontram-se elevados.



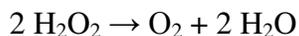
**Figura 18.** Concentração plasmática de triacilglicerol (a) e colesterol total (b) analisados em todos os grupos antes da eutanásia. Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.

### Análise de Biomarcadores de Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas principalmente durante o exercício e apresentam grande capacidade reativa resultando em inúmeros danos celulares. Dentre as EROs o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é a partícula precursora para que outras moléculas oxidativas sejam formadas. O radical superóxido pode ser dismutado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) principalmente pela ação catalítica da enzima superóxido dismutase (SOD) (ARAÚJO, 2010). A SOD tem como principal função reduzir as espécies reativas de oxigênio combatendo principalmente a ação do radical superóxido:



Após a ação da SOD a enzima catalase consegue agir transformando efetivamente o peróxido de hidrogênio formado em moléculas de água e oxigênio (CHANCE et al., 1979):



A análise estatística dos resultados das concentrações de TBARS realizadas no músculo e no plasma, não indicaram diferenças significativas, porém, há de se considerar que se direcionarmos a análise tendo como referencial as medianas dos grupos e ao se aplicar o método de Análise de Magnitude de Efeito (COHEN, 1970), verifica-se que a concentração de TBARS no gastrocnêmio vermelho do grupo Corrida Suplementado apresenta domínio das médias 98% menor em relação ao grupo Corrida, demonstrando uma tendência a redução das espécies reativas de oxigênio, assim, este pode ser o fenômeno que tenha propiciado a melhora do desempenho deste grupo nos testes de *performance 2 e 3*.

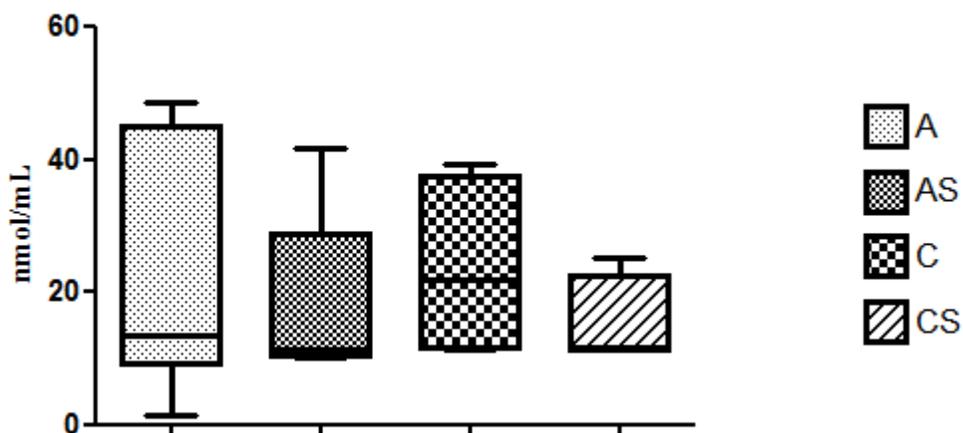
Por sua vez, nos resultados da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), observamos uma tendência ao aumento na atividade dessas enzimas manifesto no grupo Adaptado Suplementado se comparado ao grupo Adaptado. Ao aplicarmos o método de Análise de Magnitude de Efeito no grupo Corrida Suplementado, foi observado aumento de 88% do domínio das médias em relação ao grupo Corrida, para a análise da enzima SOD.

Utilizando outro tipo de ginseng como o *Panax ginseng*, Chang et al. (1999) demonstraram diminuição da produção dos radicais livres, devido ao fato de que algumas frações de ginsenosídeos (tal como o panaxadiol Rb2) presentes no *Panax ginseng*, aumentaram 2 a 3 vezes a transcrição dos genes das enzimas Cu/ZnSOD (SOD1) e catalase.

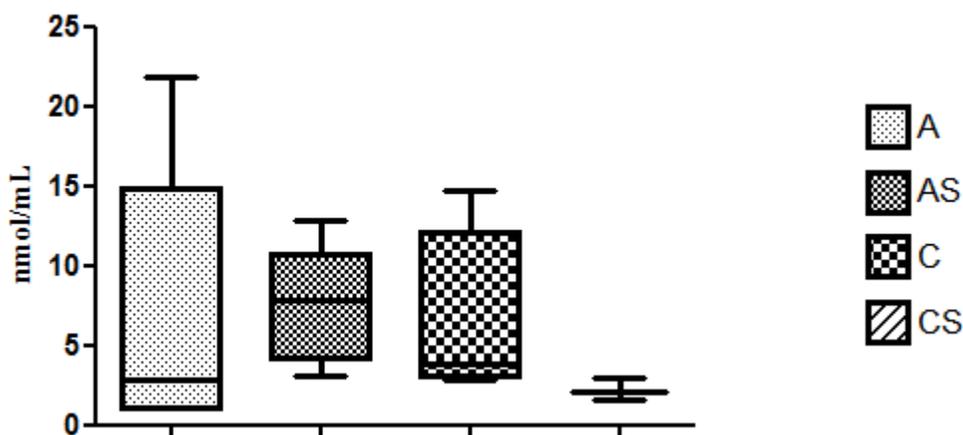
Em humanos, Kim e Park (2003) demonstraram um significativo aumento da atividade enzimática antioxidante da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) utilizando *Panax ginseng*.

Outro estudo, investigando o tratamento prolongado com extrato padronizado de *Panax ginseng* (G115) em ratos submetidos a exercícios em esteira de corrida sobre a capacidade antioxidante do fígado, foi demonstrado que a administração do G115 nos ratos tratados aumentou significativamente os níveis da atividade da enzima SOD (VOCES et al., 1999).

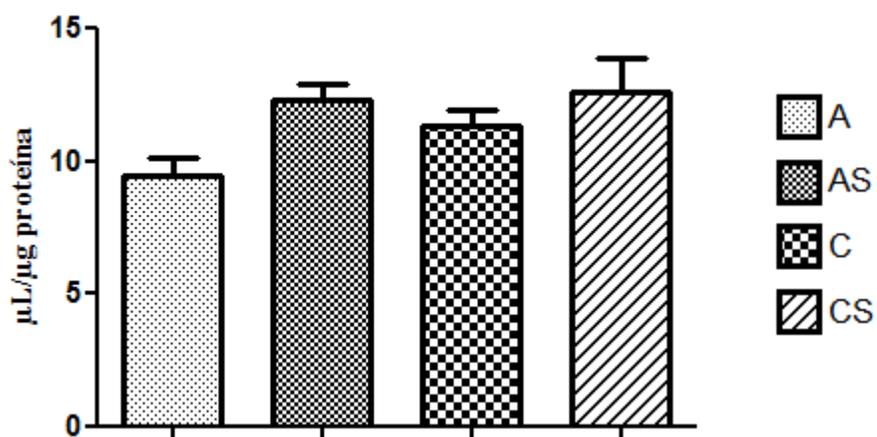
Li et al. (2009), em um trabalho utilizando polissacarídeos do *Panax ginseng* sobre a proteção mitocondrial, verificou que as concentrações de malondialdeído foram inibidas no cérebro de camundongos, demonstrando que estes polissacarídeos possuem um importante efeito antioxidante.



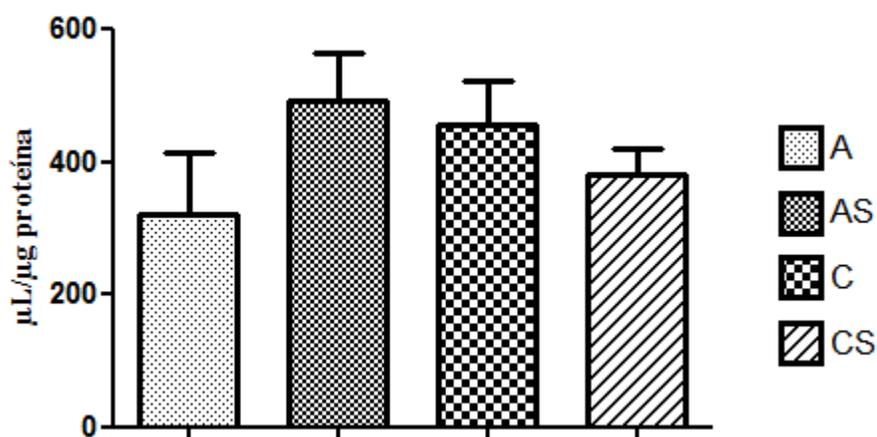
**Figura 19.** Concentração plasmática de TBARS. Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.



**Figura 20.** Concentração de TBARS no músculo gastrocnêmio vermelho. Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.



**Figura 21.** Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) no músculo gastrocnêmio vermelho. Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.



**Figura 22.** Atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) no eritrócito, analisada em todos os grupos. Adaptado (A), n=6; Adaptado Suplementado (AS), n=6; Corrida (C), n=4 e Corrida Suplementado (CS), n=6.

## **Efeitos Toxicológicos**

Em geral, os estudos utilizando animais para observar efeitos de toxicidade do ginseng o consideraram muito seguro, sem demonstrar teratogenicidade ou mutagenicidade (BAHRKE & MORGAN, 1994). Um caso foi relatado sobre a utilização de *Eleutherococcus senticosus* em um homem que fazia uso de digoxina, a qual a concentração plasmática (digoxina) foi elevada, e quando foi parada a suplementação, ela foi diminuída (HUANG et al., 2011). Os diabéticos que utilizam *Eleutherococcus senticosus* devem monitorar as concentrações de glicose sanguínea, devido aos efeitos hipoglicemiantes reportados em animais (BRINKER, 1998). As pesquisas têm demonstrado que o *Eleutherococcus senticosus* utilizado nas doses recomendadas não alteram significativamente o metabolismo das enzimas da via de detoxificação, CYP3A4 ou CYP2D6 (MARKOWITZ et al., 2003).

## **Considerações Nutricionais**

Esta pesquisa foi realizada com o intuito de obter e socializar informações sobre os efeitos do extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus* aos profissionais da área de saúde, em especial a nutricionistas, visando a possibilidade de recomendação da utilização deste suplemento a atletas e/ou população.

De acordo com os resultados obtidos, Ginseng siberiano pode ser considerado um suplemento nutricional com auxílio ergogênico, visto que exerceu efeito sobre o metabolismo energético, e pode contribuir para a melhora da qualidade de vida especialmente em atletas de *endurance*, os quais estão mais expostos a produção de espécies reativas de oxigênio devido a maior contribuição do metabolismo aeróbio para produção de energia.

