

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

INSTITUTO DE BIOLOGIA

*Ana Carolina Rocha Normand*

**“Efeitos do treinamento de endurance na presença ou ausência de suplementação com caldo de cana como bebida pós treino em biomarcadores de estresse oxidativo e performance de ratos.”**

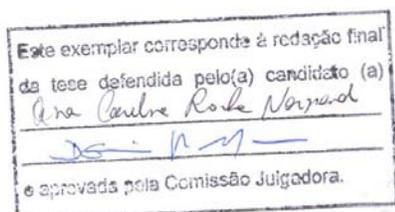
Campinas  
2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**ANA CAROLINA ROCHA NORMAND**

**“Efeitos do treinamento de endurance na presença ou ausência de suplementação com caldo de cana como bebida pós treino em biomarcadores de estresse oxidativo e performance de ratos”**



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

Orientadora: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

CAMPINAS,  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

N789e	<p>Normand, Ana Carolina Rocha, 1982- Efeitos do treinamento de endurance na presença ou ausência de suplementação com caldo de cana como bebida pós treino em biomarcadores de estresse oxidativo e performance de ratos / Ana Carolina Rocha Normand. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Denise Vaz de Macedo. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Caldo de cana. 2. Antioxidantes. 3. Treinamento de endurance. 4. Estresse oxidativo. 5. Performance. I. Macedo, Denise Vaz de, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Effects of endurance training on the presence or absence of sugarcane juice supplementation as post workout drink on oxidative stress biomarkers and performance of rats

**Palavras-chave em Inglês:**

Sugarcane juice  
Antioxidants  
Endurance training  
Oxidative stress  
Performance

**Área de concentração:** Bioquímica

**Títuloção:** Mestra em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Denise Vaz de Macedo [Orientador]  
Dora Maria Grassi Kassis  
Fúlvia de Barros Manchado Gobatto

**Data da defesa:** 26-02-2013

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

Campinas, 26 de fevereiro de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis

  
Assinatura

Profa. Dra. Fulvia de Barros Manchado Gobatto

  
Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Joao Paulo Borin

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*Dedico este trabalho à **Deus**,  
à minha mãe **Dalva** e minha tia **Vilma**.  
Sem vocês este trabalho não tinha acontecido.*

# AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, por ter me dado condições físicas, psicológicas e financeiras pra trilhar o caminho que escolhi e desenvolver este trabalho!

A **Profa. Denise** por me permitir fazer parte do laboratório e chegar até aqui. Obrigada por tantos ensinamentos, pelo auxílio financeiro e também pelo carinho que sempre dedicou ao Gustavo.

Às professoras **Dora** e **Fúlvia** que tão prontamente aceitaram o meu convite para participar da banca. É uma grande honra contar com vocês.

Agradeço à **Fernanda**, que por motivos burocráticos, infelizmente não pôde nem fazer parte da banca na defesa nem ter seu nome escrito neste trabalho como minha Co-Orientadora. **Fê**, posso afirmar, com toda certeza, que minha experiência na vida acadêmica se dividiu em antes da Fernanda e depois da Fernanda ao meu lado. Você foi muito mais que Co-Orientadora!! Obrigada por TUDO!!! E tudo é tanta coisa que fica até difícil falar aqui, já que sua presença foi fundamental não apenas na minha vida acadêmica.

Ao **Prof. Armindo** e ao **Prof. René** por tanta dedicação em ensinar e sanar todas as minhas dúvidas, sempre com muita prontidão.

Ao **Kell**, companheiro de laboratório, por ter analisado todas as amostras de fígado e músculo gastrocnêmio vermelho que estão neste trabalho. Sem você eu não conseguiria realizar todos esses experimentos. Este trabalho é tão meu quanto seu!

Agradeço ao meu maridinho, **Fernando**, por toda a paciência e apoio durante todos esses anos, por estar ao meu lado nos momentos de crise em que eu precisei tanto de ouvido e colo para não jogar tudo para o alto e principalmente, por ter me dado a pessoa que mais amo na vida, nosso filho **Gustavo**. Lindo, TE AMO!!! Agradeço ao meu sogro, **Edson**, e minha sogra, **Isabel**, pelo apoio nessa empreitada.

Agradeço ao meu bebê, **Gustavo**, por me mostrar os reais sentidos da vida, por ter me dado tanta força, por me mostrar que sou mais forte do que eu pensei que fosse, e por ter me escolhido como sua mãe. Filho, você é o MAIOR e MELHOR presente que Papai-do-Céu me deu. Esse trabalho também é para você, bebê!

Agradeço às minhas duas mães lindas, **Dalva** e **Vilma**, que além de mães foram pai também. Vocês são as grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui. Obrigado pelo apoio quando decidi fazer o Mestrado mesmo sabendo que isso dificultaria a minha presença em casa. Obrigado pela criação que tive e por serem o exemplo de vida a seguir. Sou muito orgulhosa de ser filha de vocês. AMO DEMAIS VOCÊS!!

Agradeço ao melhor irmão do mundo, **Bruno**, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me ajudando em todos os caminhos que escolhi, juntamente com a sua família linda e que AMO MUITO, minha cunhada **Jô** e meus amados sobrinhos **Bruninho** e **Gabriel**. Obrigada por TUDO!!!!

Agradeço aos amigos que me acompanharam nessa caminhada. Sem vocês eu não teria conseguido atravessar todos os obstáculos que apareceram pelo caminho, e foram muitos. Obrigada meninas **Dezcontrole**, **Fef 03**, **Biomembranas**, **Lu Hollanda** e **a Duda**. Agradeço à **Renatinha**, **Marininha** e **Marinão** que além de tudo isso, por muitas vezes, quando eu precisava ficar até mais tarde no laboratório, cuidaram do meu bebê com o maior carinho e prazer do mundo. Eu jamais conseguirei esquecer e agradecer!

Agradeço à **Cin**, minha irmã de coração e agora também madrinha do Gustavo. Obrigada por todos os conselhos e desabaços. AMIGA tenha certeza que meu coração sempre esteve bem pertinho de você. EU TE AMO MUITO!!!! À sua família, querida: **Suzana, Luiz, Fabinho e o Lu**, obrigada por toda a torcida e carinho.

Não posso deixar de agradecer minha amiga **Vivi**, que entrou na minha vida no meio do Mestrado, quando ambas descobrimos que íamos ser mães. Tenho certeza que foi Deus quem nos aproximou bem naquele momento. Mestrado, trabalho, casamento, casa e maternidade, só você consegue entender perfeitamente os sentimentos que tudo isso gera em mim.

Agradeço à todos os **amigos do LABEX**, por tanto conhecimento adquirido junto à vocês , por me acalmarem nos meus momentos de estresse e claro, por todos os besteirões que me renderam muitas risadas.

Agradeço ao **Thiago (Pinguim)** e **Bernardo** que disponibilizaram seu computador e seu tempo, sempre com prontidão, para imprimir artigos que eu necessitava para estudar. A partir desses artigos construí meus conhecimentos o que tornou possível a escrita deste trabalho.

Agradeço aos **Profs. Cláudio Werneck** e **João Paulo Borin** pela participação na banca de qualificação e suas contribuições neste trabalho.

Agradeço a **Andréia**, secretária da Pós-Graduação da BFM, por todos os conselhos acadêmicos e não acadêmicos e pelo auxílio burocrático.

A **CAPES** e **BIO-100** pelo auxílio financeiro que permitiu com que eu me dedicasse a este trabalho.

# SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	ix
<b>Abstract</b> .....	x
<b>Lista de siglas e abreviaturas</b> .....	xi
<b>Lista de figuras</b> .....	xii
<b>Lista de tabelas</b> .....	xiv
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Treinamento Físico e Resposta Adaptativa.....	1
1.2. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	4
1.2.1. Consequências do aumento da produção de EROs no organismo.....	6
1.3. Antioxidantes.....	7
1.3.1. Sistema de Defesa Antioxidante Enzimático.....	8
1.3.2. Sistema de Defesa Antioxidante Não-Enzimático.....	9
1.4. Exercício Físico e Estresse Oxidativo.....	9
1.4.1 Efeitos Antagônicos da produção de EROs na adaptação ao exercício.....	11
1.5. Exercício Físico e Suplementação.....	12
1.5.1. Caldo de Cana de Açúcar como bebida pós-treino.....	14
<b>2. Objetivo</b> .....	16
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	17
3.1. Animais.....	17
3.2. Protocolo de treinamento.....	17
3.3. Teste de Performance.....	18
3.4. Suplementação.....	19
3.5. Avaliação “ <i>in vitro</i> ” da presença de antioxidantes no Caldo de Cana, Quercetina e na Maltodextrina.....	21
3.6. Coleta de sangue e retirada das amostras de tecidos.....	21
3.7. Preparo dos homogenatos dos tecidos.....	22
3.8. Ataque Oxidativo: Quantificação dos peróxidos de lipídios (TBARS) .....	23
3.9. Quantificação da capacidade antioxidante total do plasma - capacidade do plasma em reduzir o ferro (FRAP) .....	23
3.10. Quantificação da Atividade da Enzima Glutathione Redutase (GR) .....	24
3.11. Quantificação da Atividade da Enzima Catalase (CAT) .....	24
3.12. Quantificação da Concentração de Glicogênio nos tecidos.....	24
3.13. Análises Bioquímicas.....	24

3.14. Padronização dos Experimentos e Análise de Confiança.....	24
3.15. Análise Estatística.....	24
<b>4. Resultados.....</b>	<b>26</b>
4.1. Avaliação “in vitro” da presença de antioxidantes no Caldo de Cana, Quercetina e na Maltodextrina.....	26
4.2. Efeito do protocolo de treinamento e da suplementação sobre a Performance.....	27
4.3. Efeitos do protocolo de treinamento e da suplementação sobre as reservas de glicogênio hepático e musculares.....	28
4.4. Efeitos do treinamento sobre os marcadores de estado catabólico e sobrecarga muscular.....	29
4.5. Efeitos do treinamento sobre os marcadores sanguíneos, hepáticos e musculares de estresse oxidativo.....	30
<b>5. Discussão.....</b>	<b>32</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>43</b>
<b>7. ANEXOS I.....</b>	<b>44</b>
<b>8. ANEXOS II.....</b>	<b>45</b>
<b>9. ANEXOS III.....</b>	<b>66</b>
<b>10. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>68</b>

# I. RESUMO

## **Efeitos do treinamento de endurance na presença ou ausência de suplementação com caldo de cana como bebida pós treino em biomarcadores de estresse oxidativo e performance de ratos.**

O treinamento de endurance promove aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e adaptações no metabolismo oxidativo e sistema de defesa antioxidante. O caldo de cana é rico em água, compostos fenólicos (com ação antioxidante) e principalmente sacarose, apresentando-se como uma bebida interessante para recuperação pós treino. Os objetivos desse estudo foram caracterizar os efeitos da ingestão de caldo de cana durante as três últimas semanas de um protocolo de treinamento de endurance, em parâmetros de estresse oxidativo no sangue, fígado e músculos de ratos. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle ativo (CA, n=12), controle treinado (CT, n=9), treinado suplementado com caldo de cana (CC, n=9), e grupos treinados suplementados com maltodextrina (M, n=9) e quercetina (Q, n=9), utilizados como grupo controle da porção carboidrato e antioxidante, respectivamente, do caldo de cana. As suplementações foram feitas por gavagem, após todas as sessões de exercícios da 7<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 9<sup>a</sup> semanas de treinamento. Os testes de desempenho foram feitos antes e depois da 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 9<sup>a</sup> semanas. A coleta de amostras de sangue, músculos e fígado foram feitas 24h após o último teste de desempenho. Todos os grupos apresentaram aumento incremental significativo no desempenho durante as nove semanas de treinamento. Não detectamos diferenças significativas entre o desempenho dos grupos treinados e suplementados (CC, Q, M) frente ao desempenho do grupo treinado sem suplementação (CT). Os dados apresentados mostram que o protocolo de treinamento utilizado foi claramente adaptativo e aprimorou a performance. Além de aumento expressivo na performance induziu aumento significativo nas reservas de glicogênio muscular e hepático; aumento na atividade da catalase (CAT) e redução da atividade da glutathione redutase (GR) no sangue associada a queda na capacidade antioxidante total (FRAP) e concentrações de ácido úrico e uréia. Esses efeitos foram observados em todos os grupos treinados, suplementados ou não. Não houve diferença significativa, entre os grupos, na concentração plasmática da enzima creatina quinase (CK), na atividade antioxidante enzimática no músculo nem nos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) em todos os tecidos analisados. No fígado a atividade da GR não foi alterada, enquanto a atividade da CAT diminuiu. O caldo de cana não alterou o perfil adaptativo induzido pelo treinamento. Esses dados são relevantes, pois atestam que quando o treinamento é bem planejado (estímulo/descanso), não há necessidade de suplementação para melhorar performance. Por outro lado, nas condições propostas neste estudo, o caldo de cana pode ser usado como uma opção prática de bebida para hidratação pós treino, uma vez que permite a reposição hídrica sem interferir negativamente na resposta adaptativa induzida pelo treinamento.

**Palavras-chave:** caldo de cana, antioxidantes, treinamento de endurance, estresse oxidativo, performance.

## II. ABSTRACT

**Effects of endurance training on the presence or absence of sugarcane juice supplementation as post workout drink on oxidative stress biomarkers and performance of rats.**

Endurance training induces adaptations in oxidative metabolism, increased reactive oxygen species production and improves the antioxidant system defense. Sugarcane juice is rich in water, phenolic compounds (with antioxidant) and mainly sucrose, presenting itself as an interesting drink for post workout recovery. The aim of this study were to characterize the effects of ingestion of sugar cane juice during the last three weeks of endurance training protocol on oxidative stress parameters in blood, liver and muscles of rats. The animals were divided into five groups: ative control (CA, n = 12), trained control (CT, n = 9), trained and supplemented with sugarcane juice (CC, n = 9), and trained and supplemented with maltodextrin (M, n = 9) and quercetin (Q, n = 9), used as control group of carbohydrate and antioxidant portion, respectively, of sugarcane juice. The supplementations were made by gavage, after all exercise sessions of the 7th, 8th and 9th weeks of training. Performance tests were executed at pre and post the 4th, 8th and 9th weeks. Sample collection of the blood, muscle and liver were performed 24 hours post the last performance test. All groups showed significant increase in performance in nine weeks of training. We didn't detect significant differences between performance of groups trained and supplemented (CC, Q, M) compared with performance of the trained group without supplementation (CT). The data presented show that the training protocol used was clearly adaptive and improved performance. In addition to a significant increase in performance induced significant increase in muscle and liver glycogen, increased catalase activity (CAT) and decreased glutationa reductase activity (GR) in the blood associated with decrease in total antioxidant capacity (FRAP) and uric acid and urea plasmatic concentration. These effects were observed in all groups trained, supplemented or not. There was no significant difference, between the groups, in creatine kinase enzyme plasmatic concentration (CK), in antioxidant enzymatic activity in muscle nor lipid peroxidation levels (TBARS) on all analyzed groups. In the liver, GR activity was unchanged while the CAT activity decrease. The sugarcane juice didn't alter the profile adaptive training induced. These data are relevant because show that when the training is well planned (stimulus / rest), there isn't need supplementation to improve performance. On the other hand the proposed conditions of this study, the sugarcane juice can be used as practical option for post workout drink for hydration since it allows fluid replacement without interfering negatively on adaptive response induced by training.