Pesquisas indicam que os efeitos da suplementação de *Eleutherococcus senticosus* em humanos, assim como de *Panax ginseng*, podem ser observados desde que consumidos em doses suficientes e de maneira crônica, a partir de 8 semanas (BUCCI, 2000). Quando administrado na dose de 200 a 400 mg por dia, durante 6 a 8 semanas, com intervalo de pausa de 2 semanas antes da continuidade do fitoterápico (BROWN, 2000; BUCCI, 2000)

o composto não oferece risco à saúde, entretanto, as individualidades fisiológicas e bioquímicas deverão sempre ser levadas em consideração antes da sua prescrição, bem como o acompanhamento observando possíveis reações adversas, cabendo ao profissional a avaliação dos efeitos da sua utilização, e os benefícios propiciados ao indivíduo.

A ingestão de produtos de ginseng, não resulta em resultados positivos para substâncias proibidas após teste de urina tornando viável a sua recomendação aos atletas (BUCCI, 2000).

### **Conclusões**

A suplementação com *Eleutherococcus senticosus* na presente pesquisa:

1 - Foi eficiente em melhorar a *performance* no grupo Corrida Suplementado (CS) no segundo e no terceiro teste de *performance*.

2 – Diminuiu significativamente o ganho de peso no grupo Adaptado Suplementado quando comparado com o grupo Adaptado ingerindo a mesma quantidade de ração/dia, da mesma forma que o protocolo de treino no grupo Corrida.

3 - Potencializou o efeito do exercício no grupo CS, exercendo importante diminuição no ganho de peso comparado com o grupo Adaptado.

4 – Diminuiu significativamente a área dos adipócitos do pânículo epididimal no grupo Adaptado Suplementado.

5 – Diminuiu produção de espécies reativas de oxigênio no músculo dos animais do grupo CS através do método de Análise de Magnitude de Efeito de Cohen (1970).

### **Dificuldades encontradas**

Houve perda amostral de 2 animais representantes do grupo Corrida.

## Referências Bibliográficas

- ALESSIO HM, GOLDFARB AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *J Appl Physiol*. 1988;64(4):1333-6.
- ALEXANDER RM. Models and the scaling of energy costs for locomotion. *J. Exp. Biol*. 2005;208:1645-1652.
- ANDRADE FH, REID MB, ALLEN DG, WESTERBLAD H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *Journal Physiol*. 1988;509(2):565-75.
- APERS S, NAESSENS T, VAN MIERT S, PIETERS L, VLIETINCK A. Quality control of roots of *Eleutherococcus senticosus* by HPLC. *Phytochemical Analysis*. 2005;16:55-60.
- APPLE, F.S., HELLSTEN, Y., CLARKSON, P.M. Early detection of skeletal muscle injury by assay of creatine kinase MM isoforms in serum after acute exercise. *Clin. Chem*. 1988;32:41-44.
- ARAÚJO GG. Efeitos de quatro modelos de treinamento experimental de natação sobre biomarcadores de adaptação e capacidades aeróbia e anaeróbia em ratos wistar. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil, 2010.
- ATELLE AS, WU JA, YUAN C. *Ginseng* pharmacology, multiple constituents and multiple actions. *Biochemical Pharmacology*. 1999;58:1685-1693.
- BAHRKE MS, MORGAN WP. Evaluation of the ergogenic properties of ginseng. *Sports Med*. 1994;18:229-48.
- BAHRKE MS, MORGAN WP. Evaluation of the ergogenic properties of ginseng. *Sports Medicin*, 2000;(2):113-133.
- BAHRKE MS, MORGAN WP, STEGNER A. Is Ginseng an Ergogenic Aid? *Internacional Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 2009;(19):298-322.
- BARANOV, AI. Medicinal uses of ginseng and related plants of the Soviet Union: recent trends in the Soviet literature. *Journal Ethnopharmacol*. 1982;6:339-353.

- BARROS MM. Efeito da natação sobre a sensibilidade da resposta lipolítica às catecolaminas. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 2003.
- BELMONTE MA, AOKI MS. Triacilglicerol intramuscular: um importante substrato energético para o exercício de endurance. *Revista Brasileira de Medicina no Esporte*. 2005; Vol 11, N°2.
- BERG A, FREY I, BAUMSTARK MW, HALLE M, KEUL J. Physical activity and lipoprotein lipid disorders. *Sports Med*. 1994;17:6-21.
- BOON H, SMITH M. The Botanical Pharmacy. *Quarry Press*. 1999:194.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
- BRINKER F. Herb contraindications and drug interactions. 2<sup>nd</sup> ed. Sany, OR: Eclectic Medical Publications; 1998:123.
- BROOKS GA. Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research. *Med Sci Sports Exerc.*, 1985;17:22.
- BROSEN K. Drug-metabolizing enzymes and therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Ther. Drug Monit*. 1996;18:393-396.
- BROWN DJ. Herbal prescriptions for healing and health. Roseville, CA: Prima Publishing. 2000;94.
- BUCCI LR. Selected herbals and human exercise performance. *Am Journal Clin Nutr*. 2000;72(2):624-636.
- BURKE LM, READ RS. Dietary supplements in sport. *Sports Med*. 1993; 15(1):43-65.
- CABRAL DE OLIVEIRA AC, PEREZ AC, PRIETO JG, DUARTE IDG, ALVAREZ AI. Protection of Panax ginseng in injured muscles after eccentric exercise. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 97:211-214.
- CAIRNS SP. Lactic acid and exercise performance. Culprit or friend? *Sports Med*. 2006;36(4):279-291.
- CAMPBELL TC, WU YN, LU CQ, LI M, KAMAN RL. Effects of Radix *Acanthopanax senticosis* (ciwujia) on exercise. *J Strength Con Res*. 1997;11:278.

- CARVALHO T. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares, e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. Mar/Abr 2003. Volume 9 n° 2.
- CHANCE B, SIES H, BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979;59(3):527-605.
- CHANG, MS, LEE SG, RHO HM. Transcriptional Activation of Cu/Zn Superoxide Dismutase and Catalase Genes by Panaxadiol Ginsenosides Extracted from *Panax ginseng*. *Phytotherapy Research*. 1999; v.13, p. 641–644.
- CHOI HS, KIM YH, HAN JH, PARK SH. Effects of *Eleutherococcus senticosus* and several oriental medicinal herbs extracts on serum lipid concentrations. *Korean J. Food Nutr*. 2008;21:210-217.
- CLANTON TL, ZUO LI, KLAWITTER P. Oxidants and skeletal muscle function: Physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exper Biol Med*. 1999;222:253-62.
- CLARKSON, P.M. and TREMBLAY, I. Exercise-Induced muscle damage, repair and adaptations in humans. *J. Appl. Physiol*. 1988;65:1-6.
- COHEN G, DEMBIEC D, MARCUS J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochem*. 1970;34: 30-38.
- COSTA SS. Avaliação morfológica do adipócito e da adipogênese no omento transposto para a mama. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2010.
- CROW JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*. 1997;1:145-157.
- DANTAS JA, AMBIEL CR, CUMAN RKN, BARONI S, BERSANI-AMADO CA. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Sci. Health Sci*. 2006;28(2):165-170.
- DAVYDOV M, KRIKORIAN AD. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;72:345-393.

- DIAS RG, WOLF-NUNES V, MIOTTO AM, SPADARI-BRATFISCH RC, GRASSI-KASSISSE DM. O exercício físico na prevenção das dislipidemias induzida pela dieta em ratos. In:Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE, 2002, Salvador/BA. XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2002.
- DONOVAN JL, DEVANE CL, CHAVIN KD, TAYLOR RM, MARKOWITZ JS. Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) effects on CYP2D6 and CYP3A4 activity in normal volunteers. *Drug Metab. Dispos.* 2003;31:519-522.
- DONOVAN CM, BROOKS GA. Endurance training affects lactate clearance, not lactate production. *Am J Physiol.* 1983;244(Endocrinol. Metab.7):E83.
- DUBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS PA, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956;28:350-356.
- ELYAKOV GB, STRIGINA LI, UVAROVA NI, *et al.* Glycosides from ginseng roots. *Tetrahedron Lett.* 1964;48:3591-7.
- ERNSTER L. Oxygen as an environmental poison. *Chem Scripta.* 1986;26:525-534.
- ESCHBACH LC, WEBSTER MJ, BOYD JC, McARTHUR PD, EVETOVICH TK. The effect of Siberiano ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) on substrate utilization and performance during prolonged cycling. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 2000;10:444-451.
- ESTRELA HFG. Reatividade Vascular de anéis de aorta isolada de ratos normo ou hiperlipidêmicos, adaptados ou submetidos à natação. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 2007.
- FARIAS-SILVA E. Aspectos moleculares, funcionais e comportamentais envolvidos nas alterações metabólicas desencadeadas pelo estresse. **Tese de Doutorado.** Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 2003.
- FARIAS-SILVA E, DOS SANTOS IN, COREZOLA DO AMARAL ME, GRASSI-KASSISSE DM, SPADARI-BRATFISCH RC. Glucocorticoid receptor and Beta-adrenoceptor expression in epididymal adipose tissue from stressed rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1018:328-332.

- FARIAS-SILVA E, GRASSI-KASSISSE DM, WOLF-NUNES V, SPADARI-BRATFISCH RC. Stress-induced alteration in the lipolytic response to beta-adrenoceptor agonist in rat white adipocytes. *J Lipid Res.* 1999;40(9):1719-27.
- FARIAS-SILVA E, SAMPAIO-BARROS MM, AMARAL ME, CARNEIRO EM, BOSCHERO AC, GRASSI-KASSISSE DM, SPADARI-BRATFISCH RC. Subsensitivy to insulin in adipocytes from rats submitted to foot-shock stress. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80(8):782-9.
- FENG SL, HU FD, ZHAO JX, LI Y. Determination of eleutheroside E and eleutheroside E in rat plasma and tissue by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and photodiode array detection. *European Journal of Pharmaceutics.* 2005;62:315-320.
- FINAUD J, LAC G, FILAIRE E. Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. *Sports Medicin.* 2006;36(4):327-358.
- FORGO I, KIRCHDORFER AM. The effect of different ginsenoside concentrations on physical work capacity. *Notabene Med.*, v.12, p.721-727, 1982.
- FUKAI T, USHIO-FUKAI M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15:15(6):1583-606.
- GAFFEY BT, HÜGEL HM, RICH PA. Panax Ginseng and Eleutherococcus senticosus may exaggerate an already existing biphasic response to stress via inhibition of enzymes which limit the binding of stress hormones to their receptors. *Medical Hypotheses* 2001 56(5), 567-572.
- GALLER S, HILBER K, GOBESBERGER A. Effects of nitric oxide on force-generating proteins of skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 1997;434:242-245.
- GOBATTO CA. Alterações metabólicas decorrentes do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 1993.
- GOBATTO CA, DE MELLO MAR, MANCHADO-GOBATTO FB, PAPOTI M, VOLTARELLI FA, CONTARTEZE RVL, ARAUJO GG. Avaliações fisiológicas adaptadas à roedores: aplicações ao treinamento em diferentes modelos experimentais. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte.* 2008;7(1):137-147.