**Keywords:** sugarcane juice, antioxidants, endurance training, oxidative stress, performance.

# III. LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>H<sup>+</sup></b>	Próton livre	<b>CA</b>	Grupo controle adaptato
<b>e<sup>-</sup></b>	Elétron livre	<b>CT</b>	Grupo controle treinado
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Molécula de água	<b>M</b>	Grupo exercitado e suplementado com maltodextrina
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato	<b>Q</b>	Grupo exercitado e suplementado com quercetina
<b>CK</b>	Enzima creatina quinase	<b>CC</b>	Grupo exercitado e suplementado com caldo de cana
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Potássio	<b>ERN</b>	Espécies Reativas de Nitrogênio
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetra-acético	<b>*NO</b>	Radical óxido nítrico
<b>VO<sub>2</sub>máx</b>	Capacidade aeróbica máxima	<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>AMP</b>	Adenosina Monofosfato	<b>ERONs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluoride	<b>SOD</b>	Enzima superóxido dismutase
<b>UV</b>	Ultravioleta	<b>CAT</b>	Enzima catalase
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidada	<b>GPX</b>	Enzima glutaciona peroxidase
<b>NADPH</b>	Coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida	<b>GR</b>	Enzima glutaciona redutase
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio	<b>GSH</b>	Glutaciona reduzida
<b>PI3K</b>	fosfatidilinositol 3-quinase	<b>GSSG</b>	Glutaciona oxidada
<b>O<sub>2</sub></b>	Gás oxigênio	<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>*O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ânion superóxido	<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio	<b>RNAm</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>*OH</b>	Radical hidroxila	<b>ADP</b>	Adenosina Difosfato
<b>CTE</b>	Cadeia Transportadora de Elétrons	<b>ABPM</b>	Antioxidantes de baixo peso molecular
<b>CHO</b>	Carboidrato	<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>GLUT-4</b>	Transportador monocarboxilato de glicose	<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>IG</b>	Índice Glicêmico	<b>IC</b>	Iniciação Científica
<b>pO<sub>2</sub></b>	Pressão de oxigênio	<input type="checkbox"/>	Trabalho
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Íon Ferroso	<b>Fig</b>	Fígado
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Íon Férrico	<b>P</b>	Músculo Plantar
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon Cálcio	<b>GB</b>	Músculo Gastrocnêmio Branco
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Íon Cobre	<b>GV</b>	Músculo Gastrocnêmio Vermelho
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	Íon Manganês	<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogênio
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Íon Zinco	<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>UDP</b>	Uracila Difosfato	<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio	<b>TBA</b>	Ácido Tiobarbitúrico
<b>DPPH</b>	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil	<b>FRAP</b>	Capacidade antioxidante total do plasma
		<b>TPTZ</b>	Tripiridiltriazina
		<b>DTNB</b>	5,5'-ditiobis (2-ácidonitrobenzóico)

## IV. LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Desenho experimental do protocolo de treinamento.	19
<b>Figura 2</b> - Procedimento de gavagem após a sessão de treino.	22
<b>Figura 3</b> - Gráfico representativo da análise realizada em boxplot.	27
<b>Figura 4</b> - Curva de decaimento da concentração de DPPH na presença de (A) caldo de cana (21g CHO/100 ml caldo de cana - °Brix) [0,16 mg antioxidantes/ mL caldo de cana (Duarte-Almeida, 2006); (B) maltodextrina (10g CHO/100 ml solução de maltodextrina - °Brix); (C) solução quercetina [0,16 mg antioxidantes/ mL caldo de cana (Duarte-Almeida <i>et al.</i> , 2006).	28
<b>Figura 5</b> - Desempenho dos animais obtidos por meio de uma variável correspondente ao trabalho mecânico (Kg*m) realizado no teste de performance antes do treinamento (T1) e após a quarta (T2), oitava (T3) e nona (T4) semanas de treinamento dos grupos controle adaptado [CA (n=12); preto], controle treinado [CT (n=9); vermelho], e treinados e suplementados com quercetina [Q (n=9); laranja], treinado e suplementado com caldo de cana [CC (n=9); verde], treinado e suplementado com maltodextrina [M (n=9); azul]. ANOVA one-way e pós teste de Tukey.	29
<b>Figura 6</b> - Resumo das repostas adaptativas induzidas pelo protocolo de endurance de 9 semanas.	37
<b>Figura 7</b> - (A) Espectro de absorção de glicogênio em água (100mg/ml). (B) Curva padrão de glicogênio em água (10 a 100 mg/ml) dosado pela adição de fenol 5% em meio ácido. Cada ponto representa a média de três determinações.	50
<b>Figura 8</b> - Curva padrão TBARS usando Tetraetoxipropano (TEP) nas concentrações de 0.025, 0.005, 0.075, 0.1, 0.125 µM.	51
<b>Figura 9</b> - Curva padrão TBARS usando Tetraetoxipropano (TEP) [A], homogenato do fígado [B], homogenato do músculo plantar [C], homogenato do músculo gastrocnêmio vermelho [D]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas.	53
<b>Figura 10</b> - Curvas padrão Trolox em concentrações conhecidas (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mM.) e diferentes tempos de exposição à temperatura ambiente: 0 min [A], 1 min [B], 2 min [C], 3 min [D], 4 min [E], 5 min [F], 6 min [G], 7 min [H], 8 min [I] minutos. Todas as análises foram feitas em triplicatas e representadas no gráfico como Med ± DP.	55
<b>Figura 11</b> - Curva padrão do ensaio da atividade da enzima GR no sangue com diferentes volumes de hemolisado 1:20 (1.5, 3, 5, 6, 10, 12 µL) e tempos de reação: 1 min [A], 2 min [B], 3 min [C], 4 min [D] e 5 min [E]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med ± DP.	57
<b>Figura 12</b> - Curva padrão do ensaio da atividade da enzima GR em diferentes volumes de homogenato de fígado (100, 120, 140, 160 e 180 µL) e tempos de reação: 1 min [A], 2 min [B], 3 min [C], 4 min [D] e 5 min [E]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med ± DP.	59
<b>Figura 13</b> - Curva padrão do ensaio da atividade da enzima GR em diferentes volumes de homogenato do músculo plantar (20, 40, 60, 80, 100 µL) e tempos de reação: 1 min [A], 2 min [B], 3 min [C], 4 min [D] e 5 min [E]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med ± DP.	60

- Figura 14** - Curva padrão do ensaio da atividade da enzima GR em diferentes volumes de homogenato do músculo gastrocnêmio vermelho (20, 40, 60, 80, 100  $\mu$ L) e tempos de reação: 1 min [A], 2 min [B], 3 min [C], 4 min [D] e 5 min [E]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med  $\pm$  DP. 61
- Figura 15** - Curva padrão do ensaio da atividade da enzima catalase em diferentes volumes de hemolisado 1:20 (0.5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu$ L) e tempos de reação: 15 seg [A], 30 seg [B], 60 seg [C], 90 seg [D], 120 seg [E]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med  $\pm$  DP. 64
- Figura 16** - Curva padrão do ensaio da atividade da enzima catalase em diferentes volumes de homogenato de fígado (50, 70, 90, 110, 130 e 150  $\mu$ L) e tempos de reação: 30 seg [A], 60 seg [B], 90 seg [C], 120 seg [D]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med  $\pm$  DP. 65
- Figura 17** - Curva padrão do ensaio da atividade da enzima catalase em diferentes volumes de homogenato de músculo plantar (80, 100, 120, 140, 160  $\mu$ L) e tempos de reação: 30 seg [A], 60 seg [B], 90 seg [C], 120 seg [D]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med  $\pm$  DP. 66
- Figura 18** - Curva padrão do ensaio da atividade da enzima catalase em diferentes volumes de homogenato do músculo gastrocnêmio vermelho (100, 120, 140, 160 e 180  $\mu$ L) e tempos de reação 30 seg [A], 60 seg [B], 90 seg [C], 120 seg [D]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med  $\pm$  DP. 67

## V. LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Protocolo de treinamento físico (Hohl <i>et al.</i> , 2009).	20
<b>Tabela 2</b> - Descrição dos estágios do teste de performance (Hohl <i>et al.</i> , 2009).	21
<b>Tabela 3</b> - Concentração de glicogênio no fígado (FIG) e nos músculos plantar (P), gastrocnêmio vermelho (GV) e gastrocnêmio branco (GB) nos grupos controle adaptado (CA), controle treinado (CT), treinado e suplementado com quercetina (Q), caldo de cana (CC) ou maltodextrina (M) .	30
<b>Tabela 4</b> - Concentração de uréia e enzima creatina quinase (CK) no plasma.	31
<b>Tabela 5</b> - Peroxidação lipídica no plasma (Sangue), no fígado (Fig) e nos músculos plantar (P) e gastrocnêmio vermelho (GV) dos grupos controle adaptado (CA), controle treinado	32
<b>Tabela 6</b> - Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutatona redutase (GR) no sangue, fígado e músculos gastrocnêmio vermelho e plantar. Capacidade antioxidante total (FRAP) e concentração de ácido úrico no plasma.	33
<b>Tabela 7</b> - Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutatona redutase (GR), nas hemácias. Capacidade antioxidante total (FRAP), concentração de ácido úrico, peroxidação lipídica (TBARS) no plasma.	69
<b>Tabela 8</b> - Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutatona redutase (GR), peroxidação lipídica (TBARS) no homogenato de fígado.	69
<b>Tabela 9</b> - Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutatona redutase (GR), peroxidação lipídica (TBARS) no homogenato do músculo gastrocnêmio vermelho.	70
<b>Tabela 10</b> - Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutatona redutase (GR), peroxidação lipídica (TBARS) no homogenato do músculo plantar.	70

# 1. Introdução

## 1.1 Treinamento Físico e Resposta Adaptativa

O treinamento físico pode ser definido como um conjunto de atividades (exercício físico) programadas e realizadas de forma sistematizada e crônica. Do ponto de vista biológico, o exercício físico representa a carga alostática responsável por promover o desequilíbrio dos sistemas orgânicos, necessário para produzir as respostas adaptativas, ou seja, gerar uma nova alostasia. Dependendo da frequência da carga alostática, da magnitude e tipo de resposta que essa carga alostática gera no organismo, a nova alostasia produzida pode significar melhora de desempenho (McEwen, 1998).

Cada modalidade utiliza meios e métodos de treinamento diferentes para aprimorar a performance, manipulando as variáveis como a duração, frequência (agudo e crônico), intensidade (aeróbico e anaeróbico), tipo de contração muscular (isométrico, concêntrica e excêntrica), tempo de pausa e velocidade de execução dos movimentos (Gomes *et al.*, 2012). Esse repertório de estímulos usado de forma diversificada e nos momentos adequados induz distúrbios agudos nas células e órgãos relacionados à fadiga, que disparam respostas adaptativas distintas como o aumento da massa muscular ou melhora do metabolismo oxidativo, entre outros (Hawley *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que a resposta adaptativa que culmina na alteração de fenótipo depende de um processo intenso de síntese proteica diferenciada que acontece sempre no período de descanso, de recuperação do esforço, também chamado de período regenerativo. Durante o descanso, deve ser repostado através da alimentação, o que foi consumido durante o treino permitindo a recuperação das reservas de nutrientes (Nunes *et al.*, 2012; Ferraresso *et al.*, 2012). Dentre essas reservas a principal delas é o glicogênio muscular que, por sua versatilidade do ponto de vista energético, é o combustível primário durante praticamente todos os tipos de exercícios, os intensos de curta duração e os prolongados de moderada a alta intensidade (Romijn *et al.*, 1993).

O glicogênio é um polímero de glicose e constitui uma importante forma de reserva deste carboidrato no organismo. As reservas de glicogênio estão localizadas em diversos tecidos, no entanto as principais encontram-se no fígado e nos músculos. A reserva hepática atinge cerca de 100 g, aproximadamente um terço da reserva muscular. Suas funções são distintas: o glicogênio hepático tem a função de exportar glicose para o sangue nos períodos de jejum, a fim de manter a glicemia em valores basais que variam entre 70-99 mg/dL sangue (SBD, 2009). O glicogênio muscular é utilizado pelas próprias fibras musculares para o fornecimento de energia na forma de ATP, ou por meio de reações que não envolvem a presença de O<sub>2</sub> (glicogenólise anaeróbica) ou da via oxidativa mitocondrial.

As concentrações de glicogênio muscular podem ser influenciadas pelo exercício, consumo de carboidratos e condicionamento físico, variando entre 20 a 200 mmol.kg<sup>-1</sup> de tecido úmido, dependendo da interação entre esses fatores (Hargreaves *et al.*, 1997). A fadiga durante o exercício prolongado parece associada à depleção do glicogênio muscular (Bergstro *et al.*, 1967; Hultman, 1967). Postula-se que a restauração dos estoques de glicogênio muscular após o exercício exaustivo é um dos fatores determinantes do tempo necessário para a recuperação pós-esforços (Jentjens & Jeukendrup, 2003). Conseqüentemente, altos níveis do glicogênio muscular pré-exercício são essenciais para um desempenho ótimo (Costill, 1988; Ivy, 1991; Burke *et al.*, 1995).

O aumento na glicemia após as refeições constitui o sinal para o pâncreas secretar insulina. Esse hormônio estimula a síntese de glicogênio por promover a desfosforilação de algumas enzimas-alvo. Dentre elas, as enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase que, quando desfosforiladas tornam-se ativas e inativas, respectivamente. Dessa forma, a insulina ativa a síntese e ao mesmo tempo inibe a degradação do glicogênio.

A síntese de cada grânulo de glicogênio é iniciada por uma proteína chamada glicogenina, identificada como a menor subunidade (37 kDa) da glicogênio sintase (Hansen *et al.*, 2000). A glicogenina possui atividade autocatalítica, que permite a transferência de resíduos de glicose da molécula de UDP-glicose para ela própria através da ligação a Tyr-194 (Lomako *et al.*, 1990; 1991; Lomako *et al.*, 1993) até gerar um oligossacarídeo *primer*, com 7-11 resíduos glicosil, que serve

como substrato para a enzima glicogênio sintase. A partir daí a enzima glicogênio sintase, em conjunto com a enzima ramificadora, que catalisa a ligação do tipo  $\alpha$ -1,6 (a cada 8 ou 12 resíduos de glicose) catalisam a formação de dois *pools* distintos de glicogênio: *proglicogênio* e *macroglucogênio*, ambos ramificados, com várias extremidades livres para a ação das enzimas glicogênio sintase e fosforilase (Alonso *et al.*, 1995).

No fígado, a captação da glicose plasmática pelos hepatócitos não é diretamente dependente da insulina. Porém, a insulina induz a síntese da enzima glicoquinase, responsável pela fosforilação da glicose em glicose 6-fosfato, favorecendo sua permanência no hepatócito e conseqüentemente a síntese de glicogênio. Já a captação de glicose pela musculatura é dependente de insulina. A ligação da insulina ao seu receptor na membrana estimula a via da PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase), que sinaliza a migração dos transportadores de glicose (GLUT-4) para o sarcolema. É importante ressaltar, no entanto, que a ressíntese de glicogênio após o exercício pode ocorrer de maneira independente de insulina (Jentjens & Jeukendrup, 2003). Essa fase é rápida. Começa imediatamente após o término do exercício e dura aproximadamente de 30 a 60 minutos.

Postula-se que a ressíntese de glicogênio independente de insulina seja resultado do aumento no número de transportadores GLUT-4 (Hayashi *et al.*, 1997; Ivy & Kuo, 1998), sinalizado principalmente pelas baixas concentrações de glicogênio muscular, por EROs, óxido nítrico, ativação da enzima quinase dependente de AMP (AMPK) entre outros fatores (Price *et al.*, 2000; Nikolaidis *et al.*, 2012). Estudos apontam que a depleção dos estoques de glicogênio intramuscular parece ser o principal regulador da atividade da enzima *glicogênio sintase*, mais do que a insulina ou a contração muscular (Jentjens & Jeukendrup, 2003).

Além dos fatores citados acima, a ressíntese de glicogênio, tanto muscular quanto hepático, após a atividade física é bastante influenciada pela ingestão de carboidratos (CHO). O fornecimento de CHO no tempo correto e, principalmente, do tipo de carboidrato consumido pode determinar a restauração completa do glicogênio muscular entre 24-48 h (Ivy, 1999; Jentjens & Jeukendrup, 2003).

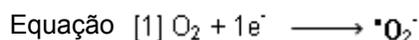
Embora as adaptações bioquímicas e fisiológicas induzidas pelos diferentes tipos de exercícios venham sendo bastante estudadas, os mecanismos moleculares que levam a essas adaptações específicas ainda estão em fase de discussão e pobremente definidos (Nader & Esser, 2001; Ji, 2007; Favier *et al.*, 2008). Uma via de sinalização muito discutida na literatura no contexto da resposta adaptativa molecular é a alteração no estado redox intracelular induzida pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que acompanha o aumento da atividade contrátil muscular (Smith & Reid, 2006; Ji, 2007).

## 1.2. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Radicais livres são moléculas orgânicas e inorgânicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados, e que são capazes de existir independentemente. O oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) ou oxigênio triplete pode ser considerado um radical livre, pois contém dois elétrons desemparelhados de *spins* iguais, localizados em dois orbitais diferentes. Embora essa disposição atômica aumente a reatividade dos radicais livres, de maneira geral, na molécula do O<sub>2</sub> essa configuração produz uma condição que impõe que a entrada dos quatro elétrons na molécula de O<sub>2</sub> deve ser sempre um de cada vez para a molécula do O<sub>2</sub> ser reduzida a H<sub>2</sub>O. Essa condição é chamada de restrição de *spin*, e possibilita a ocorrência de moléculas constituídas de cadeias carbônicas altamente reduzidas em uma atmosfera com 21% de O<sub>2</sub> como a da Terra, apesar do alto potencial redox do par O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (E<sup>0</sup>=+0,82 mV) (Bianchi & Antunes, 1999; Gandra *et al.*, 2006).

No entanto, O<sub>2</sub> pode dar origem a espécies radicalares mais reativas, ou por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Quando o O<sub>2</sub> no estado fundamental absorve energia formam-se as espécies excitadas denominadas oxigênio singlete. Nessa forma a restrição de *spin* desaparece, o que lhes confere um maior poder oxidante. Outra via de formação de espécies radicalares acontece durante a redução do O<sub>2</sub>. Essa é a principal forma de produção de radicais livres nos organismos vivos.

O início da produção de EROs nos organismos vivos está atrelado a redução monoelétrica do O<sub>2</sub>, que produz radical ânion superóxido (<sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>) [Equação 1].



Seguem abaixo as principais formas de produção de  $\cdot\text{O}_2^-$  induzida pelo exercício, discutidas na literatura:

**Mitocôndrias:** Estudos mostraram que a mitocôndria produz mais  $\cdot\text{O}_2^-$  quando a cadeia de transporte de elétrons está altamente reduzida, situação conhecida como estado respiratório 4 quando comparada ao estado 3 (altas demandas de ATP, como durante o exercício) (Gandra *et al.*, 2006; Powers *et al.*, 2011).

**Enzima NADPH oxidase:** Esta enzima está presente em muitos compartimentos celulares como membranas plasmáticas, endotélio celular, retículo sarcoplasmático e túbulos transversos, e produz  $\cdot\text{O}_2^-$  através da transferência de um elétron do NADPH para o  $\text{O}_2$ . Nos túbulos transversos sua atividade é aumentada com a despolarização provocada pelo estímulo elétrico, que altera a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático através da oxidação dos receptores de rianodina. A NADPH oxidase quase sempre está inativa, tornando-se ativa durante o exercício, nos processos pró-inflamatórios ou antimicrobianos (Gomes *et al.*, 2012).

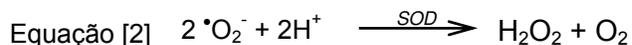
**Enzima Xantina Oxidase:** esta enzima participa da via das purinas. Catalisa a conversão de hipoxantina em xantina e produz ácido úrico como produto final. Em situações especiais como na hipóxia com posterior reperfusão de  $\text{O}_2$ , parecido com o que ocorre em exercícios de alta intensidade, isométricos, ou com fluxo sanguíneo prejudicado devido a doenças vasculares (Ji, 2000), sua conversão da forma desidrogenase para xantina oxidase é estimulada. A xantina desidrogenase produz hipoxantina e ácido úrico através da redução do  $\text{NADP}^+$  em NADPH. Já a xantina oxidase libera os mesmos produtos finais, reduzindo o  $\text{O}_2$  ao invés do  $\text{NADP}^+$ , resultando assim na produção de  $\cdot\text{O}_2^-$  (Ji, 1999; Gandra *et al.*, 2006). Exercícios intensos requerem alta demanda de energia, que é suprida pela intensa hidrólise de ATP e atividade da enzima mioquinase, com consequente produção de AMP. Este último, por sua vez, será degradado na via das purinas, contribuindo para a liberação de  $\cdot\text{O}_2^-$  como subproduto.

**Neutrófilos e Resposta Inflamatória:** Em resposta aos danos teciduais causados, tanto pela contração muscular quanto por infecções provocadas por bactérias e vírus, o sistema imune instala uma inflamação no local. O intuito é reparar os danos e remover as proteínas danificadas. Os

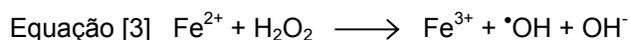
neutrófilos e células fagocíticas nesse ambiente produzem  $\cdot\text{O}_2^-$  através do *burst* respiratório (Silva & Macedo, 2011).

Existem outros mecanismos que podem contribuir para o aumento da produção de  $\cdot\text{O}_2^-$  durante a realização do exercício físico tais como o aumento da temperatura e concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (Supinski, 1998), enzima mitocondrial glicerol-3-fosfato desidrogenase ligada a membrana (Jesina *et al.*, 2004), enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase do Ciclo de Krebs (Tretter & Adam-Vizi, 2004), cicloxigenases (COX) (Dupouy *et al.*, 2006), enzima óxido nítrico sintase (Reid, 1996), que produz o radical óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ), sendo que este também pode gerar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) quando associado ao  $\cdot\text{O}_2^-$  (Reid, 1998; Ichimori *et al.*, 1999), processos dependentes da fosfolipase A2 (Powers & Jackson, 2008; Powers *et al.*, 2011), auto-oxidação da hemoglobina (Gandra *et al.*, 2006), auto-oxidação de catecolaminas (Ji, 1999) e peroxissomos (Ji, 1999; Gandra *et al.*, 2006).

O  $\cdot\text{O}_2^-$  dá início à formação das outras duas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Assim, ao ser produzido em meio aquoso o  $\cdot\text{O}_2^-$  é rapidamente dismutado em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  principalmente pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) [Equação 2].



O terceiro, e mais importante radical livre formado durante o processo de redução do  $\text{O}_2$  é o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ). A geração de  $\cdot\text{OH}$  a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocorre na presença de metais de transição presentes em grandes quantidades dentro das células como o  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ , através de uma reação conhecida como de Fenton [Equação 3].



Considerando todas as EROs formadas, o  $\cdot\text{OH}$  é a espécie radicalar que tem maior poder reativo, com um elevadíssimo potencial de causar danos ao organismo, principalmente porque não existem enzimas capazes de eliminá-lo. Apresenta baixa capacidade de difusão entre os tecidos, e meia-vida curtíssima (nano segundos), podendo atacar todas as moléculas biológicas (Bianchi & Antunes, 1999). Esse ataque ocorre frequentemente por abstração de hidrogênio ou por adição em insaturações (Barreiros *et al.*, 2006).

### 1.2.1. Consequências do aumento da produção de EROs no organismo

Altas concentrações de  $\cdot\text{OH}$  podem causar danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocôndrias. Todos os constituintes do DNA como as bases nitrogenadas e a desoxirribose podem ser atacados. A interação com as bases nitrogenadas por adição em insaturações pode levar a erros quando o DNA é copiado, introduzindo uma mutação. Já a reação com o açúcar pode causar a abstração de um dos átomos de hidrogênio e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA (Barreiros *et al.*, 2006).

Nos aminoácidos e proteínas, o  $\cdot\text{OH}$  pode gerar danos como clivagens de ligações, que podem levar a perda de atividade enzimática; dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares; alteração do metabolismo e morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1999). Além disso, pode induzir decréscimo no transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático, alterar as funções mitocondriais, formar metabólitos tóxicos e alterar o metabolismo da glutatona intracelular (Meister, 1983).

As membranas celulares e intracelulares possuem grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, constituindo alvo importante para o ataque oxidativo, um processo conhecido como *peroxidação lipídica*. Isso acontece quando um  $\cdot\text{OH}$  reage com um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana plasmática, produzindo um radical peroxila (Gaté *et al.*, 1999). Este radical é altamente reativo e por já estar localizado na membrana pode atacar outro ácido graxo e as proteínas de membrana. A peroxidação lipídica diminui a fluidez das membranas atacadas, alterando com isso a permeabilidade das mesmas a íons e pequenas moléculas e uma gama de respostas celulares.

Como as EROs são produzidas normalmente em condições fisiológicas, cada vez está mais evidenciado que as EROs modulam o estado redox de proteínas de vias de transdução de sinal, influenciando a expressão gênica (Jackson, 1999; Reid, 2001). Evidências experimentais tem mostrado um efeito pronunciado nas vias metabólicas relacionadas com a atividade ATPase, liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , atividade da creatina quinase, biogênese mitocondrial e diferenciação da fibra muscular (Taylor & Starnes, 2003; St-Pierre *et al.*, 2006). Também tem sido proposto que as EROs

regulam o transporte de glicose para dentro das células, o fluxo sanguíneo, e até mesmo a função contrátil no músculo esquelético (Balon & Yerneni, 2001; Reid, 2001).

### 1.3. Antioxidantes

Segundo Halliwell (2000) antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas às do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo.

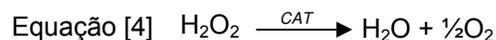
Os antioxidantes podem ser sintetizados *in vivo* e obtidos da dieta. A ação antioxidante pode ocorrer em três níveis distintos: prevenção da formação de EROs; eliminação das EROs formadas; reparo das moléculas danificadas pelas EROs (Sies, 1993; Alderton *et al.*, 2001). Em seres humanos, a composição das defesas antioxidantes (enzimática e não enzimática) difere de tecido para tecido, de tipo de célula para tipo de célula e, possivelmente, de célula para célula do mesmo tipo em dado tecido (Halliwell & Gutteridge, 1999).

#### 1.3.1 Sistema de Defesa Antioxidante Enzimático

O sistema enzimático constitui a primeira linha de defesa antioxidante das células. As principais enzimas antioxidantes que o compõem são: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase.

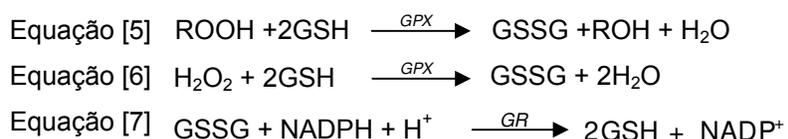
**Superóxido dismutase (SOD):** é uma metaloenzima presente no citosol (dependente de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ) e nas mitocôndrias (dependente de  $\text{Mn}^{2+}$ ), que catalisa a formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  a partir da dismutação do  $\cdot\text{O}_2^-$ , diminuindo seus níveis abaixo de  $10^{-11}$  M (Halliwell & Gutteridge, 1999). [Equação 2].

**Catalase (CAT):** é uma enzima extensivamente distribuída dentro das células, podendo ser encontrada em maior concentração em fibras musculares tipo I (Powers & Jackson, 2008). Seu mecanismo de ação consiste em decompor o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado a  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  [Equação 4].



**Sistema Glutathione Peroxidase/Glutathione Redutase (GPX/GR):** Estas duas enzimas trabalham de forma integrada juntamente com a glutathione reduzida (GSH). Estão presentes nas mitocôndrias e citosol (Powers & Jackson, 2008). O selênio atua como cofator neste sistema, explicando a importância desse metal e sua atuação como antioxidante nos organismos vivos (Barreiros *et al.*,

2006). A GPX catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos [reação 5] e  $\text{H}_2\text{O}_2$  [reação 6] a álcool e  $\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente, em uma reação que envolve o peptídeo glutationa reduzida (GSH) como substrato (Halliwell & Gutteridge, 1999; Alves *et al.*, 2003). A glutationa oxidada (GSSG) é reduzida novamente através da ação da enzima GR, tendo como doador de elétrons o NADPH [reação 7]:



No tecido muscular as duas enzimas, GPX e GR, e seu substrato (GSH) são expressos constitutivamente. Entretanto, sua distribuição tende a variar de acordo com as propriedades metabólicas do tecido analisado, exibindo atividades maiores em fibras mais oxidativas como as fibras tipo I (Powers *et al.*, 1999; Powers & Jackson, 2008).

### 1.3.2 Sistema de Defesa Antioxidante Não-Enzimático

Além dos antioxidantes enzimáticos existem os antioxidantes não enzimáticos, coletivamente chamados de antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM). As células musculares, assim como outros tecidos e os fluidos corporais (plasma, saliva, sêmen) possuem antioxidantes importantes tais como glutationa reduzida (GSH), cisteína, ácido úrico, bilirrubina, coenzima Q, ácido lipóico, algumas proteínas, compostos fenólicos, vitamina C, vitamina E entre outros. Os antioxidantes não enzimáticos plasmáticos presentes em maiores concentrações são a vitamina C e o ácido úrico (Kohen & Nyska, 2002; Gomes *et al.*, 2012).

Os ABPM são importantes na proteção contra EROs, pois estão presentes nas células e fluidos em concentrações muito maiores que os antioxidantes enzimáticos. Os ABPM podem ser sintetizados endogenamente ou advir da alimentação. Como os ABPM podem ser hidrofílicos ou lipofílicos estão presentes nos locais específicos em que os danos causados pelas EROs podem ocorrer, exercendo um papel fundamental para a capacidade antioxidante total de sistemas biológicos (Halliwell & Gutteridge, 1999; Gandra *et al.*, 2004).

#### 1.4. Exercício Físico e Estresse Oxidativo

O termo “estresse oxidativo” pode ser caracterizado como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando ao rompimento do controle e sinalização redox e aparecimento de danos moleculares” (Powers & Jackson, 2008).

Aumentos nos níveis de estresse oxidativo podem ocorrer devido ao aumento exacerbado na produção de EROs e outros radicais livres (exercício intenso ou prolongado, patologias, processos inflamatórios) ou por uma depleção da capacidade antioxidante dos sistemas de defesa (doença, dieta pobre, mobilização de ácidos graxos no tecido adiposo) (Powers *et al.*, 2004; Sen, 2001).

Desde o clássico experimento conduzido por Hill *et al.* (1924), que mostrou aumento no consumo total de O<sub>2</sub>, com rompimento da homeostasia não só do tecido muscular, mas também em outros tecidos tais como o cardíaco, vasos sanguíneos e o próprio sangue, vários estudos tem investigado o potencial estressor do exercício físico e suas diversas formas de alteração na homeostasia intracelular (Coyle, 2000; Gandra *et al.*, 2006). Em resposta à estimulação elétrica, por exemplo, miofibrilas cultivadas produziram EROs, bem como Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) como o óxido nítrico (\*NO) (Silveira *et al.*, 2003; Pattwell *et al.*, 2004; Mcardle *et al.*, 2005).

Diversos estudos (McAnulty *et al.*, 2007; Powers & Jackson, 2008; Hudson *et al.*, 2008; Quindry *et al.*, 2008) utilizando modelos animais e humanos demonstraram que diferentes modalidades esportivas (ciclismo, corrida e exercício resistido) e intensidades resultam em aumentos dos biomarcadores de danos oxidativos tanto no sangue quanto no músculo esquelético. Esses aumentos parecem ser dose-dependentes em relação aos incrementos de intensidade (Alessio *et al.*, 2000; Quindry *et al.*, 2003) e duração da atividade (Hessel *et al.*, 2000). Na verdade, aumentos em biomarcadores de ataque oxidativo sem o concomitante aumento na capacidade de defesa antioxidante parecem resultar de protocolos de exercício agudos, realizados até a exaustão. Este tipo de atividade parece afetar o funcionamento de várias enzimas quando aplicado tanto em animais sedentários quanto em animais já treinados (Criswell *et al.*, 1993; Prada *et al.*, 2004).

Trabalhos de Ji *et al.* (1990) e Alessio (1993) mostraram aumentos significativos na concentração de malondialdeído em músculos de ratos sedentários após exercício exaustivo, apontando que níveis mais severos de peroxidação lipídica parecem ser dependentes do estado de treinamento do animal. Protocolos de exercícios agudos (aeróbico ou resistido) mais recentes também mostraram níveis aumentados de peroxidação lipídica (Miyazaki *et al.*, 2001; Viitala *et al.*, 2004). Lamprecht *et al.* (2004) mostraram que indivíduos pouco treinados apresentaram níveis maiores de danos musculares induzidos pelo estresse oxidativo quando comparado à indivíduos treinados.