- GOBATTO CA, DE MELLO MAR, SIBUYA CY, DE AZEVEDO JRM, DOS SANTOS LA, KOKUBUM E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol* 2001; Part A 130: 21-27.
- GOHIL K, VIGUIE C, STANLEY WC, BROOKS GA, PACKER L. Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol*. 1988;64(1):115-119.
- GOULET EDB, DIONNE IJ. Assessment of the effects of *Eleutherococcus senticosus* on endurance performance. *International Journal of Sport and Metabolism*, 2005;14:75-83.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989. p. 136-158.
- HALLIWELL B, ZHAO K, WHITEMAN M. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Rad. Res*. v.31,n.6,p.651-659,1999.
- HARDMAN AE. The influence of exercise on postprandial triacylglycerol metabolism. *Atherosclerosis*. 1998;141:S93-S100.
- HATORE ET. Efeito da intensidade do estresse sobre biomarcadores metabólicos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 2006.
- HIKINO H, TAKAHASHI M, OTAKE K, KONNO C. Isolation and hypoglycemic activity of eleutherans A, B, C, D, E, F, and G: glycans of *Eleutherococcus senticosus* roots. *Journal of Natural Products*. 1986; 49(2):293-297.
- HOHL R. Padronização de um modelo de indução de overreaching em ratos: desenvolvimento e perspectivas de investigação em natação e esteira. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 2007.
- HOHL R, FERRARESSO RLP, OLIVEIRA RB, LUCCO R, BREZIKOFER R, MACEDO DV. Development and characterization of an overtraining animal model. *Med Sci Sports Exercise*. 2009;41(5):1155-1163.
- HOROWITZ JF, KLEIN S. Lipid metabolism during exercise. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:S558-63.

- HOROWITZ JF, KLEIN S. Lipid metabolism during exercise. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:S558-563.
- HUANG LZ, ZHAO HF, HUANG BK, ZHENG CJ, PENG W, QIN LP. *Acanthopanax senticosus*: review of botany, chemistry and pharmacology. *Pharmazie.* 2011;66:83-97.
- JEUKENDRUP AE, SARIS WH, WAGENMAKERS AJ. Fat metabolism during exercise: a review. Part I: fatty acid mobilization and muscle metabolism. *Int J Sports Med.* 1998;9:231-44.
- JEUKENDRUP AE. Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;967:217-35.
- JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPÉIA. JO L 328 de 6.12.2008, p. 42.
- JUNG HL, KWAK HE, KIM SS, KIM YC, LEE CD, BYURN HK, KANG HY. Effects of *Panax ginseng* supplementation on muscle damage and inflammation after uphill treadmill running in humans. *Am J Chin Med.* 2011;39(3):441-50.
- KEHRER JP, PARADATHATHU T. The use of fluorescent probes to assess oxidative processes in isolated-perfused rat heart tissue. *Free Rad Res Comm.* 1992;16(4):217-225.
- KIM S-H, PARK K-S. Effects of *Panax ginseng* extract on lipid metabolism in humans. *Pharmacological Research*, v.48, p.511–513, 2003.
- KIMURA Y, SUMIYOSHI M. Effects of various *Eleutherococcus senticosus* cortex on swimming time, natural killer activity and corticosterone level in forced swimming stressed mice. *J. Ethnopharmacol.* 2004;95:447-453.
- KUEHL FAJ, EGAN RW. Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science.* 1980;210:978-984.
- KUO J, CHEN KWC, CHENG IS, TSAI PH, LU YJ, LEE NY. The effect of eight weeks of supplementation with *Eleutherococcus senticosus* on endurance capacity and metabolism in human. *Chinese Journal of Physiology.* 2010;53(2):105-111.
- LUND P. L-glutamine and L-glutamate. *Methods of Enzymatic Analysis*, v.3, Metabolites 3 – Lipids, Aminoacids and Related Compounds, Bergmeyer J and Bergmeyer H.U. 1985:357-363.

- LI XT, CHEN R, JIN LM, CHEN HY. Regulation on energy metabolism and protection on mitochondria of *Panax ginseng* polysaccharide. *Am J Chin Med*. 2009;37(6):1139-52.
- LIU J, YEO HC, OVERVIK-DOUKI E, HAGEN T, DONIGER SJ, CHU DW, BROOKS GA, AMES BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl Physiol*. 2000;89:21-28.
- MACEDO DV, LAZARIM FL, SILVA FOC, TESSUTI LS, HOHL R. Is lactate responsible or not for muscle fatigue? *Advances in Physiology Education*. 2009;33:302-307.
- MACHADO EFA, NORMAND ACR, NUNES LAS, BREZIKOFER R, MACEDO DV. Effects of different general anesthetics on serum hemolysis and hepatic and muscular glycogenolysis in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(x).
- MANCHADO FB, GOBATO CA, CONTARTEZE RVL, PAPOTI M, MELLO MAR. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2006; v.2, n.5.
- MARKOWITZ JS, DONOVAN JL, DE VANE CL, et al. Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) effects on CYP2D6 and CYP3A4 activity in normal volunteers. *Am Soc Pharmacol Exp Ther*. 2003;31:519-522.
- MARQUES RFR. Esporte e qualidade de vida: reflexão sociológica. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 2007.
- MARTIN III WH. Effects of acute and chronic exercise on fat metabolism. *Exerc Sports Sci Rev*. 1996;24:203-31.
- MARTINELLI TCP. Captação de glicose in vivo e in vitro em ratos dislipidêmicos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 2009.
- MARZZOCO A, TORRES BB.: *Bioquímica Básica*, 3ª Edição. Rio de Janeiro, Editora Ganabara Koogan, 2007.
- McARDLE, W.D., MONTROYE, H.J. Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. *J. Appl. Physiol*. 1966;21(4):1431-1434.

- MIHARA M, UCHIYAMA M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anan. Biochem.* 1978;86(1):271-8.
- MOREIRA MF. Sensibilidade adrenérgica de átrios direitos isolados de ratos normo ou hiperlipidêmicos sedentários ou submetidos à natação. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 2005.
- MUN SC, SEOK GL, HYUNE MR. Transcriptional Activation of Cu/Zn Superoxide Dismutase and Catalase Genes by Panaxadiol Ginsenosides Extracted from Panax ginseng. *Phytother. Res.* 1999;13:641–644.
- NISHIBE S, KINOSHITA H, TAKEDA H, OKANO G. Phenolic compounds from stem bark of *Acanthopanax senticosus* and their pharmacological effect in chronic swimming stressed rats. *Chem. Pharm. Bull.* 1990;38:1763-1765.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979;95(2):351-358.
- OLFERT BM, CROSS AA, WILLIAM MC. Guide to the Care and Use of experimental animals. *Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Ontario*, 1993;213.
- PAPOTI M, ALMEIDA FBL, PRADA FJA, ELENO TG, HERMINI HÁ, GOBATTO CA, MELLO MAR. Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição protéica. *Motriz, Rio Claro.* 2003; v.9, n.2, p.103-110.
- PINHEIRO DC, SOUSA-FRANCESCONI EPM, DE ALMEIDA J, GRASSI-KASSISSE DM. Análise morfológica de adipócitos isolados de regiões mesentérica, epididimal e peri-renal de ratos submetidos a estresse. Congresso Interno de Iniciação Científica, Unicamp, 2007.
- PITANGA FJG. Atividade física e lipoproteínas plasmáticas em adultos de ambos os sexos. *Revista Brasileira de Ciências e Movimento.* 2001;9(4):25-31.
- PYNE DB. Regulation of neurotrophin function during exercise. *Sports Med.* 1994;17:245-258.
- REID MB, HAACK KE, FRANCKE KM, VALBERG PA, KOBZIK L, WEST MS. Reactive oxygen in skeletal muscle. Intracellular oxidant kinetics and fatigue *in vitro.* *J Appl Physiol.* 1992;73(5):1797-804.

- RENNIE MJ, BOHÉ J, SMITH K, WACKERHAGE H, GREENHAFF P. Branched-Chain Amino Acids as Fuels and Anabolic Signals in Human Muscle. *Journal Nutrition*. 2006;136:264s-268s.
- RHIE SG, WON HR. Effect of hot water soluble extract from *Eleutherococcus senticosus* and dietary carnitine on the lipid metabolism and antioxidant defense system of rats on hypercholesterol diet. *Korean J. Comm. Living Sci*. 2004;15:105-113.
- ROBERGS R. Exercise-induced metabolic acidosis: where do the protons come from? *Sportscience*. 2001;5(2)
- ROBERGS RA, GHIASVAND F, PARKER D. Lingering construct of lactic acidosis. *Am J Physiol*. 2005;289:R904-10.
- ROBERGS RA, GHIASVAND F, PARKER D. Biochemistry of exercise-induced acidosis. *Am J Physiol*. 2004;287:R502-16.
- RODBELL M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem*. 1964;239:375-380.
- SALERNO AG, SILVA TR, AMARAL ME, ALBERICI LC, BONFLEUR ML, PATRÍCIO PR, FRANCESCONI EP, GRASSI-KASSISSE DM, VERCESI AE, BOSCHERO AC, OLIVEIRA HC. Overexpression of apolipoprotein CIII increases and CETP reverses diet-induced obesity in transgenic mice. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31(10):1586-1595.
- SAMPAIO-BARROS MM, FARIAS-SILVA E, GRASSI-KASSISSE DM, SPADARI-BRATFISCH RC. Effect of swimming session duration and repetition on metabolic markers in rats. *Stress*. 2003;6(2):127-32.
- SCHRADER M, FAHIMI HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1763(12):1755-66.
- SCHRECK R, ALBERMANN KAJ, BAEUERLE PA. Nuclear factor  $\kappa$ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cell (a review). *Free Rad Res Comm*. 1992;17:221-237.
- SIES H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*. 1991;91(3C):31S-38S.