Por outro lado, animais e humanos engajados em um programa de treinamento de longo prazo parecem mais resistentes ao estresse oxidativo, principalmente devido à adaptação de seu sistema de defesa antioxidante (Jenkins, 1988; Miyazaki *et al.*, 2001). Tecidos com maior taxa de consumo de O<sub>2</sub> como fígado, coração e cérebro expressam constitutivamente mais enzimas antioxidantes do que os tecidos com menor consumo de oxigênio. O mesmo comportamento é observado no músculo esquelético em relação a fibras oxidativas e glicogenolíticas. Porém, a capacidade de defesa antioxidante enzimática e não enzimática do músculo é relativamente menor do que em outros órgãos (Ji, 2002; Ferrarresso *et al.*, 2012).

Vale ressaltar que o aumento nos níveis de estresse oxidativo não ocorre apenas pelo aumento da produção de EROs, mas também pela alteração dos antioxidantes endógenos e consumo de antioxidantes dietéticos. Tendo em vista o exposto, a necessidade de estudos sobre os efeitos do treinamento nos níveis de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos parece evidente para a compreensão dos efeitos de protocolos de treinamento sabidamente adaptativos e sua relação com o estresse oxidativo.

#### **1.4.1. Efeitos Antagônicos da produção de EROs na adaptação ao exercício**

Sendo a atividade contrátil um potente produtor de EROs e que várias vias de sinalização redox celular são sensíveis a essa alteração oxidativa (Powers *et al.*, 2011), vem sendo muito discutido na literatura qual a influência que a geração de EROs induzida pelo exercício teria na adaptação ao treinamento e performance atlética. Os trabalhos vêm mostrando que a produção de

radicais livres durante o exercício físico tem efeitos fundamentais na adaptação ao exercício tanto benéficos quanto maléficos.

As adaptações favoráveis induzidas pelas espécies reativas geradas pela contração muscular ocorrem quando pequenas quantidade de EROs são produzidas. Nesta situação, elas exercem papel de moléculas de sinalização intracelular, transmitindo sinais da membrana para o núcleo. Dessa forma, estimulam fatores de transcrição gênica e conseqüentemente a cascata de sinalização para expressão de genes relacionados à adaptação metabólica, como a síntese de enzimas de vias de produção de ATP (Ji, 2008), do sistema de defesa antioxidante (Gomes *et al.*, 2012), mitogênese (Baar, 2004), angiogênese (Gomes *et al.*, 2012), hipertrofia muscular (Sen & Roy, 2005) e conversão de fibras (Ji, 2008).

Parece que a influência da concentração de EROs é dose dependente na produção de força. Um pequeno aumento na produção de EROs parece ser necessário para uma produção aumentada de força a contração muscular. Enquanto, excesso de EROs geradas pelo exercício resultam em declínio na produção de força pelo músculo esquelético e aumento da fadiga muscular comprometendo a função contrátil muscular e prejudicando a performance (Reid *et al.*, 2002; Powers *et al.*, 2004; Powers *et al.*, 2011). Segundo Powers *et al.* (2008), fadiga muscular é a “redução da produção da força muscular máxima induzida pelo exercício”.

Resumindo, qualquer desvio do balanço redox ótimo pode levar a uma redução na produção de força e aumento da fadiga no músculo esquelético. Porém, isso não ocorre apenas pela alteração na produção de EROs, mas também pelo comportamento dos antioxidantes endógenos e no consumo de antioxidantes dietéticos.

## **1.5. Exercício Físico e Suplementação**

As suplementações no exercício tem o objetivo de contribuir para uma melhora do desempenho, para uma melhor adaptação aos estímulos de treino e para proteger contra lesões indesejadas. No caso de suplementos para recuperação do glicogênio muscular e hepático, está bem documentado na literatura que a ingestão de carboidratos de moderado a alto índice glicêmico [IG] (0,7 – 1,5 g/kg de massa corporal), em intervalos frequentes (30 a 60 minutos), durante um período de recuperação de até 2h pós-esforço permite uma maior reposição de glicogênio

(Jentjens & Jeukendrup, 2003). Na prática desportiva, normalmente são utilizadas soluções de monossacarídeos ou de amidos como a maltodextrina, em diluições apropriadas. Alguns estudos mostraram taxas similares de síntese de glicogênio muscular após a ingestão, tanto da glicose quanto da sacarose (moderado IG) (Blom *et al.*, 1987; Casey *et al.*, 2000), embora a sacarose contenha quantidades equimolares de glicose e frutose.

A suplementação, principalmente com antioxidantes, é um assunto que vem sendo muito debatido na literatura. Tem sido grande a atenção dispensada na investigação sobre sua eficácia tanto na proteção contra EROs quanto na melhoria do desempenho em sujeitos treinados. Evidências sugerem que a suplementação antioxidante deve, de fato, atenuar algumas adaptações em tecido vascular e músculo esquelético (Meilhac, 2001; Gomez-Cabrera *et al.*, 2005). Segundo Peake *et al.* (2007) parece que indivíduos destreinados devam ser mais responsivos à suplementação antioxidantes que atletas treinados em endurance.

Estudos mostram que alguns tipos de suplementação antioxidante podem retardar a fadiga muscular causada pelo exercício físico e melhorar performance (Wang *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2009a; Yu *et al.*, 2010) e preservar a função contrátil do músculo esquelético (Powers *et al.*, 2004). Porém, a eficácia da suplementação antioxidante em retardar a fadiga muscular, depende das propriedades químicas do antioxidante utilizado (Powers *et al.*, 2011).

Ramires & Ji (2001) publicaram uma pesquisa analisando o efeito da suplementação antioxidante (GSH) e do treinamento por 10 semanas. Os resultados apontaram para melhora significativa em todos os parâmetros analisados no grupo treinado e suplementado comparado aos grupos somente treinados, somente suplementados ou que não passaram pelo treinamento e nem ingeriram o suplemento.

Para Nikolaidis *et al.* (2012) o principal fator que influencia nas respostas da suplementação antioxidante é a dose de antioxidantes utilizada. Também é necessário considerar que o sucesso da suplementação antioxidante depende do tipo de exercício e da extensão do dano muscular gerado (Peake *et al.*, 2007). Além disso, é necessário ter cautela na utilização de suplementos antioxidantes, pois dependendo das condições e dose, os mesmos podem atuar como pró-oxidantes (Decker, 1997).

Apesar dos tópicos exercício, estresse oxidativo, suplementação antioxidante e sucesso esportivo serem colocados na mídia como já totalmente esclarecidos e correlacionados, na literatura científica ainda permanecem muitas dúvidas. Alguns estudos sugerem efeitos ergogênicos da suplementação antioxidante (Novelli *et al.*, 1990; Devi *et al.*, 2003) outros não encontraram efeitos na performance (Clarkson, 1995; Ashton *et al.*, 1999), e outros demonstraram prejuízos no desempenho (Coombe *et al.*, 2002; Marshall *et al.*, 2002). Essa diversidade de resultados se deve a uma grande variedade de protocolos com diferentes intensidades e durações do exercício, status de treinamento e antioxidante dos indivíduos avaliados, dieta, gênero, tecido analisado, tipo e dose de antioxidante suplementado. Assim, muitos estudos ainda são necessários para elucidar melhor a relação entre estes assuntos e os mecanismos envolvidos.

Outros fatores que influenciam as respostas de pesquisas com suplementação de uma maneira geral, parecem estar relacionados com: momentos das suplementações (antes, durante e/ou após exercício); período de suplementação (dias, semanas); biodisponibilidade dos nutrientes/antioxidantes durante o exercício; tipos de metabólitos formados; onde e como foram gerados esses metabólitos; análise e métodos para a identificação dos danos (Bianchi & Antunes, 1999; Peake *et al.*, 2007).

### **1.5.1. Caldo de Cana de Açúcar como bebida pós-treino**

O caldo de cana contém em sua composição uma quantidade significativa de sacarose, que corresponde a cerca de 70% a 91% de seus sólidos solúveis, e em média 65% a 75% de água. A cana também contém glicose (2% a 4%), frutose (2% a 4%), sais minerais ( $K^+$ ,  $P$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  e  $Ca^{2+}$ ) (3% a 5%), proteínas (0,5% a 0,6%), amido (0,001% a 0,05%), ceras e lipídios (0,05% a 0,15%), corantes (principalmente compostos polifenólicos) (3% a 5%), vitaminas do complexo B e ascorbato (Franco, 2001). Além desses, a cana de açúcar contém ácidos fenólicos, flavonóides e outros compostos fenólicos. O consumo de 250 mL de caldo de cana resulta na ingestão de 40 mg de fenólicos (160 mg/ L), assim o caldo de cana representaria uma importante fonte desses compostos antioxidantes na dieta (Duarte-Almeida *et al.*, 2006).

Em vista dessa riqueza de nutrientes em sua composição, algumas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para investigar a possibilidade de utilização do caldo cana como suplemento esportivo.

Um trabalho inicial do grupo (Stancanelli *et al.*, 2006) avaliou o efeito do caldo de cana como repositor das reservas de glicogênio que foram depletadas durante a atividade física. Nesse contexto, mostrou que o consumo crônico de caldo de cana por jogadores de futebol pós-treino ou pós-jogos durante todo o campeonato, além de ser bem aceito por todos, contribuiu para uma diminuição nas concentrações plasmáticas de uréia (catabólito proveniente da proteólise).

Mais interessante ainda, quando os mesmos autores submeteram animais a uma série de exercício exaustivo agudo o grupo de animais não suplementados exibiu aumento na atividade plasmática da CK, com uma grande variabilidade na resposta intra-grupo mesmo após 48 h de recuperação com alimentação *ad libidum*. Já o grupo suplementado com caldo de cana imediatamente após o exercício apresentou valores de atividade plasmática da CK próximos aos valores do grupo controle, com uma grande homogeneidade na resposta em qualquer um dos tempos analisados pós-exercício [3, 6, 24 e 48 h]. A suplementação com caldo de cana (0,7 g/kg peso) foi eficiente em aumentar os estoques de glicogênio muscular após 1 h de recuperação de uma única série de exercício exaustivo, principalmente nos músculos que foram mais depletados durante o exercício.

Outro estudo também envolvendo os efeitos da suplementação com caldo de cana, os resultados apontaram que este alimento foi tão eficiente quanto a maltodextrina e a frutose como bebida pós treino, substâncias popularmente utilizadas para este fim no meio esportivo (Iniciação Científica: Normand ACR, 2007; Tese de Mestrado: Machado EA, 2009). Além de repor os estoques de glicogênio muscular a suplementação com caldo de cana também estimulou a recuperação do glicogênio hepático. Contudo, os dados obtidos até esse momento avaliaram apenas os efeitos do uso do caldo de cana como repositor de glicogênio, e apenas quando o exercício foi realizado de forma aguda, indicando efeitos positivos deste alimento como alternativa aos suplementos existentes no mercado.

Neste contexto, abriu-se caminho para a investigação dos efeitos dos seus componentes, relacionados tanto com a porção de carboidratos como com a porção antioxidante, num protocolo de exercício crônico, que foi o foco deste presente trabalho. Para isso, utilizamos como controle positivo das porções de carboidratos e antioxidante presentes no caldo de cana, a maltodextrina e a quercetina, respectivamente.

A maltodextrina (IG alto) é um polímero de glicose fabricado industrialmente a partir do amido da mandioca ou do milho. É desprovida de outros nutrientes, como sais minerais, vitaminas, proteínas. A quercetina é um dos flavonoides mais utilizados na investigação dos mecanismos de ação antioxidante. Ela é também o principal flavonoide consumido na dieta humana (50 a 500 mg/dia), representando cerca de 95% dos flavonoides ingeridos na alimentação.

É importante ressaltar que são escassos na literatura estudos que se preocuparam em analisar parâmetros de estresse oxidativo em vários tecidos e fluidos em animais submetidos a um protocolo de treino e suplementados como foi feito nesse estudo.

## 2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi investigar e caracterizar os efeitos da ingestão de caldo de cana durante as três últimas semanas de um protocolo de treinamento planejado e com as variáveis controladas, em esteira rolante sem inclinação com duração de nove semanas, em parâmetros de estresse oxidativo no sangue, fígado e músculos de ratos Wistar.

Para alcançar esse objetivo foram investigados:

- 1- A eficiência do treinamento proposto em aumentar o desempenho, por meio de um teste de performance realizado no decorrer das semanas de treino;
- 2- O equilíbrio e a qualidade do treinamento, por meio de marcadores de lesão muscular (concentração de creatina quinase no plasma), estado catabólico (concentração de ureia no plasma) e ataque oxidativo (nível de peroxidação lipídica no sangue, fígado e músculos);
- 3- Capacidade do organismo em se defender de um possível aumento na produção de EROs induzida pelo exercício, por meio da quantificação da atividade de enzimas antioxidantes (catalase e glutathione redutase) no sangue, fígado e músculos, e dos antioxidantes não enzimáticos plasmáticos (ácido úrico e capacidade antioxidante total – FRAP).

## 3. Materiais e Métodos

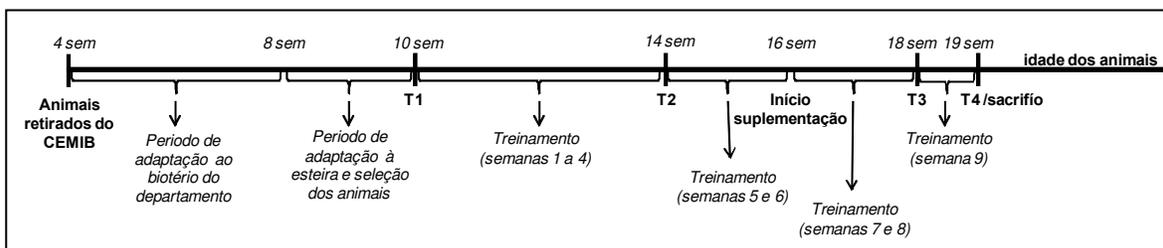
### 3.1 Animais

Foram adquiridos 53 ratos da linhagem Wistar, machos. Porém, foram utilizados 48 animais, divididos em 5 grupos: grupo controle ativo (CA, n=12), grupo controle treinado (CT - exercitado seguido de gavagem com água, n=9), grupo caldo de cana (CC - exercitado seguido de gavagem com caldo de cana, n=9), grupo maltodextrina (M - exercitado seguido de gavagem com maltodextrina, n=9) e grupo quercetina (Q - exercitado seguido de gavagem com quercetina, n=9). Os animais foram adquiridos com 4 semanas de idade, do Centro de Bioterismo da Unicamp e acomodados em biotério climatizado a 25°C ( $\pm 1$ ), com controle de ciclo de luz claro:escuro de 12 horas invertido, com dieta padrão (ração Nuvital - Nuvilab CR-1 Autoclavável) e água *ad libitum*. Permaneceram no nosso biotério para aclimação por mais 4 semanas antes do início do período de adaptação a esteira rolante. Os protocolos experimentais utilizados com os animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IB-UNICAMP [Protocolo 1446-1(A) – Anexo I].

### 3.2 Protocolo de treinamento

Com 8 semanas de idade, todos os 53 animais passaram por um período de adaptação à esteira com duração de 2 semanas, na qual correram a 12 m/min por 10 min, 5 dias por semana. O objetivo dessa fase de adaptação foi excluir os animais que não corriam voluntariamente, selecionando para o treinamento somente aqueles aptos à correr. Assim, 5 animais foram excluídos e os experimentos conduzidos com 48 animais.

Desses 48 animais, 12 foram aleatoriamente selecionados para o grupo CA. Os outros 36 animais participaram do protocolo de exercício e somente no início da 7ª semana de treino foram aleatoriamente subdivididos entre os grupos CT, CC, M, Q.



**Figura 1.** Desenho experimental do protocolo de treinamento. T1=teste de performance antes do treino; T2 = teste de performance após a quarta semana; T3=teste de performance após a oitava semana e T4=teste de performance após a nona semana.

O protocolo de treinamento contínuo em esteira rolante, sem inclinação, consistiu nas nove primeiras semanas do protocolo de treinamento físico já estabelecido na literatura (Hohl *et al.*, 2009) e que investigou parâmetros diferentes dos propostos neste trabalho. Foram selecionadas as primeiras nove semanas por ser o período do protocolo que corresponde a fase adaptativa do treinamento, na qual os animais ainda estão obtendo ganho de performance. O grupo CA que não participou do treinamento, realizou apenas uma vivência na esteira, 3 vezes na semana à 12 m/min por 10 min.