- SILVA FOC. Treinamento físico, processo inflamatório e adaptação. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 2009.
- SILVEIRA L. Considerações Críticas e Metodológicas na Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio em Células Musculares Durante Contrações. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004; 48 – n6.
- SMITH LL. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? *J Strength Cond Res*. 2004;18:185-193.
- SONG YJ, HAN DS, OH SW, PAIK IY, PARK TS. Effect of dietary supplementation of *Eleutherococcus senticosus*, taurine and carnitine on endurance exercise performance in rats. *Korean J. Nutr*. 2002;35:825-833.
- SPRIET LL, WATT MJ. Regulatory mechanisms in the interaction between carbohydrate and lipid oxidation during exercise. *Acta Physiol Scand*. 2003;178:443-52.
- SZOŁOMICKI S, SAMOCHOWIEC L, WÓJCICKI J, DROZDZIK M. The influence of active components of *Eleutherococcus senticosus* on cellular defence and physical fitness in man. *Phytother Res*. 2000;14:30-35.
- TANG B, WANG Y, CHEN ZZ. Catalytic spectrofluorimetric determination of superoxide anion radical and superoxide dismutase activity using N,N-dimethylaniline as the substrate for horseradish peroxidase (HRP). *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2002;58(12):2557-62.
- VERAGO JL, GRASSI-KASSISSE DM, SPADARI-BRATFISCH RC. Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in footshock-stressed rats. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(9):1197-207.
- VOCES J, ALVAREZ AI, VILA L, FERRANDO A, CABRAL C, PRIETO JG. Effects of administration of the standardized *Panax ginseng* extract G115 on hepatic antioxidant function after exhaustive exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1999;123:175-184.
- VOLTARELLI FA, GOBATTO CA, MELLO MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*. 2002;35:1389-1394.

- VOLTARELLI FA, MELLO MAR, GOBATTO CA. Glicogênio muscular e limiar anaeróbio determinado em ratos durante a natação. *Motriz, Rio Claro*. 2004;10(1):25-30.
- WAGNER H, NORR H, WINTERHOFF H. Plant adaptogens. *Phytomedicine*. 1994;1:63-76.
- WANG BX, ZHOU QL, YANG M, WANG Y, CUI ZY, LIU YQ, IKEJIMA T. Hypoglycemic activity of ginseng glycopeptide. *Acta Pharmacol Sin*. 2003;24(1):50-54.
- WU YN, WANG XQ, ZHAO YF, WANG JZ, CHEN HJ, LIU HZ, LI RW, CAMPBELL TC, CHEN JS. Effect of ciwujia (*Radix Acanthopanax senticosis*) preparation on human stamina. *Journal Hyg. Res*. 1996;25:57-61.
- YAGI, K. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med*. 1976;15:212-216.
- YAN-LIN S, LIN-DE L, SOON-KWAN H. *Eleutherococcus senticosus* as a crude medicine: Review of biological and pharmacological effects. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011;5(25):5946-5952
- YAT PN, ARNASON JT, AWANG DVC. An improved extraction procedure for the rapid, quantitative high-performance liquid chromatographic estimation of the main eleutherosides (B and E) in *Eleutherococcus* (Eleuthero). *Phytochem Anal*. 1998;9:291-295.
- YU BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994;74:139-61.v
- ZOPPI CC, ANTUNES-NETO J, CATANHO FO, GOULART LF, MOTTA E MOURA N, MACEDO DV. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Rev. paul. Educ. Fís*. 2003;17(2):119-30.

## ANEXOS



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

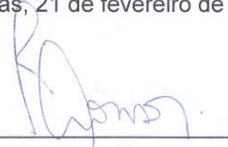
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "O efeito do extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus* sobre a performance em ratos sedentários e submetidos à corrida em esteira, avaliando os biomarcadores de estresse oxidativo e metabólico, estado inflamatório sistêmico, perfil glicídico e lipídico" (protocolo nº 2332-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassisse / Aline Barbedo Arouca, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 21 de fevereiro de 2011.

Campinas, 21 de fevereiro de 2011.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "O efeito do extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus* sobre a performance em ratos adaptados e submetidos a treinamento de corrida em esteira":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

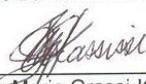
( ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

( X ) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 2332-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

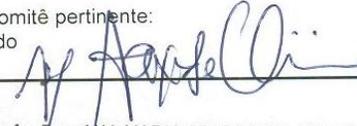
  
Aluno: Aline Barbedo Arouca

  
Orientador: Dorá Maria Grassi-Kassisse

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

  
Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO  
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

## Resultados apresentados em tabelas:

### Avaliação da Performance

**Tabela 1** – Valores resultantes dos testes de *performance* (TP) realizados em ratos de diferentes grupos em momentos distintos (1, 2 e 3).

	TP1	TP2	TP3
Adaptado, n=6	147,33±20,77	240,22±25,94	257,92±18,18
Adaptado Suplementado, n=6	179,23±40,28	299,7±43,15	271,59±44,62
Corrida, n=4	171,06±17,32	392,53±76,52	432,09±29,35
Corrida Suplementado, n=6	237,99±19,72	461,42±34,96	492,20±48,31

Os dados estão apresentados como média e erro padrão das médias.

**Tabela 2.** Lactatemia (mmol/L) avaliada antes (basal), logo após e 5 minutos (5´) após os testes de *performance* (TP) nos momentos 1 e 3.

Grupos	TP1			TP3		
	Basal	Logo após	5´ após	Basal	Logo após	5´ após
A, n=6	3,43±0,18	4,25±0,23	4,88±0,23	2,51±0,32	3,28±0,44	3,46±0,2361
AS, n=6	3,18±0,21	3,05±0,47	3,46±0,29	2,8±0,23	4,65±0,36	3,54±0,36
C, n=4	2,92±0,30	3,57±0,27	2,72±0,33	2,8±0,27	2,62±0,65	3,25±0,41
CS, n=6	3,13±0,63	3,86±0,40	3,6±0,27	3,48±0,36	3,78±0,21	4,03±0,59

Os dados estão apresentados como média e erro padrão das médias de 12 experimentos realizados.

**Tabela 3.** Glicemia (mg/dL) avaliada antes (basal), logo após e 5 minutos (5´) após os testes de *performance* (TP) nos momentos 1 e 3.

Grupos	TP1			TP3		
	Basal	Logo após	5´ após	Basal	Logo após	5´ após
A, n=6	134,8±2,15	142,33±9,52	150,83±16,32	112,83±3,62	137±3,83	159,33±8,69
AS, n=6	110,66±1,25	104,66±11,76	105,16±9,02	106,16±2,63	123,16±4,52	132±3,82
C, n=6	121,75±8,27	135,25±20,39	157,25±8,19	109,25±3,88	122,5±4,55	132±2,85
CS, n=6	110±7,69	164,83±7,83	163,66±9,09	104,16±2,67	137,33±9,08	151,66±7,45

Os dados estão apresentados como média e erro padrão das médias de 12 experimentos realizados.

## Ganho de peso corporal e ingesta alimentar

**Tabela 4** – Valores de peso (em gramas) corporal inicial, final e ganho de peso dos ratos submetidos aos diferentes protocolos de tratamento.

Grupos	Peso inicial (Pi) (gramas)	Peso Final (Pf) (gramas)	Ganho de peso (gramas)
Adaptado, n=6	291,04±8,42	486,33±16,39	195,29±9,18
Adaptado Suplementado, n=6	310,99±4,14	463,94±11,56	152,95±8,30
Corrida, n=4	273,44±2,81	430,60±14,92	157,16±15,15
Corrida Suplementado, n= 6	285,16±6,87	427,74±9,14	142,58±8,06

Os dados estão apresentados como média e erro padrão das médias.

**Tabela 5** – Valores de ingesta de ração padrão (gramas/rato/dia) dos ratos submetidos aos diferentes protocolos de tratamento.

	Gramas de ração padrão/rato/dia
Adaptado, n=6	27,47±0,36
Adaptado Suplementado, n=6	26,73±0,26
Corrida, n=4	25,33±0,28
Corrida Suplementado, n=6	25,28±0,21

Os dados estão apresentados como média e erro padrão das médias.

## Análise morfométrica dos Adipócitos Isolados de diferentes panículos

**Tabela 6** – Medidas de área (a) e diâmetro (b) dos adipócitos isolados dos panículos adiposos epididimais, mesentéricos e peri-renais de ratos submetidos aos diferentes protocolos de tratamento.

a.

Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Epididimal	Mesentérico	Peri-renal
Adaptado, n=6	7.544 $\pm$ 397,83	5.959 $\pm$ 422,30	7.576 $\pm$ 341,73
Adaptado Suplementado, n=6	5.390 $\pm$ 490,10	4.834 $\pm$ 828,76	7.525 $\pm$ 1.344,74
Corrida, n=4	5.594 $\pm$ 405,93	5.050 $\pm$ 839,68	7.685 $\pm$ 1.038,41
Corrida Suplementado, n=6	6.248 $\pm$ 679,88	4.362 $\pm$ 480,93	7.355 $\pm$ 841,40

b.

Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Epididimal	Mesentérico	Perirenal
Adaptado, n=6	93 $\pm$ 2,81	86 $\pm$ 3,00	96 $\pm$ 2,04
Adaptado Suplementado, n=6	80 $\pm$ 4,37	74 $\pm$ 7,32	88 $\pm$ 13,83
Corrida, n=4	83 $\pm$ 3,23	78 $\pm$ 6,58	96 $\pm$ 7,16
Corrida Suplementado, n=6	86 $\pm$ 5,15	72 $\pm$ 4,72	94 $\pm$ 5,62

Os dados estão apresentados como média e erro padrão das médias.



### Análise de Biomarcadores de Estresse Metabólico

**Tabela 7:** Análise de Biomarcadores de Estresse Metabólico

	<i>Concentração Plasmática de Glicose (mg/dL)</i>	<i>Glicogênio Hepático (mg/100mg)</i>	<i>Glicogênio Gastroc. Branco (mg/100mg)</i>	<i>Glicogênio Sóleo (mg/100mg)</i>
Adaptado, n=6	129,83±3,40	4,46±0,47	0,09±0,02	0,27±0,01
Adaptado Suplementado, n=6	116±6,08	3,43±0,36	0,07±0,02	0,25±0,03
Corrida, n=4	114,75±1,54	4,57±0,69	0,05±0,003	0,17±0,02
Corrida Suplementado, n=6	122,66±7,02	4,77±0,49	0,08±0,02	0,21±0,02

Os dados estão apresentados como média e erro padrão das médias.

### Análise de Perfil Lipídico

**Tabela 8:** Análise de Biomarcadores de Perfil Lipídico

	<i>Concentração Plasmática de Triacilgliceróis (TAG) (mg/dL)</i>	<i>Concentração Plasmática de Colesterol Total (CT) (mg/dL)</i>
Adaptado, n=6	210,50±21,65	158±2,30
Adaptado Suplementado, n=6	153,50±14,03	155±1,58
Corrida, n=4	192,25±29,53	158,25±0,75
Corrida Suplementado, n=6	136,33±21,49	159,33±1,60

Os dados estão apresentados como média e erro padrão das médias.

## Análise de Biomarcadores de Estresse Oxidativo

**Tabela 9:** Análise de biomarcadores de estresse oxidativo

	<b>Atividade-CAT nos Eritrócitos-hemolisado</b> ( $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ proteína)	<b>Atividade-SOD Gastro-vermelho</b> ( $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ proteína)	<b>TBARs- Plasma</b> (nmol/mL)	<b>TBARs-gastrocnêmio vermelho</b> (nmol/mL)
Adaptado, n=6	320,19 $\pm$ 95,44	9,48 $\pm$ 0,62	22,09 $\pm$ 7,86	6,93 $\pm$ 3,59
Adaptado Suplementado, n=6	455,56 $\pm$ 54,54	12,31 $\pm$ 0,60	18,20 $\pm$ 5,19	7,55 $\pm$ 1,50
Corrida, n=4	457,72 $\pm$ 65,54	11,33 $\pm$ 0,62	23,66 $\pm$ 7,15	6,36 $\pm$ 2,82
Corrida Suplementado, n=6	462,60 $\pm$ 9,88	12,61 $\pm$ 1,28	15,36 $\pm$ 2,58	2,24 $\pm$ 0,27

Os dados estão apresentados como média e erro padrão das médias.

### Efeitos de alguns tipos de ginseng sobre a performance física em humanos:

Referência	Participantes	N	Ginseng	Duração	Dados coletados	Resultados
Forgo & Kirchdorfer, 1981	Homens	20	200mg/dia de Extrato padronizado de <i>P. Ginseng</i>	9 semanas	Capacidade aeróbia	Aumento da capacidade aeróbica, redução da produção de lactato e da frequência cardíaca
Forgo & Kirchdorfer, 1982	Jovens	30	Extrato padronizado de <i>P. ginseng</i> contendo 4% ou 7% de ginsenosídeos	9 semanas	Capacidade aeróbia	Melhorou capacidade aeróbica, reduziu produção de lactato e frequência cardíaca; não houve diferença entre 4% e 7% do conteúdo de ginsenosídeos
Forgo, 1983	Atletas de elite	30	200mg/dia de Extrato padronizado de <i>P. Ginseng</i>	9 semanas	Melhora da captação de O <sub>2</sub>	Melhorou captação de O <sub>2</sub> , capacidade máxima de respiração, capacidade vital e volume de expiração forçada; reduziu produção de lactato e frequência cardíaca; Sem alteração significativa para LH soro, testosterona, e cortisol
Teves et al., 1983	Corredores de maratona	12	2000mg/dia; 1,5% de glicosídeos	4 semanas	Capacidade aeróbia	Sem diferença significativa para o tempo de corrida até a exaustão, capacidade aeróbica, frequência cardíaca, V <sub>E</sub> , e RPE
Murano et al., 1984	Jovens de 18–21 anos, e adultos de 38–70 anos	65	2 cápsulas por 30 dias; 1 cápsula por 30 dias de Extrato padronizado ARM229	60 dias	Melhora de performance no Teste de Cooper	No grupo de adultos: houve melhora da performance no teste de Cooper (12min corrida); Grupo de jovens: não houve diferença significativa
Forgo & Schimert, 1985	Atletas de Elite	28	200mg/dia de Extrato padronizado G115 de <i>P. Ginseng</i>	9 semanas	Efeitos sobre a saúde dos atletas	Melhorou captação de O <sub>2</sub> , volume de expiração forçada, capacidade vital, tempo de reação visual e frequência cardíaca.
Asano et al., 1986	Homens jovens	6	<i>E. senticosus</i> M	8 dias	Capacidade máxima de trabalho	Significativo aumento do trabalho total, tempo até exaustão.
Mc Naughton et al., 1989	Corredores de maratona	15 (M) 15 (F)	Ginseng Chinês e <i>Eleutherococcus senticosus</i>	6 sem	Performance aeróbica, força	Aumento significativo no VO <sub>2máx</sub> , força
Griboaud et al., 1990	Homens jovens	12	Ginseng e fenu-greco 0,5g 2X/dia	15 dias	Força e fadiga muscular	Aumento significativo na produção de trabalho, diferenças significativas no nível de lactato
Griboaud et al., 1991	Ciclistas amadores bem treinados	14	Ginseng e fenu-greco 0,5g 2X/dia	30 dias	Treinamento, endurance, performance	Aumento significativo no limiar anaeróbio, ferritina sanguínea, trabalho, RER, VE <sub>max</sub> , VO <sub>2max</sub> , não signif. para lactato sanguíneo
Perialis et al., 1991	Idade 21 – 47 anos	50	200mg/dia de Extrato padronizado de <i>P. ginseng</i> , DMAE, vitaminas, minerais	6 semanas	?	Melhorou carga total de trabalho, tempo até exaustão, capacidade aeróbica, ventilação, VO <sub>2</sub> , produção de dióxido de carbono, produção de lactato e frequência cardíaca; Não significativo para RER.
Van Schepdael, 1993	Mulheres triatletas de 24 – 36 anos	43	400mg/dia de Extrato padronizado de <i>P. Ginseng</i>	20 semanas	?	Preveniu a diminuição da performance física após 10km
Engels et al., 1995	Mulheres adultas saudáveis	19	<i>P. ginseng</i> C.A. Meyer 200mg/dia 4% ginsenosídeos	8 semanas	Respostas metabólicas	Diferença não significativa no exercício máximo e submáximo.
Engels et al., 1996	Mulheres adultas saudáveis	19	<i>P. ginseng</i> C.A. Meyer 200mg/dia 4% ginsenosídeos	8 semanas	Performance de trabalho, metabolismo energético	Diferença não significativa na performance de trabalho máximo, descanso, exercício, recuperação do O <sub>2</sub> , RER, V <sub>E</sub> , frequência cardíaca, níveis de lactato

						sanguíneo.
Dowling et al., 1996	Treinados em corrida em distância	20	<i>E. senticosus</i> M 3,4ml	8 semanas	Exercício aeróbico máximo e submáximo	Sem diferença significativa na frequência cardíaca, VO <sub>2</sub> , V <sub>E</sub> , V <sub>E</sub> /VO <sub>2</sub> , RER, RPE, tempo até exaustão, nível de lactato.
Marasco et al., 1996	Voluntários entre 18 - 65 anos	625	200mg/dia de Extrato padronizado de <i>P. ginseng</i> , vitaminas, minerais	12 semanas	Qualidade de vida	Melhorou qualidade de vida, prevenindo o aumento de peso corporal e aumento da pressão arterial sanguínea.
Morris et al., 1996	Ciclistas amadores bem treinados	7 (M), 1 (F)	<i>P. quinquefolium</i> 8 ou 16mg/Kg/dia	7 dias	Exaustão 75% VO <sub>2</sub> max	Não houve diferença significativa no tempo de exaustão, níveis de lactato e de glicose, RPE, V <sub>E</sub> , VO <sub>2</sub> .
Wu et al., 1996	Homens adultos saudáveis	16	Preparado contendo Ciwujia	2 semanas	Quoeficiente respiratório, limiar anaeróbico, produção de lactato, frequência cardíaca	Aumento do metabolismo anaeróbico, efeito poupador de glicogênio, aumento de 43% do metabolismo de gordura durante exercício, diminuição de 31-33% do lactato sanguíneo, efeito poupador de glicogênio.
Lifton et al., 1997	Ciclistas amadores bem treinados	7 (M), 4 (F)	3g/dia	13 dias	Exercício aeróbico máximo	Não houve diferença significativa na frequência cardíaca máxima, VO <sub>2</sub> max, carga de trabalho, RER.
Engels & Wirth, 1997	Homens adultos saudáveis	31	<i>P. ginseng</i> C.A. Meyer 200 ou 400mg/dia	8 semanas	Respostas Fisiológicas e Psicológicas	Diferença não significativa na captação máxima e submáxima de O <sub>2</sub> , RER, V <sub>E</sub> , lactato sanguíneo, freq. cardíaca e RPE.
Allen et al., 1998	Adultos jovens saudáveis treinados moderadamente	20 (M), 8 (F)	<i>P. ginseng</i> 200mg/dia, 7% ginsenosídeos	3 semanas	Máxima performance aeróbia	Não houve diferença significativa no VO <sub>2</sub> , carga de trabalho, tempo de exercício, lactato, níveis do hematócrito, frequência cardíaca, RPE.
Engels et al., 1998	Jovens adultos, aerobicamente treinados	12	<i>P. ginseng</i> C.A. Meyer 1000mg/dia de material da raiz	60 dias	Exercício aeróbico máximo	Sem diferença na captação de O <sub>2</sub> , RER, V <sub>E</sub> , RPE, frequência cardíaca
Kolohouri et al., 1999	Mulheres adultas saudáveis	24	<i>P. ginseng</i> C.A. Meyer 400mg/dia	8 semanas	Capacidade anaeróbia, fadiga	Não houve diferença significativa no trabalho supramáximo de curta duração
Eschbach et al., 1999	Homens bem treinados	10	<i>E. senticosus</i> 1200mg/dia	120 minutos, 10km	Utilização de substrato, manutenção da performance	Sem diferença significativa no VO <sub>2</sub> , RER, RPE, frequência, cardíaca, nível de lactato e glicose
Szolomicki et al, 2000	Voluntários saudáveis de ambos os sexos	50	Extrato fluído de Taiga Wurzel – 25gotas 3x/dia (1mL equivalendo 1g de raiz)	30 dias	Colesterol total, LDL colesterol, ácidos graxos livres, triacilglicerol, glicose, VO <sub>2</sub> max	Redução significativa nos níveis de Colesterol total e LDL colesterol; redução dos ácidos graxos livres, triacilglicerol, glicose sanguínea; e aumento significante no pico de VO <sub>2</sub> max
Liang et al., 2005	Adultos jovens	29	1350mg/dia <i>Panax notoginseng</i>	30 dias	Capacidade aeróbia, endurance, pressão arterial média, VO <sub>2</sub>	Melhora significativa no tempo de endurance até exaustão, diminuição da pressão arterial média e do VO <sub>2</sub>
Kuo et al., 2010	Homens em treinamento recreacional de ciclismo	9	800mg/dia de Extrato padronizado de <i>E. senticosus</i>	8 semanas	Capacidade aeróbia, frequência cardíaca máxima, VO <sub>2</sub> , RPE, RER, ácidos graxos livres e glicose no plasma	Aumento significativo: no pico de VO <sub>2</sub> , na frequência cardíaca e melhora no tempo de resistência. Em 30 min a 75% do pico de VO <sub>2</sub> , a produção de ácidos graxos livres no plasma foi aumentada, e o nível de glicose diminuído, de forma significativa (P <0,05)
Ping et al., 2011	Atletas de corrida	9	200mg de <i>Panax ginseng</i>	1 hora antes do exercício	Capacidade aeróbia, VO <sub>2</sub> , frequência cardíaca, temperatura	A suplementação aguda não afetou nenhum dos parâmetros analisados no estudo.