No início de cada sessão de exercício foi feito um aquecimento com duração de 3 min à 12 m/min e a partir daí seguiram os incrementos conforme a Tabela 1. Nas primeiras quatro semanas houve aumento da intensidade (de 15 m/min à 25 m/min) e duração (de 20 minutos à 60 minutos) do esforço com uma sessão de treino por dia, 5 dias por semana e 24 horas de recuperação entre as sessões. Da quinta a oitava semanas foram mantidas a mesma intensidade (25 m/min) e duração (60 minutos) atingidas na quarta semana com uma sessão diária de treino, 5 dias por semana e 24 horas de recuperação entre as sessões. Na nona semana de treino a intensidade (25 m/min) e duração (60 minutos) foram mantidas, porém o número de sessões de treino aumentou de uma para duas sessões ao dia com quatro horas de recuperação entre elas, 5 dias na semana.

**Tabela 1.** Protocolo de treinamento físico (Hohl *et al.*, 2009).

Semana	Duração do treino por sessão (min)	Velocidade de corrida (m/min)	Carga semanal de treinamento (m)	Recuperação entre as sessões (h)	Sessões diárias	Teste de Performance
Adaptação (2 sem)	10	12	600	24	1	
1	20	15	7.500	24	1	T1
2	30	20	3.000	24	1	
3	45	22,5	5.062,50	24	1	
4	60	25	7.500	24	1	T2
5 - 8	60	25	7.500	24	1	T3
9	60	25	15.000	4	2	T4

### 3.3. Teste de Performance

É de extrema importância avaliar se o treinamento realizado está sendo eficaz para alcançar objetivo proposto, que no caso do presente trabalho tinha como objetivo aumentar a performance. Para isso, nós realizamos um teste em quatro momentos chaves do treinamento: antes do início do treinamento (T1), após o período de aumento de sobrecarga (T2, semanas 1 a 4), após o período de manutenção de sobrecargas (T3, semanas 5 a 8) e após uma nova sobrecarga de treinamento (T4, semana 9).

Neste teste, quantificamos o desempenho dos animais durante o protocolo de treinamento (Hohl *et al.*, 2009). Cada teste de performance consistiu em uma sessão de exercício incremental, em esteira rolante, até os animais atingirem a exaustão conforme descrito na Tabela 2. O teste foi iniciado com velocidade de 12 m/min e a cada 2 minutos a velocidade de corrida era acrescida em 1 m/min, até ser atingida a velocidade de 20 m/min. A partir daí, os incrementos de velocidade eram de 2 m/min a cada 3 minutos. Foi considerada exaustão a permanência do animal na grade traseira (eletrificada) da esteira, sem movimento de seus membros por pelo menos 10 segundos, ou quando os animais encostavam na grade 5 vezes em 1 minuto (Liu *et al.*, 2000). Ao final dos testes, os animais foram colocados novamente em suas gaiolas com dieta padrão e água *ad libitum*.

**Tabela 2.** Descrição dos estágios do teste de performance (Hohl *et al.*, 2009).

Estágio	Velocidade de corrida (m/min)	Duração do estímulo (min)	Estágio	Velocidade de corrida (m/min)	Duração do estímulo (min)
1	12	2	8	19	2
2	13	2	9	20	2
3	14	2	10	22	3
4	15	2	11	24	3
5	16	2	12	26	3
6	17	2	13	28	3
7	18	2	...	...	...

A quantificação de desempenho foi feita a partir de uma variável relacionada ao trabalho mecânico realizado pelos animais no teste, conforme a equação  $\tau \text{ (kg*m)} = M \times D_t$ , onde M = massa do animal e  $D_t$  a somatória do trabalho realizado em cada estágio do teste de performance (Hohl *et al.*, 2009).

### 3.4 Suplementação

As suplementações foram realizadas na 7<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 9<sup>a</sup> semanas de treino. Optamos por apenas 3 semanas de suplementação devido alguns trabalhos sugerirem que duas semanas de suplementação antioxidante é o tempo mínimo para se observar um efeito (Peake *et al.*, 2007) e também por não saber como os animais reagiriam à gavagem sendo realizada todos os dias. As semanas finais do treinamento foram escolhidas para suplementação, no intuito de preparar os animais para um novo incremento de intensidade de treinamento que ocorreu na nona semana de treino com a inserção da 2<sup>a</sup> sessão de exercício diária e, portanto o momento em que os animais necessitariam de uma melhor recuperação entre os estímulos. As gavagens foram realizadas sempre após o término da sessão de exercício ou teste de performance. Na 9<sup>a</sup> semana, a suplementação ocorreu somente após a segunda sessão de treino do dia.

As suplementações com caldo de cana, quercetina ou maltodextrina foram introduzidas diretamente no estômago do rato, por gavagem estomacal, como mostrado na Figura 2.



**Figura 2.** Procedimento de gavagem após a sessão de treino.

O caldo de cana foi comprado sempre algumas horas antes do início do experimento e no mesmo estabelecimento comercial, para evitar a variação da espécie da planta. As soluções de quercetina e maltodextrina foram preparadas antes do início de cada sessão de exercício.

Para analisar a quantidade de carboidratos presentes no caldo de cana aferimos a porcentagem de sólidos solúveis presentes na amostra, expressos como Graus Brix ( $^{\circ}$ Brix), utilizando um Refratômetro de bancada. No caso do caldo de cana a maior parte dos sólidos solúveis é representado pela sacarose. A solução de maltodextrina foi diluída na concentração utilizada pelos atletas no meio esportivo, 10g CHO/100 mL água e serviu como controle para o carboidrato presente no caldo. A dose de carboidrato suplementada nos grupos caldo de cana e maltodextrina seguiram a recomendação da literatura de 0,7 g CHO/ kg peso corporal para ingestão pós-atividade física (Jentjens & Jeukendrup, 2003).

Como não há um consenso na literatura em relação à dose ideal para suplementação com antioxidante após os treinos optamos por uma solução de quercetina na mesma concentração de antioxidantes encontrada no caldo de cana, para servir como controle indireto dos antioxidantes do caldo. Adotamos como referencia para a concentração de antioxidantes do caldo de cana o valor de 0,16 mg antioxidantes/mL, como quantificado por (Duarte-Almeida *et al.*, 2006). Dessa forma, o volume da solução de quercetina a ser utilizado na gavagem foi igual ao volume da solução oferecida ao grupo caldo de cana.

O grupo Controle Treinado (CT) ingeriu apenas água, e serviu como grupo controle do treinamento. Os animais desse grupo receberam o mesmo volume de líquido ingerido pelo grupo suplementado com caldo de cana.

### 3.5. Avaliação “in vitro” da presença de antioxidantes no Caldo de Cana, Quercetina e na Maltodextrina

Para avaliar “in vitro” a presença de propriedades antioxidantes no caldo de cana, quercetina e maltodextrina utilizamos o ensaio espectrofotométrico do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), que é um teste simples e amplamente empregado para análise de efeito antioxidante em produtos naturais (Mello *et al.*, 2005). O DPPH é um radical livre estável, não natural, cujas propriedades diferem dos radicais de oxigênio altamente reativos como os radicais hidroxila, alcoxila e superóxido (Joyeux *et al.*, 1995).

O princípio do método fundamenta-se na propriedade do DPPH apresentar uma forte absorção no espectro visível 517 nm, caracterizado por uma coloração violácea intensa, devido à presença de elétrons livres. Quando o DPPH é colocado em presença de substâncias capazes de sequestrar radicais livres sua absorção é inibida, resultando em coloração amarelo pálido, numa descoloração estequiométrica em relação ao número de elétrons retirados e independente de qualquer atividade enzimática. O grau de descoloração indica a capacidade sequestradora de radical livre (Mello *et al.*, 2005), ou seja, a presença de propriedades antioxidantes.



Alíquotas de 30 µL com diferentes concentrações de caldo de cana, quercetina e maltodextrina, foram adicionadas à 500 µL de tampão acetato 0,1 M (pH= 5,5), 500 µL etanol e 250 µL de solução etanólica de DPPH 0,5 mM. A mistura foi agitada vigorosamente no vórtex. Após 10 minutos as medidas de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro UV–VIS (Beckman DU-640 Spectrophotometer). A redução do DPPH<sup>·</sup> foi acompanhada pelo monitoramento da diminuição da absorbância a 517 nm ( $A_{517}$ ), obtendo uma curva de decaimento da concentração de DPPH, expressa em % de atividade sequestradora (% AS) (Mello *et al.*, 2005). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas.

### 3.6. Coleta de sangue e retirada das amostras de tecidos

Os animais foram sacrificados 24h após o último teste de performance (T4) realizado dois dias após a nona semana de treino. Os ratos foram anestesiados com Zoletil 50<sup>®</sup> (1:1, 125 mg:125

mg, tiletamina e zolazepam) e Cloridrato de Xilazina, nas dosagens de 50 mg/kg e 11 mg/kg peso corporal, respectivamente, ambos por via intramuscular (Normand *et al.*, 2009), e permaneceram em gaiolas individuais até a anestesia profunda (em torno de 5 minutos). Os reflexos monitorados foram o corneal, auricular, pinçamento abdominal, caudal e pedal.

Após anestesia total a coleta foi iniciada com a abertura da caixa torácica. O sangue foi coletado por punção cardíaca, no ventrículo esquerdo, e transferido para tubos heparinizados (Vaccuette Greiner Bio-one) e imediatamente centrifugado (Centrífuga CT – 6000R) a 1800 g por 10 minutos a 4°C para separação do plasma e células sanguíneas. Após a retirada do plasma as hemácias foram lavadas com solução gelada de Tampão Fosfato 0,1M com NaCl 0,9%, pH 7,4, e centrifugadas a 1800 g, desprezando-se, em seguida, o sobrenadante. O processo de lavagem das hemácias foi repetido três vezes. Alíquotas de 500 µL foram retiradas e hemolisadas com água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore Milli-Q Académic) na proporção 1:1 (v/v), diretamente em microtubos (Axygen, INC, USA).

Imediatamente após a retirada do sangue foram colhidas as amostras dos tecidos hepático e muscular. As coletas seguiram sempre a mesma ordem: fígado (Fig), plantar (P), gastrocnêmio porção branca (GB) e porção vermelha (GV), das patas traseiras, direita e esquerda. A amostra de tecido hepático foi coletada do lobo superior esquerdo. Os tecidos musculares coletados da pata direita foram utilizados para quantificação dos estoques de glicogênio. Já os músculos da pata esquerda foram processados para análise da peroxidação lipídica e atividades enzimáticas.

As amostras de plasma, hemolisado e tecidos foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a - 80°C, em biofreezer (Harris – Ultra Low), até serem processadas.

### **3.7. Preparo dos homogenatos dos tecidos**

Preparo dos homogenatos para análise das enzimas antioxidantes: 60 mg de tecido muscular (plantar e gastrocnêmio vermelho) e 90 mg de tecido hepático foram imersos em 3 ml de solução contendo K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (39 mM), EDTA ácido (1 mM), sacarose (440 mM), pH 7,4 e 1 µL PMSF (phenylmethylsulfonilfluoride) [200mM]. O tecido foi homogeneizado com Politron (Polytron PT-MR 2100) por 30 s com as amostras imersas no gelo. Em seguida, os homogenatos foram

centrifugados por 10 minutos a 790 g e 4°C, transferidos para microtubos, congelados em N<sub>2</sub> líquido e armazenados a - 80°C em biofreezer até serem processados.

Preparo dos homogenatos para quantificação da peroxidação lipídica: 60 a 200 mg de tecido (fígado e músculos plantar e gastrocnêmio vermelho) foram imersos em KCL (1,15%) 10% [m:v] e 1 µL PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride) [200mM]. O tecido foi homogeneizado com Politrón (Polytron PT-MR 2100) por 30 segundos com as amostras imersas no gelo. Em seguida, os homogenatos foram transferidos para microtubos, congelados em N<sub>2</sub> líquido e armazenados a - 80°C em biofreezer até serem processados.

### **3.8. Ataque Oxidativo: Quantificação dos peróxidos de lipídios (TBARS)**

Concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma: método baseado na reação dos produtos de peroxidação lipídica com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Yagi, 1987), que resultam ao final do processo numa solução avermelhada acompanhada fluorimetricamente ( $\lambda=515$  nm de excitação;  $\lambda=553$  nm de emissão).

Concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado e músculos plantar e gastrocnêmio vermelho: quantificado conforme os métodos descritos por Ohkawa *et al.* (1979) e Uchiyama & Mihara (1978). O princípio do método é a reação de peróxidos de lipídios com o ácido tiobarbitúrico (TBA) produzindo um pigmento vermelho mensurado em espectrofotômetro (diferença entre as absorvâncias nos comprimentos de onda de 520 nm e 535nm).

### **3.9. Quantificação da capacidade antioxidante total do plasma - capacidade do plasma em reduzir o ferro (FRAP)**

O método proposto por Benzie & Strain (1996) tem como objetivo medir a capacidade do plasma em reduzir o íon férrico (Fe<sup>+3</sup>). Nele, quando um complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe<sup>+3</sup> – TPTZ) é reduzido a forma ferroso (Fe<sup>+2</sup> – TPTZ), em baixo pH, uma cor azul intensa com absorção máxima à 593 nm é desenvolvida, podendo ser mensurada.

### **3.10. Quantificação da Atividade da Enzima Glutathione Redutase (GR)**

Os ensaios foram conduzidos de acordo com Smith *et al.* (1988). O princípio do método baseia-se no aumento da absorvância à 412 nm, quando 5,5'-ditiobis(2-ácidonitrobenzóico) [DTNB] é reduzido pela Glutathione (GSH).

### **3.11. Quantificação da Atividade da Enzima Catalase (CAT)**

De acordo com o método criado por Aebi (1984), a decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi seguida em espectrofotômetro pela diminuição na absorvância à 240 nm.

### **3.12. Quantificação da Concentração de Glicogênio nos tecidos**

A quantificação das concentrações de glicogênio nos tecidos foi feita pelo método espectrofotométrico ( $\lambda=490$  nm) proposto por Lo *et al.* (1970).

### **3.13. Análises Bioquímicas**

Para determinação das concentrações de ureia, ácido úrico e da atividade da enzima creatina quinase (CK) no plasma foram utilizados kits comerciais apropriados da marca Wiener Lab® (Rosário, Argentina). Todas as análises foram realizadas no aparelho automatizado Autolab (Boehringer Mannheim) com a utilização de soro controle.

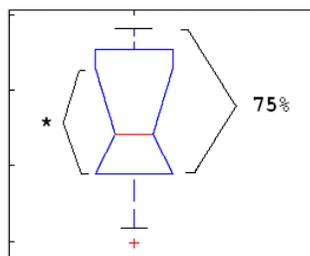
### **3.14. Padronização dos Experimentos e Análise de Confiança**

Para os ensaios acima descritos, 3.9-3.13, todos os procedimentos experimentais foram padronizados buscando-se as melhores condições (volume de amostra e/ou tempo de reação) para que fosse possível obter uma boa confiabilidade nos resultados encontrados. Os dados obtidos e a descrição detalhada de cada procedimento assim como o cálculo das atividades enzimáticas encontram-se no anexo II.

### **3.15. Análise Estatística**

Alguns dados foram apresentados de forma descritiva em gráficos do tipo boxplot, feitos pelo programa MatLab 7 (The MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). Este tipo de gráfico permite visualizar a variabilidade da resposta intra-grupo, impossível de ser realizada apenas com

os valores da média. Assim, o gráfico tipo boxplot mostra a mediana (linha vermelha) dos dados e sua divisão em quartis, conforme mostrado na Figura 3.