	recreacional 25 - 32 anos			em esteira de corrida	corporal, RPE, glicose, lactato, insulina plasmática, ácidos graxos livres	
Jung et al., 2011	Homens estudantes universitários	18	20g de extrato de ginseng Koreano misturado com 200ml de água 3x/dia	7 dias antes do teste; e 4 dias após o teste	Lesão muscular induzida pelo exercício, resposta inflamatória, sensibilidade à insulina	Diminuição significativa da creatina quinase e da interleucina 6 no grupo suplementado com ginseng, além de uma significativa redução da insulina e glicose plasmática, sugerindo redução da lesão muscular e diminuição da resposta inflamatória, resultando em melhorias na sensibilidade à insulina

F=feminino; M=masculino; O<sub>2</sub>=oxigênio; RER=taxa de troca respiratória; RPE=taxa de esforço percebido; V<sub>E</sub>=volume expiratório; V<sub>E</sub><sub>max</sub>=volume expiratório máximo;  
VO<sub>2</sub>=captação de oxigênio; VO<sub>2</sub><sub>max</sub>= máxima captação de oxigênio; LH= hormônio luteinizante. **Fonte: Adaptado e Atualizado de Barke & Morgan (2000).**

## Cronograma do tratamento

## CRONOGRAMA – 2011

### Legenda:

GRUPO ADAPTADO = S = 6

GRUPO ADAPTADO SUPLEMENTADO = SS = 6

GRUPO CORRIDA = C = 6

GRUPO CORRIDA SUPLEMENTADO = CS = 6

GRUPO CONTROLE = 6

GRUPO GAVAGEM = 4

### *Observações:*

**Primeiro bloco** – grupo **sendentário** + **adaptado suplementado** (iniciando com 1 semana de diferença do tratamento dos grupos); o motivo do intervalo entre os grupos é devido ao dia do sacrifício, que será realizado em até 6 animais.

**Segundo bloco** - quando o grupos **sendentário**, e **adaptado suplementado** estiverem na 6ª e 5ª semana de tratamento respectivamente, inicia-se a adaptação em biotério do grupo **corrida**, e uma semana após, do grupo **corrida suplementado**.

Na semana de sacrifício do grupo adaptado, e uma semana depois, do grupo adaptado suplementado, inicia-se na semana seguinte (ao sacrifício do grupo adaptado suplementado), o tratamento e treinamento no grupo corrida. E após uma semana do início do tratamento do grupo corrida, inicia-se o tratamento e treinamento do grupo corrida suplementado.

**Sobre os grupos **CONTROLE** e **GAVAGEM**:**

A manipulação com estes grupos de animais (CONTROLE E GAVAGEM) será da seguinte maneira:

- Este grupo iniciará na mesma data do início do grupo corrida suplementado;

Atenção: o único “tratamento” que o grupo gavagem irá receber, é a gavagem. Enquanto que o grupo CONTROLE, só ficará no biotério, sem receber nenhum tipo de tratamento (a palavra “tratamento” para o grupo controle serve só para compreender o momento do sacrifício).

- Alguns animais do grupo CONTROLE serão sacrificados na semana que correspondente a 3 semanas de adaptação ao biotério + 2 semanas de adaptação à esteira (mas não farão adaptação à esteira) , ou seja, teoricamente no mesmo período como estivesse iniciando a primeira semana de tratamento. Ao mesmo tempo, nesta mesma semana, inicia o tratamento de gavagem no grupo GAVAGEM.

- Na semana referente à 5 semanas de tratamento (ou seja, concluídas as 4 semanas de “tratamento”), serão sacrificados animais do grupo CONTROLE e GAVAGEM;

- Na semana referente à 9 semanas (ou seja, concluídas as 8 semanas de “tratamento”), serão sacrificados animais do grupo CONTROLE e GAVAGEM.

Tudo isso, com o objetivo de analisar (nos grupos Controle e Gavagem), como estarão os biomarcadores nos momentos:

a) após 5 semanas de adaptação: no caso do grupo controle; (o grupo gavagem não será sacrificado no início, devido a gavagem ser iniciada somente após as 5 semanas de adaptação).

b) no meio do tratamento (para controle e gavagem)

c) ao final do tratamento (para controle e gavagem)

## CRONOGRAMA – Tratamento ratos - 2011

JANEIRO						
DOMINGO	SEGUNDA	TERÇA	QUARTA	QUINTA	SEXTA	SÁBADO
						01
02	03	04	05	06	07	08
09	INICIO grupo ADAPTADO (S=6)  ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S	ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S	ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S	ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S	ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S	ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S
16	INICIO grupo ADAPTADO SUPLEMENTADO (SS=6)  ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S + SS	ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S + SS				
23	ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S + SS	ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S + SS	ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S + SS	ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S + SS	ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S + SS	ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  S + SS

30 ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO SS	31 ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO SS ADAPTAÇÃO ESTEIRA S					
<b>FEVEREIRO</b>						
<b>DOMINGO</b>	<b>SEGUNDA</b>	<b>TERÇA</b>	<b>QUARTA</b>	<b>QUINTA</b>	<b>SEXTA</b>	<b>SÁBADO</b>
		01 ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO SS ADAPTAÇÃO ESTEIRA S	02 ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO SS ADAPTAÇÃO ESTEIRA S	03 ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO SS ADAPTAÇÃO ESTEIRA S	04 ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO SS ADAPTAÇÃO ESTEIRA S	05 ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO SS
06 ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO SS	07 ADAPTAÇÃO ESTEIRA S + SS	08 ADAPTAÇÃO ESTEIRA S + SS	09 ADAPTAÇÃO ESTEIRA S + SS	10 ADAPTAÇÃO ESTEIRA S + SS	11 ADAPTAÇÃO ESTEIRA S + SS	12
13	14 1º TESTE PERFORMANCE S	15 TRATAMENTO S	16 TRATAMENTO S	17 TRATAMENTO S	18 TRATAMENTO S	19

	ADAPTAÇÃO ESTEIRA SS	ADAPTAÇÃO ESTEIRA SS	ADAPTAÇÃO ESTEIRA SS	ADAPTAÇÃO ESTEIRA SS	ADAPTAÇÃO ESTEIRA SS	
20	21 1º TESTE PERFORMANCE SS TRATAMENTO 2ª sem. S 1º sem. SS	22 TRATAMENTO S + SS	23 TRATAMENTO S + SS	24 TRATAMENTO S + SS	25 TRATAMENTO S + SS	26
27	28 TRATAMENTO 3ª sem. S 2ª sem. SS					
<b>MARÇO</b>						
<b>DOMINGO</b>	<b>SEGUNDA</b>	<b>TERÇA</b>	<b>QUARTA</b>	<b>QUINTA</b>	<b>SEXTA</b>	<b>SÁBADO</b>
		01 TRATAMENTO S + SS	02 TRATAMENTO S + SS	03 TRATAMENTO S + SS	04 TRATAMENTO S + SS	05
06	07	08	09	10	11	12

	<b>TRATAMENTO</b> 4ª sem. S 3ª sem. SS	<b>TRATAMENTO</b> S + SS	<b>TRATAMENTO</b> S + SS	<b>TRATAMENTO</b> S + SS	<b>TRATAMENTO</b> S + SS	
13	14 <b>2º TESTE PERFORMANCE</b> S <b>TRATAMENTO</b> 5ª sem. S 4ª sem. SS	15 <b>TRATAMENTO</b> S + SS	16 <b>TRATAMENTO</b> S + SS	17 <b>TRATAMENTO</b> S + SS	18 <b>TRATAMENTO</b> S + SS	19
20	21 <b>INÍCIO GRUPO CORRIDA</b> (C=6) <b>2º TESTE PERFORMANCE</b> SS <b>TRATAMENTO</b> 6ª sem. S 5ª sem. SS <b>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</b> C	22 <b>TRATAMENTO</b> S + SS <b>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</b> C	23 <b>TRATAMENTO</b> S + SS <b>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</b> C	24 <b>TRATAMENTO</b> S + SS <b>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</b> C	25 <b>TRATAMENTO</b> S + SS <b>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</b> C	26 <b>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</b> C

27	28	29	30	31		
ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  C	INÍCIO GRUPO CORRIDA SUPLEMENTADO  (CS=6)  TRATAMENTO  7ª sem. S  6ª sem. SS  ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  C + CS  INÍCIO GRUPOS:  CONTROLE E GAVAGEM	TRATAMENTO  S + SS  ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  C + CS  <b>ATENÇÃO AOS GRUPOS:</b>  CONTROLE (não receberá tratamento nenhum)  GAVAGEM (início da gavagem só acontecerá após as 5 semanas que “seriam” de adapt ao biotério + adapt à esteira – ocorrerá somente gavagem)	TRATAMENTO  S + SS  ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  C + CS	TRATAMENTO  S + SS  ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  C + CS		
ABRIL						
DOMINGO	SEGUNDA	TERÇA	QUARTA	QUINTA	SEXTA	SÁBADO
					01  TRATAMENTO  S + SS  ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  C + CS	02  ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO  C + CS

<p>03</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>C + CS</p>	<p>04</p> <p>TRATAMENTO</p> <p>8ª sem. S</p> <p>7ª sem. SS</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>C + CS</p> <p>GRUPOS no biotério:</p> <p>CONTROLE E GAVAGEM</p>	<p>05</p> <p>TRATAMENTO</p> <p>S + SS</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>C + CS</p>	<p>06</p> <p>TRATAMENTO</p> <p>S + SS</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>C + CS</p>	<p>07</p> <p>TRATAMENTO</p> <p>S + SS</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>C + CS</p>	<p>08</p> <p>TRATAMENTO</p> <p>S + SS</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>C + CS</p>	<p>09</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>C + CS</p>
<p>10</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>C + CS</p>	<p>11</p> <p>3º TESTE PERFORMANCE</p> <p>S</p> <p>TRATAMENTO</p> <p>8ª sem. SS</p> <p>ADAPTAÇÃO ESTEIRA</p> <p>C</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>CS</p> <p>GRUPOS no biotério:</p> <p>CONTROLE E GAVAGEM</p>	<p>12</p> <p>TRATAMENTO</p> <p>SS</p> <p>ADAPTAÇÃO ESTEIRA</p> <p>C</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>CS</p>	<p>13</p> <p>COLETA TECIDOS E SACRIFÍCIO</p> <p>S</p> <p>TRATAMENTO</p> <p>SS</p> <p>ADAPTAÇÃO ESTEIRA</p> <p>C</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>CS</p>	<p>14</p> <p>TRATAMENTO</p> <p>SS</p> <p>ADAPTAÇÃO ESTEIRA</p> <p>C</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>CS</p>	<p>15</p> <p>TRATAMENTO</p> <p>SS</p> <p>ADAPTAÇÃO ESTEIRA</p> <p>C</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>CS</p>	<p>16</p> <p>ADAPTAÇÃO BIOTÉRIO</p> <p>CS</p>

17	18 3º TESTE PERFORMANCE SS ADAPTAÇÃO ESTEIRA C + CS GRUPOS no biotério: CONTROLE E GAVAGEM	19 ADAPTAÇÃO ESTEIRA C + CS	20 COLETA TECIDOS E SACRIFÍCIO SS ADAPTAÇÃO ESTEIRA C + CS	21 ADAPTAÇÃO ESTEIRA C + CS	22 ADAPTAÇÃO ESTEIRA C + CS	23
24	25 1º TESTE PERFORMANCE C TRATAMENTO 1ª sem. C ADAPTAÇÃO ESTEIRA CS GRUPOS no biotério: CONTROLE E GAVAGEM	26 TRATAMENTO C ADAPTAÇÃO ESTEIRA CS	27 TRATAMENTO C ADAPTAÇÃO ESTEIRA CS	28 TRATAMENTO C ADAPTAÇÃO ESTEIRA CS	29 TRATAMENTO C ADAPTAÇÃO ESTEIRA CS	30

MAIO						
DOMINGO	SEGUNDA	TERÇA	QUARTA	QUINTA	SEXTA	SÁBADO
01	02 1º TESTE PERFORMANCE  CS  TRATAMENTO  2ª sem. C  1ª sem. CS  INÍCIO DO TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)  Enquanto outra parte do grupo CONTROLE aguarda sem nenhum tratamento no biotério	03 TRATAMENTO  C + CS  TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	04 TRATAMENTO  C + CS  TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	05 TRATAMENTO  C + CS  TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	06 TRATAMENTO  C + CS  1ª COLETA DE TECIDOS E SACRIFÍCIO do grupo: CONTROLE (ref à 5 sem de adapt biotério + 2 sem adapt esteira)  TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	07
08	09 TRATAMENTO  3ª sem. C  2ª sem. CS  ANÁLISE DAS AMOSTRAS  S  TRATAMENTO do grupo:	10 TRATAMENTO  C + CS  ANÁLISE DAS AMOSTRAS  S  TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a	11 TRATAMENTO  C + CS  ANÁLISE DAS AMOSTRAS  S  TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a	12 TRATAMENTO  C + CS  ANÁLISE DAS AMOSTRAS  S  TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a	13 TRATAMENTO  C + CS  ANÁLISE DAS AMOSTRAS  S  TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a	14

	GAVAGEM (fazer só a gavagem)	gavagem)	gavagem)	gavagem)	gavagem)	
15	16 TRATAMENTO 4ª sem. C 3ª sem. CS ANÁLISE DAS AMOSTRAS SS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	17 TRATAMENTO C + CS ANÁLISE DAS AMOSTRAS SS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	18 TRATAMENTO C + CS ANÁLISE DAS AMOSTRAS SS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	19 TRATAMENTO C + CS ANÁLISE DAS AMOSTRAS SS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	20 TRATAMENTO C + CS ANÁLISE DAS AMOSTRAS SS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	21
22	23 2º TESTE PERFORMANCE C TRATAMENTO 5ª sem. C 4ª sem. CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	24 TRATAMENTO C + CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	25 TRATAMENTO C + CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	26 TRATAMENTO C + CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	27 TRATAMENTO C + CS	28
29	30 2º TESTE PERFORMANCE	31 TRATAMENTO				

	<p style="text-align: center;"><b>CS</b></p> <p style="text-align: center;">TRATAMENTO</p> <p style="text-align: center;">6ª sem. C</p> <p style="text-align: center;">5ª sem. CS</p> <p style="text-align: center;">TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)</p>	<p style="text-align: center;"><b>C + CS</b></p> <p style="text-align: center;">TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)</p>				
<b>JUNHO</b>						
<b>DOMINGO</b>	<b>SEGUNDA</b>	<b>TERÇA</b>	<b>QUARTA</b>	<b>QUINTA</b>	<b>SEXTA</b>	<b>SÁBADO</b>
			01	02	03	04
			<p style="text-align: center;">TRATAMENTO</p> <p style="text-align: center;"><b>C + CS</b></p> <p style="text-align: center;">TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)</p>	<p style="text-align: center;">TRATAMENTO</p> <p style="text-align: center;"><b>C + CS</b></p> <p style="text-align: center;">TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)</p>	<p style="text-align: center;"><b>2ª COLETA DE TECIDOS E SACRIFÍCIO de alguns ratos dos grupos:</b></p> <p style="text-align: center;">(referente ao término do tratamento de 4 semanas)</p> <p style="text-align: center;"><b>CONTROLE e GAVAGEM</b></p> <p style="text-align: center;">TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem após concluir a 8ª semana dos ratos restantes do grupo)</p> <p style="text-align: center;">TRATAMENTO</p> <p style="text-align: center;"><b>C + CS</b></p> <p style="text-align: center;">TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a</p>	

					gavagem)	
05	06 TRATAMENTO 7ª sem. C 6ª sem. CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	07 TRATAMENTO C + CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	08 TRATAMENTO C + CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	09 TRATAMENTO C + CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	10 TRATAMENTO C + CS	11
12	13 TRATAMENTO 8ª sem. C 7ª sem. CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	14 TRATAMENTO C + CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	15 TRATAMENTO C + CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	16 TRATAMENTO C + CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	17 TRATAMENTO C + CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	18
19	20 3º TESTE PERFORMANCE C TRATAMENTO 8ª sem. CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a	21 TRATAMENTO CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	22 COLETA TECIDOS E SACRIFÍCIO C TRATAMENTO CS TRATAMENTO do grupo:	23 TRATAMENTO CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	24 TRATAMENTO CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	25

	gavagem)		GAVAGEM (fazer só a gavagem)			
26	27 3º TESTE PERFORMANCE CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	28 TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	29 COLETA TECIDOS E SACRIFÍCIO CS TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)	30 TRATAMENTO do grupo: GAVAGEM (fazer só a gavagem)		
JULHO						
DOMINGO	SEGUNDA	TERÇA	QUARTA	QUINTA	SEXTA	SÁBADO
					01 3ª COLETA DE TECIDOS E SACRIFÍCIO dos grupos: CONTROLE e GAVAGEM (17 semanas)	02





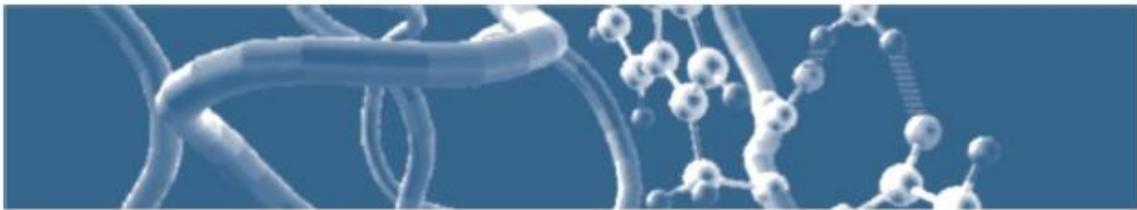
# Certificado

Certificamos que **Aline Arouca** participou da Comissão Organizadora do II CURSO DE INVERNO DE FISILOGIA, realizado no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, nos dias 16 a 27 de julho de 2012 .

A handwritten signature in black ink, appearing to read "C. Amílcar P.", written over a horizontal line.

**Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada**  
Professor Responsável





# FeSBE 2011

**24 a 27 de agosto de 2011**  
**Rio de Janeiro – RJ**

## CERTIFICADO

Certificamos que

O trabalho 03.087 - THE EFFECT OF SIBERIAN GINSENG STANDARDIZED EXTRACT ON BIOCHEMICAL PARAMETERS, WEIGHT AND PERFORMANCE IN SEDENTARY RATS TESTED FOR TREADMILL RUNNING de autoria AROUCA, A. B. ; CREGE, D. R. X. D. O. RAMOS, L. A. F. ; ISHIZU, L. Y. ; FARIA, L. O. M. D. ; AREAS, M. A. ; COSTA, K. G. D. ; SILVA, F. O. C. D. ; MACEDO, D. V. D. ; GRASSI-KASSISSE, D. M. - Depto. de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofisica, UNICAMP - Depto. de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofisica, UNICAMP - Depto. de Bioquímica, UNICAMP foi apresentado sob a forma de Painel na

XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade do Rio de Janeiro – RJ, de 24 a 27 de agosto de 2011.



Comissão Organizadora





## Universidade Estadual de Campinas

A Universidade Estadual de Campinas, de acordo com a Resolução GR Nº 31, de 07-07-2010, certifica que,

**Aline Barbedo Arouca**

Brasileira, natural do Estado de São Paulo, nascida a 26 de março de 1974, RG: 28041549-7-SP

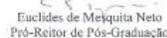
do curso de **Mestrado em Biologia Funcional e Molecular**

participou do Programa de Estágio Docente – PED, no Grupo C - Atividades de Apoio à Docência Parcial, no primeiro período letivo de 2011, com dedicação de 08 (oito) horas semanais, nas atividades da disciplina BF982 – A - Fisiologia Humana I, sob supervisão da Professora Doutora Dora Maria Grassi Kassisse, do Instituto de Biologia desta Universidade.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 22 de agosto de 2011.

  
Antonio Espinani  
Diretor Acadêmico

  
Marcelo Knobel  
Pró-Reitor de Graduação

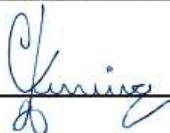
  
Euclides de Mequita Neto  
Pró-Reitor de Pós-Graduação



**WORKSHOP**  
**PÓS BFM**  
**CERTIFICADO**

Certifico que Aline Barbedo Arouca participou do 1º Workshop do Programa de Pós-Graduação em **Biologia Funcional e Molecular**, realizado nos dias 30 de junho e 1º de julho na Universidade Estadual de Campinas, com a apresentação em forma de poster do trabalho intitulado THE EFFECT OF SIBERIAN GINSENG STANDARDIZED EXTRACT ON WEIGHT AND PERFORMANCE IN SEDENTARY RATS TESTED FOR TREADMILL RUNNING. de autoria de Arouca, A.B.; Ishizu, L.Y.; Faria, L.O.M.; Silva, F.O.C.; Macedo, D.V.; Grassi-Kassisse, D. M.