**Figura 3.** Gráfico representativo da análise realizada em boxplot.

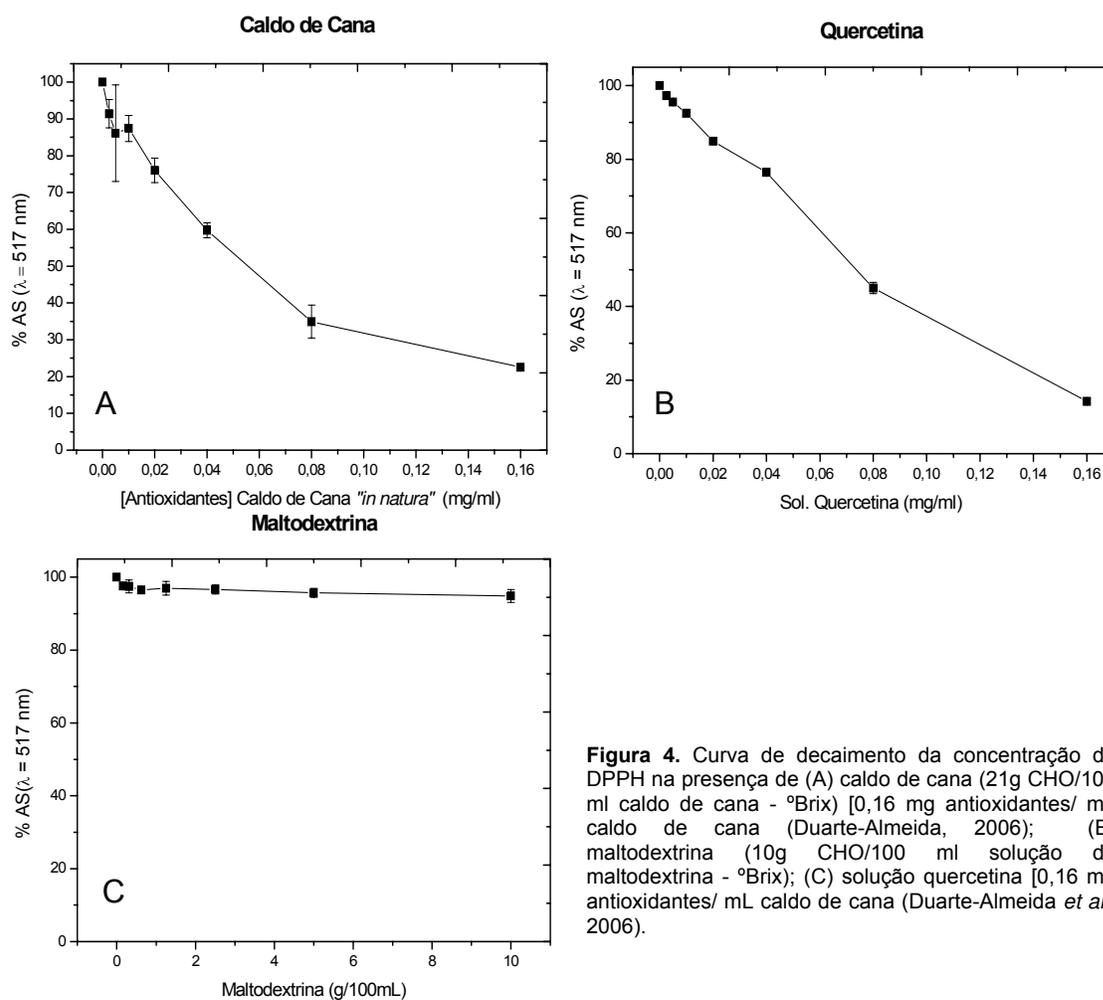
O espaço em branco dentro das caixas representa 50% dos dados, 25% acima e 25% abaixo da mediana (linha em vermelha). As duas linhas tracejadas representam os 50% dos valores mais distantes. A parte achatada nas caixas (\*) representa o intervalo de confiança da mediana. A não sobreposição dos intervalos de confiança de 95% da mediana poderia ter sido o critério de aceitação de diferenças estatisticamente significantes (Mcgill *et al.*, 1978).

Análises estatísticas também foram feitas utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Para verificar se a distribuição dos dados eram paramétricas ou não paramétricas foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para os dados paramétricos a comparação entre dois grupos foi feita através do Teste t não pareado e valor de  $p$  bicaudal. Para comparar mais de 2 grupos paramétricos foi realizado o teste ANOVA one-way com pós-teste de Tukey. Para os dados não paramétricos, houve inicialmente a tentativa de transformação em dados paramétricos ( $\log Y$ , raiz  $Y$  e  $1/Y$ ). Os dados que puderam ser transformados utilizamos novamente o Teste t não pareado e valor de  $p$  bicaudal (comparação de 2 grupos) ou ANOVA one-way com pós-teste de Tukey (comparar mais de 2 grupos experimentais). Porém, os dados que permaneceram não paramétricos, mesmo após as tentativas de transformação, foi adotado o Teste Mann-Whitney e valor de  $p$  bicaudal (comparação de 2 grupos) ou o teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's (comparar mais de 2 grupos). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados diferenças significativas.

## 4. Resultados

### 4.1. Avaliação “*in vitro*” da presença de antioxidantes no Caldo de Cana, Quercetina e Maltodextrina

A Figura 4 apresenta a presença de propriedade antioxidante nos diferentes suplementos: Caldo de Cana (CC), Quercetina (Q) e Maltodextrina (M).

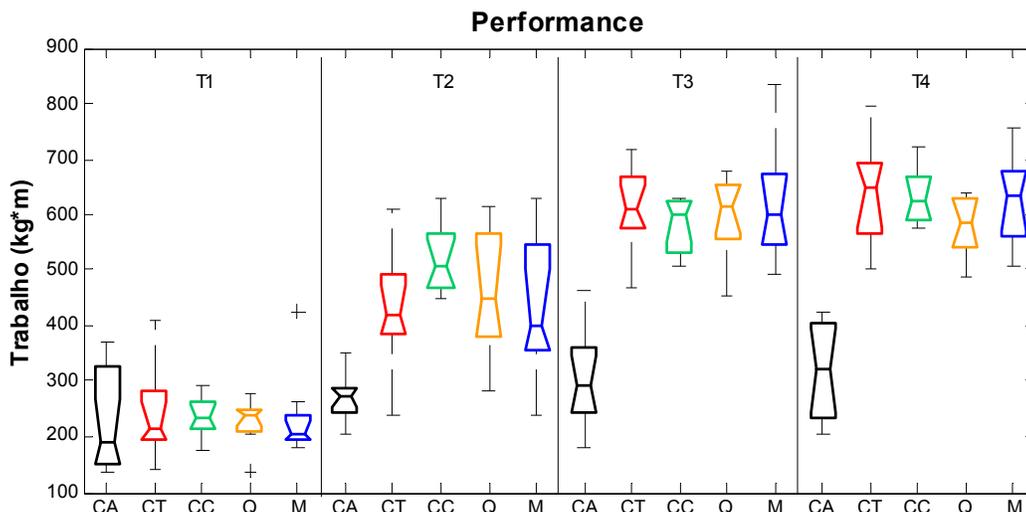


Observa-se uma diminuição da absorvância ( $A_{517}$ ) com o aumento nas concentrações de caldo de cana e quercetina. Interessante considerar que a solução de quercetina na concentração de 0,16mg apresentou uma taxa de diminuição  $A_{517}$  similar a do caldo de cana nas concentrações utilizadas nesse estudo (0,7 g CHO/ kg peso corporal). Já a solução de maltodextrina (10%),

conforme esperado, não apresentou nenhuma atividade antioxidante. Esses dados reforçam o teste do DPPH para uma avaliação rápida *“in vitro”* da capacidade antioxidante de suplementos alimentares.

## 4.2. Efeito do protocolo de treinamento e da suplementação sobre a Performance

A Figura 5 descreve o desempenho dos animais do grupo controle adaptado (CA) e dos grupos treinados com e sem suplementações, no teste de performance realizado em quatro momentos diferentes ao longo do protocolo de treinamento: antes do início do protocolo (T1) e após a quarta (T2), oitava (T3) e nona (T4) semanas de treinamento.



**Figura 5.** Desempenho dos animais obtidos por meio de uma variável correspondente ao trabalho mecânico (Kg\*m) realizado no teste de performance antes do treinamento (T1) e após a quarta (T2), oitava (T3) e nona (T4) semanas de treinamento dos grupos controle ativo [CA (n=12); preto], controle treinado [CT (n=9); vermelho], e treinados e suplementados com quercetina [Q (n=9); laranja], treinado e suplementado com caldo de cana [CC (n=9); verde], treinado e suplementado com maltodextrina [M (n=9); azul]. ANOVA one-way e pós teste de Tukey.

Podemos observar que antes do início do treinamento não havia diferenças no teste de desempenho entre os animais. O grupo controle ativo (CA) não apresentou aumento significativo no desempenho no decorrer das 9 semanas de treinamento. Já os animais treinados apresentaram valores de desempenho significativamente acima aos do grupo CA ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença significativa no desempenho comparando a 8ª e a 9ª semanas de treinamento entre si, porém a performance em ambas semanas foi significativamente maior do que na quarta semana

( $p < 0,0001$ ). Não houve diferenças significativas no desempenho entre os grupos CT, CC, Q e M, em nenhum dos momentos analisados.

### 4.3. Efeitos do treinamento e da suplementação sobre as reservas de glicogênio hepático e musculares

A Tabela 3 apresenta as concentrações de glicogênio no fígado e nos músculos plantar, gastrocnêmio vermelho e gastrocnêmio branco, representativos de predominâncias de fibras tipo I, IIa e IIb, respectivamente, dos animais do grupo CA, grupo CT e grupos Q, CC, M após 9 semanas de treinamento.

**Tabela 3.** Concentração de glicogênio no fígado (FIG) e nos músculos plantar (P), gastrocnêmio vermelho (GV) e gastrocnêmio branco (GB) nos grupos controle ativo (CA), controle treinado (CT), treinado e suplementado com quercetina (Q), caldo de cana (CC) ou maltodextrina (M).

Grupos	n	Glicogênio (mmol/ kg tecido)			
		FIG	P	GV	GB
CA	n=12	197 ± 39	28,9 ± 2,7	25,4 ± 5,3	30,7 ± 3,0
CT	n=9	295 ± 148	39,7 ± 6,9 <sup>a</sup>	33,7 ± 6,3 <sup>a</sup>	37,0 ± 4,8
CC	n=9	316 ± 143	39,4 ± 5,4 <sup>a</sup>	31,9 ± 8,5	32,2 ± 11,7
Q	n=9	273 ± 153	42,3 ± 6,5 <sup>a</sup>	29,1 ± 4,1	40,1 ± 5,4 <sup>a</sup>
M	n=9	317 ± 167	41,2 ± 5,5 <sup>a</sup>	34,8 ± 5,9 <sup>a</sup>	42,7 ± 6,6 <sup>a,b</sup>

Resultados apresentados em Med ± DP. Letras representam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Letra *a* representa diferença significativa comparado ao grupo CA; *b* representa diferença significativa comparado ao grupo CC (Teste t não pareado e valor de *p* bicaudal).

Observa-se que os estoques de glicogênio estavam significativamente maiores em todos os grupos treinados (CT, Q, CC, M) no músculo plantar, nos grupos CT e M do músculo GV e nos grupos Q e M do músculo GB quando comparados aos dos animais do grupo CA nos mesmos tecidos. Em todos os grupos treinados o glicogênio do FIG, nos grupos Q e CC do músculo GV e nos grupos CT e CC do músculo GB houve uma tendência de aumento dos estoques de glicogênio após o treinamento, embora os dados não mostrem significância estatística.

A suplementação alterou a repleção dos estoques de glicogênio muscular induzida somente pelo treinamento em alguns tecidos. No músculo GB, promoveu aumento significativo da reserva de glicogênio apenas no grupo que ingeriu Maltodextrina. Já no músculo GV, os animais

que ingeriram Caldo de Cana e Quercetina apresentaram aumento dos estoques de glicogênio, porém não suficiente para ser estatisticamente maior que o grupo CA, no entanto também não são estatisticamente menores que os grupos CT e M.

É importante ressaltar que além do desempenho e das concentrações de glicogênio todos os outros parâmetros analisados nesse estudo não apresentaram nem efeito adicional nem prejudicial das suplementações em relação aos efeitos do treinamento, em nenhum dos tecidos analisados ou nas amostras de sangue. Dessa forma, decidimos apresentar os resultados obtidos sobre parâmetros de estresse oxidativo e outros marcadores bioquímicos dos grupos treinados com e sem suplementação como se fosse um único grupo com 36 animais, denominado de Treinados (T). Acreditamos que as informações apresentadas são conclusivas em relação aos efeitos adaptativos desse protocolo de treinamento, pois se relacionam a um volume robusto de animais respondendo da mesma maneira. Ressaltamos, no entanto, que todos os resultados sobre marcadores bioquímicos e de estresse oxidativo que serão apresentados de forma agrupada estão apresentados separadamente em cada grupo e tecido correspondente nas Tabelas do Anexo III.

#### 4.4. Efeitos do treinamento sobre os marcadores de estado catabólico e sobrecarga muscular

A Tabela 4 apresenta os dados das concentrações de uréia como marcador de estado catabólico acentuado e atividade plasmática da enzima creatina quinase como marcador de sobrecarga muscular, obtidos 24h após o último teste de performance (T4).

**Tabela 4.** Concentração de uréia e enzima creatina quinase (CK) no plasma.

	Grupos	Marcadores Bioquímicos	
		Uréia (mg/ dL)	CK (U/ dL)
Sangue	CA	53 ± 4	415 ± 351
	T	***45 ± 6	315 ± 149

Resultados apresentados em Med ± DP. Grupo controle ativo (CA; n=12); grupo treinado (T; n=36). \*\*\* representa diferença significativa comparado ao grupo CA ( $p < 0,0005$ ) (Teste t não pareado e valor de  $p$  bicaudal).

Observa-se uma diminuição significativa nos valores plasmáticos de ureia nos animais do grupo T. Embora as diferenças não tenham sido significativas, os dados mostraram uma diminuição na média dos dados relacionados a atividade da enzima CK após o protocolo de treinamento físico.

#### 4.5. Efeitos do treinamento sobre os marcadores sanguíneos, hepáticos e musculares de estresse oxidativo

A Tabela 5 apresenta os resultados da concentração de TBARS encontrados no sangue, fígado e nos músculos gastrocnêmio vermelho e plantar dos animais que foram submetidos ao protocolo de 9 semanas de treinamento comparados aos valores dos animais do grupo controle ativo (CA).

**Tabela 5.** Peroxidação lipídica no plasma (Sangue), no fígado (Fig) e nos músculos plantar (P) e gastrocnêmio vermelho (GV) dos grupos controle ativo (CA) e treinado (T).

<i>Ataque Oxidativos - [TBARS]</i>				
	<b>Sangue</b>	<b>Fig</b>	<b>GV</b>	<b>P</b>
	<b>[MDA] (nmol/ ml plasma)</b>	<b>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>(<math>\mu</math>M)</b>
<b>CA</b>	8,2 $\pm$ 2,4	10,5 $\pm$ 2,0	0,063 $\pm$ 0,026	28,9 $\pm$ 9,4
<b>T</b>	7,6 $\pm$ 2,0	12,0 $\pm$ 4,9	0,060 $\pm$ 0,025	26,1 $\pm$ 14,1

Resultados apresentados em Med  $\pm$  DP. Grupo controle ativo (CA; n=12); grupo treinado (T; n=36). Teste Mann-Whitney e valor de *p* bicaudal (sangue). Teste t não pareado e valor de *p* bicaudal (Fígado e músculos).

Observa-se que não houve alteração significativa nas concentrações de TBARS nos tecidos e de MDA no plasma após 9 semanas de treinamento quando comparada com a resposta dos animais do grupo CA.

A Tabela 6 apresenta a resposta antioxidante enzimática representada pelas enzimas catalase (CAT) e glutatona redutase (GR), e a resposta de antioxidantes não enzimáticos, representada pelas concentrações plasmáticas de ácido úrico e a capacidade antioxidante total do plasma mensurada pelo método do FRAP.

**Tabela 6.** Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutatona redutase (GR) no sangue, fígado e músculos gastrocnêmio vermelho e plantar. Capacidade antioxidante total (FRAP) e concentração de ácido úrico no plasma.

		<i>Sistema de Defesa Antioxidante</i>			
		CAT	GR	FRAP	Ácido Úrico
		(U/ g Hb) / (U/ g tecido)	(U/ g Hb) / (U/ g tecido)	Eq. Trolox (µM)	(mg/ dL)
<b>Sangue</b>	<b>CA</b>	$(4,7 \pm 0,8)10^5$	$37,1 \pm 21,1$	$378 \pm 40$	$1,7 \pm 0,5$
	<b>T</b>	$*** (7,8 \pm 0,2)10^5$	$*** 11,8 \pm 9,0$	$*** 263 \pm 49$	$*** 1,1 \pm 0,4$
<b>Fígado</b>	<b>CA</b>	$(6,4 \pm 0,6)10^6$	$575 \pm 52$	_____	_____
	<b>T</b>	$*** (5,6 \pm 0,5)10^6$	$609 \pm 56$	_____	_____
<b>GV</b>	<b>CA</b>	$(1,6 \pm 0,4)10^4$	$204 \pm 26$	_____	_____
	<b>T</b>	$(2,0 \pm 0,7)10^4$	$* 167 \pm 43$	_____	_____
<b>Plantar</b>	<b>CA</b>	$160 \pm 37$	$2,4 \pm 0,3$	_____	_____
	<b>T</b>	$170 \pm 61$	$** 2,1 \pm 0,2$	_____	_____

Resultados apresentados em Med  $\pm$  DP. Grupo controle ativo (CA; n=12); grupo treinado (T; n=36).

\*\*\* representa diferença significativa comparado ao grupo CA ( $p < 0,001$ ); \*\* representa diferença significativa comparado ao grupo CA ( $p < 0,01$ ); \* representa diferença significativa comparado ao grupo CA ( $p < 0,05$ ). Teste t não pareado e valor de p bicaudal para todos os parâmetros.

Os animais do grupo treinado apresentaram redução significativa na atividade da enzima CAT no fígado, mas não nos músculos. A atividade da enzima CAT das hemácias aumentou significativamente quando comparado ao grupo CA. Já a atividade da enzima GR diminuiu nas hemácias e nos músculos gastrocnêmio vermelho e plantar. Observa-se que a capacidade antioxidante total do plasma (FRAP) e a concentração de ácido úrico plasmático também diminuíram significativamente quando comparadas ao grupo CA.

## 5. Discussão

No processo de investigação científica devemos criar hipóteses que devem ser testadas empiricamente para interpretar determinados fenômenos da natureza. Em nosso estudo nossa hipótese foi que a suplementação com caldo de cana (0,7g/kg peso), realizada de forma crônica (durante 3 semanas) produziria um efeito adicional ao do treinamento sobre a performance e/ou em marcadores de estresse oxidativo. Para controlar as possíveis ações relacionadas com a porção carboidrato ou antioxidante do caldo comparamos também os efeitos das suplementações com maltodextrina ou quercetina, respectivamente.

Pesquisadores têm buscado estratégias para, por exemplo, maximizar os estoques de glicogênio muscular e/ou melhorar a capacidade de defesa antioxidante do organismo, evitando assim a instalação de um quadro de estresse oxidativo prejudicial ao organismo. Nesse contexto o caldo de cana além de ser um produto genuinamente nacional, é de baixo custo, e tem boa aceitação pela população brasileira, além de sua matéria-prima (cana-de-açúcar) ser produzida em grande escala no país. Além de conter uma grande quantidade de sacarose possui também atividade antioxidante, conforme mostrado na Figura 4.

Os resultados sobre a eficácia de diferentes suplementações em sujeitos bem treinados ainda são muito contraditórios, devido a grande diversidade de variáveis analisadas e protocolos experimentais utilizados na literatura (dose, momento de suplementação, tipo de antioxidante, status nutricional e dietético, intensidade e duração dos exercícios, gênero e tecidos analisados). De um lado parece que a suplementação antioxidante, por exemplo, pode auxiliar na promoção de adaptações positivas. Por outro lado pode assumir o papel de vilã, e prejudicar as adaptações benéficas conhecidamente induzidas pelo treinamento físico, atuando como pró-oxidante. Alguns autores propõem que a ação antioxidante da suplementação pode inibir vias de sinalização sensíveis ao estado redox da célula, responsáveis pelas adaptações contra futuros danos oxidativos (Radak *et al.*, 2005; Padilla & Mickleborough, 2007).

Não encontramos trabalhos na literatura com esse desenho experimental (ratos submetidos a 9 semanas de treinamento com carga monitorada e suplementados uma vez ao dia,

sempre após a sessão de exercícios, durante as 3 últimas semanas de treino) e avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em sangue, fígado e músculos concomitantemente. Nessas condições experimentais não detectamos diferenças entre o desempenho dos grupos que ingeriram caldo de cana (CC), maltodextrina (M) ou quercetina (Q) em relação ao grupo treinado (CT), que ingeriu apenas água. Alguns estudos também não mostraram efeito da suplementação antioxidante no desempenho esportivo (Cureton *et al.*, 2009; Ganio *et al.*, 2010). Ambos os estudos foram realizados com humanos não treinados, que ingeriram 1 g/ dia de quercetina por 7-16 dias e 6 dias, respectivamente.

Alguns estudos da literatura encontraram efeitos positivos da suplementação com antioxidantes sobre o desempenho. Davis *et al.* (2009b) mostraram que uma semana de suplementação de quercetina nas doses de 12,5mg ou 25mg por dia foi capaz de promover aumento significativo na performance de camundongos. Nieman *et al.* (2010) também mostraram que 1 g/dia de quercetina por 2 semanas resultou em um modesto, mas significativo, aumento da performance num teste de 12 minutos em esteira rolante. Ryan *et al.* (2010) encontraram uma melhora no desempenho de ratos suplementados com vitamina C e E (antioxidantes) submetidos a um exercício de 80 contrações máximas por sessão de treino, três vezes por semana durante 4 semanas e meia.

Por outro lado, outros estudos encontraram efeito negativo sobre a performance em virtude da suplementação com antioxidantes. Gomez-Cabrera *et al.* (2008) investigaram a administração de doses diárias de vitamina C (0,24 mg/ cm<sup>2</sup> de área corpórea) em ratos Wistar. Concluíram que a suplementação antioxidante prejudicou a capacidade de endurance dos animais após 6 semanas de treinamento de endurance, em esteira rolante, comparado ao grupo não suplementado. Ristow *et al.* (2009) também encontraram uma resposta negativa na performance muscular de humanos saudáveis após 4 semanas de treinamento intenso e suplementação com uma combinação de antioxidantes (1000 mg/dia vitamina C e 400 IU/ dia vitamina E).

Resultados apresentados em muitos artigos diferem dos encontrados neste estudo, provavelmente devido ao protocolo de treinamento que, no nosso caso, se mostrou claramente adaptativo. E principalmente às doses de suplementos utilizados, muito maior nos estudos acima

que a empregada no presente estudo. Nossa hipótese, quando confrontada com os dados obtidos empiricamente não foi confirmada. No entanto, nossos dados indicaram claramente que o treinamento não induziu um quadro de estresse oxidativo, mas sim de resposta adaptativa no sistema de defesa antioxidante, e que as suplementações não induziram nenhum efeito adicional aos efeitos adaptativos do treinamento. Por outro lado, também não induziram nenhum efeito prejudicial.

Não é demérito do pesquisador que a hipótese inicial não seja comprovada, desde que este entenda o fenômeno ocorrido, e busque informações que auxiliem a explicá-lo. Além da dose baixa de antioxidantes (0,16 mg/ml quercetina), outros fatores podem ter contribuído para a ausência de efeitos tais como: período de suplementação (3 semanas), momento da gavagem (pós-treino), frequência de suplementação (uma vez ao dia), status de treinamento (ratos não sedentários), treinamento muito equilibrado e/ou a associação de todos esses fatores (Peake *et al.*, 2007; Powers *et al.*, 2004).

Cabe ressaltar ainda que a diminuição para 4h de descanso entre duas sessões de treino de igual volume não alterou o desempenho atingido na 8ª semana, sugerindo que a 9ª semana pode ser inclusive suprimida quando o objetivo é utilizar um protocolo de efeito adaptativo.

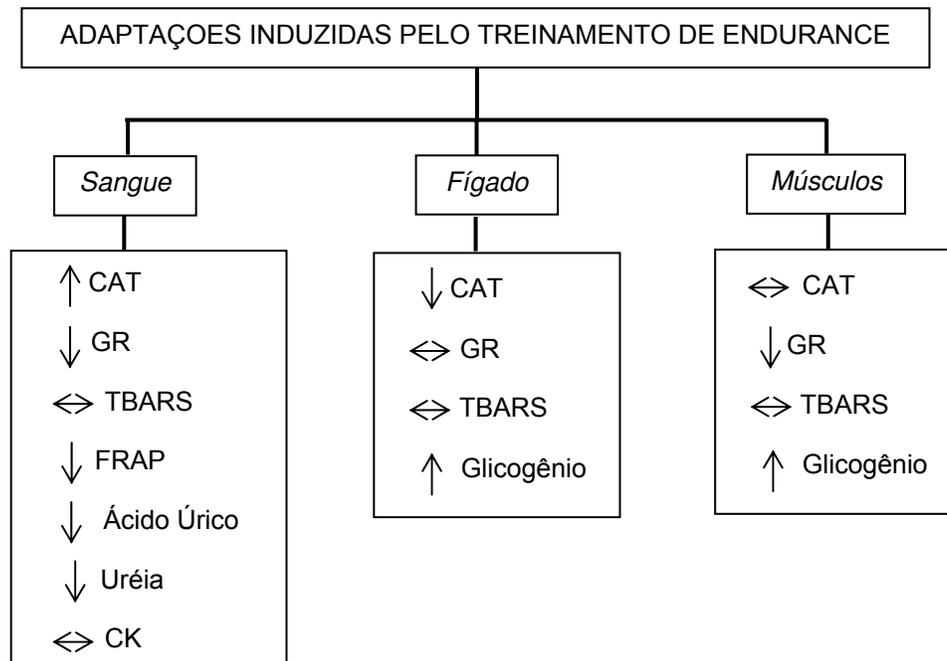
Outra informação importante é que durante o treinamento foram atentamente observados o desempenho de cada animal no decorrer das sessões de treino. Todos esses dados foram registrados num diário para cada animal. Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística no desempenho realizado pelos animais treinados durante o teste de performance, analisando os registros das sessões de treino, podemos sugerir, com segurança, que todos os animais suplementados (CC, Q e M) apresentaram maior tranquilidade em realizar e finalizar as sessões de treino comparado aos animais do grupo que apenas ingeriu água (CT).

O protocolo de treino utilizado nesse estudo corresponde as primeiras 9 semanas de um protocolo de overtraining desenvolvido na esteira para ratos e publicado por pesquisadores do nosso laboratório (Hohl *et al.* 2009, Ferraresso *et al.* 2012). Resultados prévios mostraram aumento de desempenho associado a aumento na atividade das enzimas citrato sintase e complexo IV mitocondrial no músculo gastrocnêmio vermelho. O desempenho crescente do grupo

treinado nos testes de performance (T2, T3 e T4) reproduziu o comportamento já demonstrado nesses estudos, permitindo concluir que a melhora da performance de endurance é decorrente do aumento da capacidade oxidativa.

Porém, Hohl *et al.* (2009) e Ferraresso *et al.* (2012) não investigaram o comportamento de outros marcadores bioquímicos e de estresse oxidativo após a 9ª semana de treino. Caracterizar as adaptações metabólicas e antioxidantes adquiridas pelos animais na nona semana de treinamento é extremamente importante para o grupo de pesquisa, por corresponder ao período adaptativo do protocolo de overtraining. Como todas as variáveis foram cuidadosamente controladas, pudemos agrupar os dados de todos os animais treinados e suplementados em um único grupo com um n final de 36 animais. Isso permitiu que fizéssemos nesse estudo uma interpretação robusta dos efeitos do protocolo de treinamento utilizado sobre a performance e em marcadores de estresse oxidativo em diferentes tecidos e sangue.

Apresentamos abaixo um resumo do quadro adaptativo induzido pelo protocolo de treinamento (Figura 6).



**Figura 6.** Resumo das repostas adaptativas induzidas pelo protocolo de endurance de 9 semanas.

Podemos observar que durante as 9 semanas de treinamento o sistema de defesa antioxidante foi modulado, promovendo como resposta adaptativa redução dos antioxidantes não enzimáticos, e alteração na atividade antioxidante das enzimas GR e CAT no sangue, fígado e músculo, garantindo que os níveis de estresse oxidativo não se alterassem em função do esforço físico realizado.

A creatina quinase (CK) é uma enzima localizada no citosol das células e quantificar sua presença no sangue é um recurso muito utilizado para detectar lesão ou alteração muscular (Petibois, 2003). A manutenção dos níveis séricos de CK 24 horas após o último teste de performance (T4) nos animais do grupo treinado indica que os animais estão preservados do ponto de vista de integridade muscular. Esses dados sugerem que o treinamento obedeceu uma relação equilibrada entre estímulo/tempo de recuperação, proporcionando uma resposta adaptativa eficiente e o efeito desejado: aumento do desempenho. Os dados referentes as concentrações de ureia também reforçam o estado adaptativo induzido pelo treino, visto que indicam uma atenuação do ambiente catabólico dos animais do grupo CT.

Alguns autores não consideram a CK apenas um marcador de lesão muscular, mas também um marcador indireto de estresse oxidativo. Isso porque a peroxidação lipídica induzida pelos radicais livres nas membranas celulares provocam danos que a tornam mais permeáveis, proporcionando maior liberação de CK do meio intracelular para o sangue (Finaud *et al.*, 2006). Marzatico *et al.* (1997) e Santos-Silva *et al.* (2001) encontraram níveis basais de peroxidação lipídica maiores entre atletas treinados em diferentes modalidades comparados à indivíduos sedentários. Ao contrário, nossos dados mostraram que não houve alteração dos níveis basais de TBARS em nenhum dos tecidos analisados em função do treinamento assim como os resultados obtidos por Miyazaki *et al.* (2001) após 12 semanas de treinamento, sugerindo que o nosso protocolo de treinamento de endurance não promoveu ataque oxidativo significativo nas biomembranas.

Segundo a literatura é esperado que um único estímulo seja capaz de induzir várias adaptações no metabolismo da glicose, como por exemplo, a translocação dos transportadores de glicose (GLUT4) para o sarcolema (Jentjens & Jenkendrup, 2003). Com a realização de estímulos

consecutivos como no processo de treinamento é esperado um aumento das reservas de glicogênio devido ao estímulo da supercompensação e também efeitos sobre o padrão de utilização das fontes energéticas, promovendo aumento do consumo das reservas lipídicas, devido a uma maior eficiência da lipólise, e conseqüentemente economia dos estoques de glicogênio com menor contribuição absoluta das vias glicolíticas em esforços de mesma magnitude.

O glicogênio muscular é o principal substrato utilizado no fornecimento de ATP em exercícios de intensidade moderada à intensa e está diretamente associado à fadiga e performance no esporte (Bergstro *et al.*, 1967; Costill, 1988). Sua repleção tem um peso importante no processo de recuperação após exercícios (Jentjens & Jenkendrup, 2003). A própria contração muscular e a depleção das reservas de glicogênio são os principais estímulos para a ressíntese do glicogênio imediatamente após sessões de exercícios. Ambos promovem a translocação dos transportadores de glicose GLUT4 para a membrana celular, o que favorece a supercompensação dos estoques de glicogênio.

Sabe-se que a atividade contrátil muscular gera EROs, que interfere no metabolismo da glicogênio por alterar a sensibilidade da célula à insulina e a translocação dos transportadores de GLUT4 do meio intracelular para o sarcolema (Nikolaidis *et al.*, 2012). Uma baixa produção de EROs também aumenta a sensibilidade das células à insulina e estimula o transporte de glicose para dentro do tecido muscular, aumentando a captação de glicose pelo músculo, favorecendo com isso a supercompensação dos estoques de glicogênio. Por outro lado, EROs produzidas em excesso prejudicam o transporte de glicose e aumentam a resistência à insulina, prejudicando a ressíntese de glicogênio, produzindo com isso uma associação entre estresse oxidativo e fadiga muscular (Houstis *et al.*, 2006).