Campinas, 1º de julho de 2011



**Carmen Veríssima Ferreira**

Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular  
IB - Unicamp



# XIX 2011

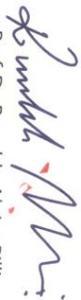
## certificado

### congresso interno de iniciação científica da unicamp

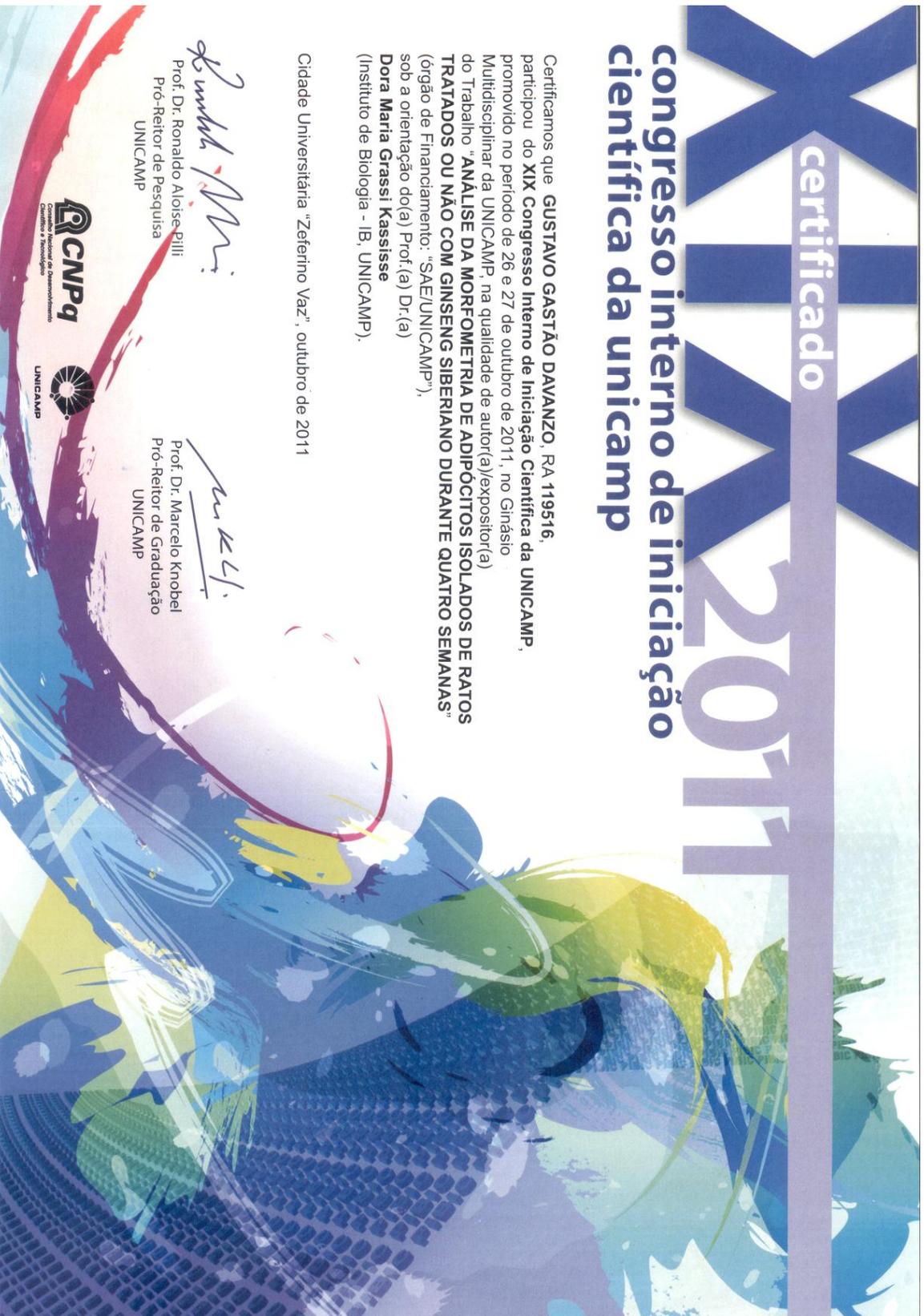
### científica da unicamp

Certificamos que **GUSTAVO GASTÃO DAVANZO**, RA 119516, participou do **XIX Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP**, promovido no período de 26 e 27 de outubro de 2011, no Ginásio Multidisciplinar da UNICAMP, na qualidade de autor(a)/expositor(a) do Trabalho "**ANÁLISE DA MORFOMETRIA DE ADIPOCITOS ISOLADOS DE RATOS TRATADOS OU NÃO COM GINSENG SIBERIANO DURANTE QUATRO SEMANAS**" (órgão de Financiamento: "SAE/UNICAMP"), sob a orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Dora Maria Grassi Kassisse** (Instituto de Biologia - IB, UNICAMP).

Cidade Universitária "Zeferino Vaz", outubro de 2011

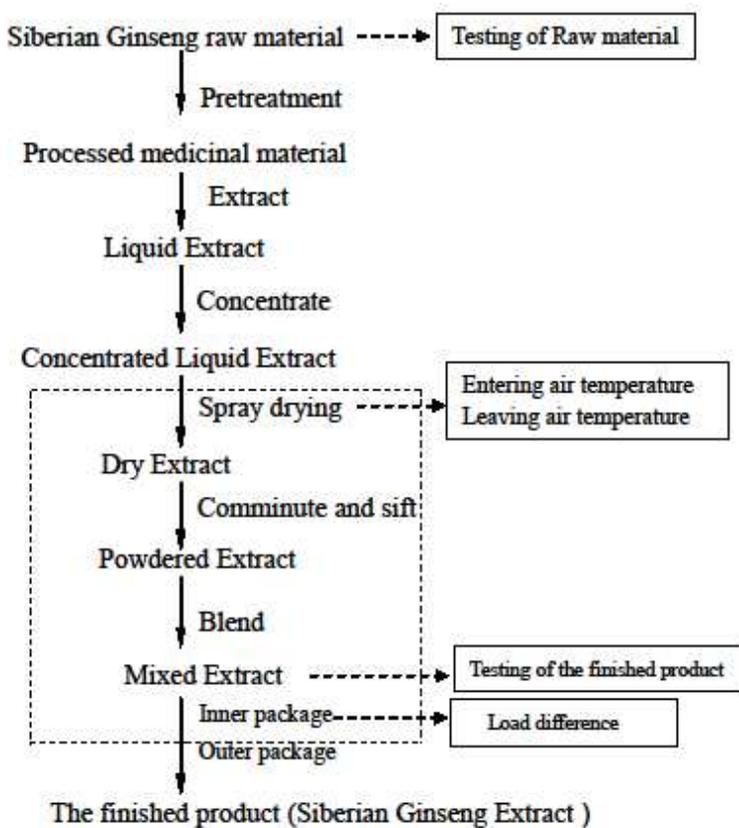
  
Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli  
Pró-Reitor de Pesquisa  
UNICAMP

  
Prof. Dr. Marcelo Knobel  
Pró-Reitor de Graduação  
UNICAMP





### Siberian Ginseng Extract Flow Chart



Control area     
  Critical process point

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

To Gamma Com.Imp.Exp-CNPJ:03.177.596/0001-98

**Siberian Ginseng Extract 0.8% Eleutherosides (HPLC)**

Batch No.: C20101020 Manufacture Date: 20101020 Expiry Date: 20121019

<b>General Information</b>			
Part Used	Root	Solvents Used	Water&Ethanol
Botanical Source	<i>Eleutherocus senticosus</i>	Country Of Origin	China
ITEMS	SPECIFICATION	METHOD	TEST RESULTS
<b>Physical&amp;Chemical Data</b>			
Color	Brown-Yellow	Organoleptic	Conform
Odour	Characteristic	Organoleptic	Confrom
Appearance	Fine Powder	Organoleptic	Conform
<b>Analytical Quality</b>			
Identification	Identical to R.S. sample	HP TLC	Identical
Eleutherosides	≥0.8%	HPLC	0.90%
Sieve analysis	90 % through 80 mesh	USP30<786>	Conform
Loss on Drying	≤5.0 %	Eur.Ph.6.0 [2.8.17]	3.30%
Total Ash	≤10.0 %	Eur.Ph.6.0 [2.4.16]	4.52 %
Bulk density	35-65 g/100mL	Eur.Ph.6.0 [2.9.15]	53.3 g/100mL
Tap density	55-90g/100mL	Eur.Ph.6.0 [2.9.15]	83.3 g/100mL
<b>Contaminants</b>			
Lead (Pb)	≤3.0 mg/kg	Eur.Ph.6.0<2.2.58>ICP-MS	0.6215 mg/kg
Arsenic (As)	≤2.0 mg/kg	Eur.Ph.6.0<2.2.58>ICP-MS	0.4587 mg/kg
Cadmium (Cd)	≤1.0 mg/kg	Eur.Ph.6.0<2.2.58>ICP-MS	0.0215 mg/kg
Mercury (Hg)	≤0.1 mg/kg	Eur.Ph.6.0<2.2.58>ICP-MS	<0.01 mg/kg
Solvents Residue	Meet Eur.Ph5.0 <5.4>	Eur.Ph 6.0<2.4.28>	conform
Pesticides Residue	Meet USP Requirements	USP30 <561>	Conform
<b>Microbiological</b>			
Total Plate Count	≤1000 cfu/g	USP30 <61>	Conform
Yeast & Mold	≤100 cfu/g	USP30 <61>	Conform
E.Coli.	Negative	USP30 <61>	Conform
Salmonella	Negative	USP30 <61>	Conform
<b>Packing&amp;Storage</b>			
Packed in paper-drums and two plastic-bags inside.			
N.W:25kgs .I.D.35×H51cm;			
Store in a well-closed container Away from moisture,light, oxygen.			
<b>Shelf life</b>			
24 months months under the conditions above and in its original packaging.			
<b>Manufacturer</b>			
Shaanxi Jiahe Phytochem Co., Ltd. Xi'an, P.R. China.			

Quality Assurance Officer



 Analyst  


No: STP-QCP-1 (810)