Nossos dados confirmaram que o treinamento induziu supercompensação de glicogênio em todos os tecidos analisados provavelmente por uma maior capacidade de ressíntese de glicogênio e maior economia dessas reservas durante os esforços. As suplementações nem aumentaram nem prejudicaram a ressíntese de glicogênio em nenhum dos tecidos analisados. Esses dados reforçam que a resposta adaptativa de supercompensação de glicogênio foi induzida apenas pelo treinamento, e não em decorrência das suplementações e que um treinamento

equilibrado induz adaptações positivas sem produzir estresse oxidativo que necessite aumento da ingestão dietética de antioxidantes para combater um possível aumento no ataque oxidativo as estruturas celulares.

O protocolo de treinamento utilizado neste trabalho produziu um estado redox ótimo, de forma que nem a ingestão de suplementos dietéticos a partir da 7ª semana de treinamento foi capaz de alterar significativamente o desempenho dos animais. Sabemos que um ligeiro aumento na formação de EROs é importante para a produção de força (Powers *et al.*, 2011). Na realidade postula-se que um aumento no estado redox para um estado um pouco mais oxidado seja extremamente importante para as adaptações favoráveis ao treinamento (Powers *et al.*, 2011). As EROs ativam cascatas de sinalização que ativam a expressão de genes relacionados à síntese de enzimas de vias de produção de ATP, do próprio sistema de defesa antioxidante, mitogênese, angiogênese, hipertrofia muscular e interconversão de fibras (Ji, 2008), translocação de GLUT4 para a membrana (Holloszy, 2005) e o aumento da sensibilidade à insulina (Nikolaidis *et al.*, 2012) o que também poderia explicar o aumento significativo nas reservas de glicogênio no grupo CT.

Os estudos que investigam os níveis de peroxidação lipídica em função do exercício apresentam resultados muito variados e controversos, devido a grande variabilidade dos protocolos experimentais de treinamento como: intensidade e duração dos exercícios, status de treinamento dos sujeitos avaliados, gênero e tecido analisado. Isso criou uma enorme limitação para a comparação dos nossos dados com os dados da literatura. Já os nossos dados referentes aos marcadores do status antioxidante caminham em sentido contrário ao de alguns estudos da literatura, que apontam que o treinamento de endurance induz aumento da atividade de enzimas antioxidantes em vários tecidos (Finaud *et al.*, 2006; Taysi *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2010)

No estudo de revisão feito por Finaud *et al.* (2006) os autores demonstraram que a adaptação positiva do sistema antioxidante parece estar relacionada com o volume e intensidade do treinamento, sendo os protocolos mais longos os que resultam em melhor resposta adaptativa. Para exemplificar isso Finaud *et al.* (2006) analisaram dois protocolos de treinamento aeróbico diferentes. O protocolo de 8 semanas promoveu aumento de performance, porém sem aumento na capacidade de defesa do sistema antioxidante, já outro protocolo apontou que 10 semanas de

treinamento aeróbico foi capaz de melhorar performance e ainda aumentar a atividade dos antioxidantes.

Nossos dados mostraram queda na capacidade antioxidante total do plasma (FRAP) após as nove semanas de treinamento. Corroborando com isso, encontramos redução da concentração de ácido úrico, um dos mais importantes antioxidantes não enzimáticos, juntamente com a GSH. As suplementações não foram capazes de alterar esse efeito, embora Wilms *et al.* (2005) observaram que 11 mg/ dia de quercetina, ingerida na forma de suco de frutas ricas em quercetina durante 28 dias, tenha sido eficiente para aumentar a capacidade antioxidante total do plasma. Nikolaidis *et al.* (2007) encontraram redução da razão GSH:GSSG nos primeiros 3 dias após sessões repetidas de exercício no sangue de humanos. Isso reflete diminuição dos estoques de GSH e aumento da concentração de GSSG.

Provavelmente, da mesma forma que houve redução do FRAP pode ter havido também diminuição das reservas de GSH. Reduções nas concentrações de GSH prejudicam o sistema GPX/GR (Powers *et al.*, 1999; Nikolaidis *et al.*, 2007), o que poderia justificar a queda na atividade da GR que observamos nos eritrócitos de ratos treinados, acarretando aumento na concentração  $H_2O_2$  no sangue e com isso aumento na atividade da CAT. No entanto, não mensuramos a concentração de GSH no sangue para confirmar essa hipótese.

Alguns trabalhos que investigaram a atividade basal de enzimas antioxidantes em eritrócitos de indivíduos treinados (Tauler *et al.*, 1999; Tauler *et al.*, 2005; Tauler *et al.*, 2006) mostraram que a atividade da SOD é bem menor do que a atividade da GR e CAT. Especulamos que a baixa atividade da SOD nos eritrócitos somada a queda na capacidade de defesa dos antioxidantes não enzimáticos (diminuição do FRAP e ácido úrico) e a uma catálise diminuída por parte do sistema GPX/GR são fatores que associados podem ter resultado em aumento de outras espécies EROs no sangue, além do  $H_2O_2$ , como por exemplo o radical ânion superóxido. Segundo Tauler *et al.* (1999), aumento na concentração de  $^{\bullet}O_2^-$  ativa a CAT. Assim, podemos especular que houve uma ação conjunta do  $^{\bullet}O_2^-$  e do  $H_2O_2$  elevados na promoção de uma resposta adaptativa de aumento da atividade da CAT no eritrócito de ratos, com o intuito de favorecer a decomposição do

excesso de peróxido supostamente formados, e impedir tanto sua difusão pela célula quanto atenuar a produção do radical hidroxila, uma das EROs mais danosas aos tecidos.

Os resultados de atividade enzimática no sangue apresentados neste trabalho coincidem com os resultados encontrados por Zoppi *et al.* (2003), no qual acompanharam a atividade das enzimas GR e CAT nas hemácias, durante 5 meses de treinamento e competição, em jogadores de futebol profissional. Zoppi *et al.* (2003) mostraram que nos primeiros 3 meses não houve alteração estatística na atividade dessas enzimas. Já a partir do quarto mês, a GR teve sua atividade diminuída enquanto a atividade da CAT foi aumentada, ambas significativamente.

Em relação a atividade enzimática nos músculos, nove semanas de treinamento de intensidade moderada não foram suficientes para promover adaptação na atividade antioxidante da enzima CAT, mas diminuiu significativamente a atividade enzimática da GR no músculo plantar. Acreditamos que se o treinamento continuasse por mais algumas semanas essa adaptação seria alcançada.

Nossos dados mostraram que também não houve um aumento nos níveis de estresse oxidativo no fígado dos animais treinados, uma vez que os níveis de peroxidação lipídica avaliados pela concentração de TBARs não apresentaram diferenças em relação ao grupo que não realizou atividade física. Níveis baixos de peroxidação lipídica justificam a resposta das atividades das enzimas CAT e GR encontradas nesse grupo. Essa resposta, aliada aos resultados apresentados no trabalho publicado por Ferrarezzo *et al.* (2012) permitem sugerir que a SOD parecer ser mais sensível ao treinamento que as demais enzimas antioxidantes.

Provavelmente a manutenção da atividade da enzima antioxidante GR no fígado foi propiciada pela intensidade moderada do treinamento. Podemos observar também que o valor basal da atividade da GR no fígado é extremamente mais alto do que nos outros tecidos analisados. Assim, deve ser necessário uma altíssima produção de EROs para forçar o aumento da atividade enzimática da GR a uma eficiência catalítica ainda maior. Já a diminuição da atividade da CAT no fígado, provavelmente foi ocasionada pela baixa produção de EROs induzida pelo treinamento aeróbico de intensidade moderada. É provável que o sistema GPX/GR, com alta atividade no fígado, tenha combatido as EROs produzidas durante o exercício, não permitindo que

a concentração de  $H_2O_2$  aumentasse o suficiente para ativar a CAT. Então, a sub-utilização da CAT nessa situação pode ter promovido a diminuição de sua atividade catalítica observada neste trabalho. Essa hipótese pode ser sustentada pelo resultado de peroxidação lipídica encontrada no fígado, que não apontou ataque oxidativo as moléculas lipídicas.

Os dados apresentados nesse estudo em conjunto com os resultados publicados por Ferrareso *et al.* (2012) reforçam a importância do conhecimento do comportamento de biomarcadores metabólicos e de estresse oxidativo e de um acompanhamento interdisciplinar com diferentes profissionais envolvidos para a boa performance de atletas ou sujeitos submetidos a protocolos de treinamento diário sistematizado e evitar a instalação de uma situação não adaptativa, como a *Síndrome do Overtraining*.

Os valores de atividade antioxidante da enzima GR e CAT no sangue dos animais dos grupos suplementados não apresentaram diferença significativa quando comparados aos valores do grupo treinado e não suplementado. No tecido muscular e no fígado, o protocolo de suplementação antioxidante utilizado no presente estudo, também não foi capaz de alterar as respostas adaptativas das enzimas antioxidante induzidas pelo treinamento (grupo CT).

Tauler *et al.* (2006) demonstraram em seu trabalho que as enzimas antioxidantes dos eritrócitos são mais responsivas as adaptações promovidas pelo treinamento do que pela suplementação antioxidante. Boots *et al.* (2008) mostraram que a suplementação com antioxidantes, como a quercetina, pode promover uma depleção das reservas de GSH e o ataque aos grupamentos sulfidríla de enzimas. Sabe-se que a atividade da GR esta diretamente ligada às concentrações de GSH (Powers *et al.*, 1999). Podemos observar, principalmente pelos nossos resultados de GR no sangue, que a dose suplementada não induziu redução na atividade desta enzima sendo o treinamento físico o único responsável por essa adaptação enzimática.

Corroborando com nossos resultados, Yfant *et al.* (2010) demonstraram que a suplementação com antioxidantes não alteraram as adaptações ao treinamento de endurance em homens jovens treinados. Também Wadley & McConell (2010) demonstraram que altas doses de vitamina C não impediram a biogênese mitocondrial em músculo esquelético de ratos submetidos a um treinamento de endurance. Bailey *et al.* (2011) também não encontraram melhora nos

marcadores de estresse oxidativo, inflamação ou recuperação muscular após 90 minutos de exercícios de tiros intervalados em homens suplementados com vitaminas C e E durante 6 semanas. Ao contrário do que observamos, Zaidi *et al.* (2005) encontraram diminuições na atividade da CAT, SOD, níveis de GSH e peroxidação lipídica em fígado ratos que foram submetidos a um estresse (imobilização) e suplementados com antioxidantes. Os autores concluíram que a suplementação apresentou uma ação positiva. Novamente, provavelmente as doses utilizadas no presente estudo não foram suficientes nem para promover um efeito adicional nem para atenuar a sinalização celular que estimula adaptações positivas, uma vez que não foram observadas diferenças entre os grupos suplementados e o grupo controle treinado.

Não está estabelecido na literatura, se o treinamento de endurance diminui o estresse oxidativo por reduzir a produção de radicais livres ou pelo aumento da capacidade do sistema de defesa antioxidante em combater os radicais livres formados. Nossos dados de manutenção dos níveis de peroxidação lipídica próximos a valores basais em todos os tecidos analisados, aliado a resposta do sistema de defesa antioxidante ao treinamento convergem para uma diminuição do status antioxidante como responsável pela manutenção dos níveis de estresse oxidativo praticamente inalterados. Especulamos que isso possibilitou um estado redox um pouco mais oxidado como efeito adaptativo, que contribuiu para o aumento na performance. Isso traz um alerta: com o incremento das sobrecargas de treino para otimizar ainda mais o desempenho a atenção deve ser redobrada também nos momentos de descanso e alimentação para preservar os animais e a performance previamente adquirida.

Os resultados apresentados nesse estudo reforçam a necessidade de grande cautela no diagnóstico e utilização da suplementação antioxidante para indivíduos bem treinados, pois doses excessivas de antioxidantes podem ter efeito inverso. Ao invés de atuar como antioxidantes os mesmos podem agir como pró-oxidantes, provocando efeitos deletérios no organismo (Decker, 1997). Para obter respostas positivas da ingestão de um suplemento é importante conhecer a quantidade adequada a ser ingerida. Porém, o grande problema da suplementação é que para a maioria dos compostos esta quantidade ótima ainda não é conhecida. Além disso, nossos resultados indicam que quando um treinamento é equilibrado, os ratos não necessitam de

suplementação de CHO e/ou antioxidantes para acelerar o processo de recuperação entre estímulos diários com o objetivo de aumento no desempenho.

Neste sentido, mais estudos precisam ser realizados para se verificar a quantidade ótima de antioxidantes que devem ser ingeridas para que possamos investigar um possível efeito positivo destes compostos, principalmente de flavonoides e polifenóis, na resposta adaptativa ao treinamento. Concomitante a isto, devemos nos preocupar também em saber qual a quantidade máxima tolerável de antioxidantes que não provoque efeitos deletérios ao processo adaptativo e a saúde do atleta.

## 6. Conclusões

- O protocolo de 9 semanas de treinamento utilizado foi extremamente eficiente para adaptar os animais e melhorar o desempenho.
- Para manter o nível de estresse oxidativo, o treinamento acionou o sistema de defesa antioxidante: regulação da atividade das enzimas CAT e GR, diminuição dos antioxidantes não enzimáticos.
- A análise dos parâmetros bioquímicos indicaram que os animais estavam plenamente recuperados para as próximas sessões de treino.
- A suplementação promoveu resposta adicional ao treinamento na supercompensação da reserva de glicogênio apenas no músculo GB para o grupo que ingeriu maltodextrina.
- No músculo GV, a suplementação com Caldo de Cana e Quercetina não promoveu, estatisticamente, supercompensação da reserva de glicogênio, diferentemente do ocorrido nos outros grupos treinados.
- Nas condições utilizadas, não encontramos nem efeito antioxidante e nem pró oxidante da suplementação.
- Quando o treino é eficiente (promove adaptação e melhora de performance), a suplementação não é necessária.
- Caldo de Cana pode ser utilizado como uma alternativa de bebida pós-treino, atuando na reposição hidroeletrólítica sem interferir negativamente na resposta adaptativa induzida pelo treinamento.

## 7. ANEXO I



CEUA/Unicamp

### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeitos da suplementação com caldo de cana em biomarcadores de estresse oxidativo no sangue de ratos Wistar machos submetidos a nove semanas de treinamento em esteira" (protocolo nº 1446-1(A)), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo / Ana carolina Rocha Normand, 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 18 de janeiro de 2013.

Campinas, 18 de janeiro de 2013.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

## 8. ANEXO II

### **Padronização, análise de confiança e descrição das técnicas experimentais**

A ciência se preocupa em interpretar os fenômenos manifestados pela natureza e o caminho comum para isso é o método científico, no qual se encontram um conjunto de procedimentos que orientam o pesquisador a uma correta interpretação da realidade. O estresse oxidativo foi o fenômeno a ser estudado, sendo a análise da atividade das enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica o método para sua verificação. Nesse sentido para uma correta interpretação do fenômeno através de análises laboratoriais que indiretamente refletem os efeitos induzidos, a padronização das técnicas a serem utilizadas se faz necessária para uma maior confiabilidade nos dados obtidos.

A análise de confiança foi realizada para a determinação do volume de amostra e tempo de reação para o ensaio enzimático das enzimas catalase (CAT) e glutathione redutase (GR). Boa confiabilidade implica em maior precisão de medidas e melhor acompanhamento das mudanças ocorridas (Hopkins, 2000). A análise da variação entre os mesmos objetos pode ser verificada através do cálculo do erro típico. O erro típico representa o desvio padrão ou erro padrão de uma medida, e a variação esperada em diversas tentativas, independente da alteração da média. Quando expresso em forma de porcentagem é denominado de coeficiente de variação (CV), permitindo dessa forma uma comparação direta da confiabilidade de medidas, independente da escala (Hopkins, 2000).

O coeficiente de variação expressa o DP como porcentagem do valor da média. É obtido pela divisão do DP pela média e multiplicado por 100. Um coeficiente de variação igual a 100 % indica um DP igual a média. Quanto menor for o coeficiente de variação, mais homogênia será a amostra (Doria Filho, 1999).

Assim na padronização dos ensaios enzimáticos buscamos as condições experimentais que apresentassem coeficiente de variação menor que 5% e a melhor linearidade da reta. Desta forma, garantimos que as concentrações de substrato no procedimento estivessem adequadas

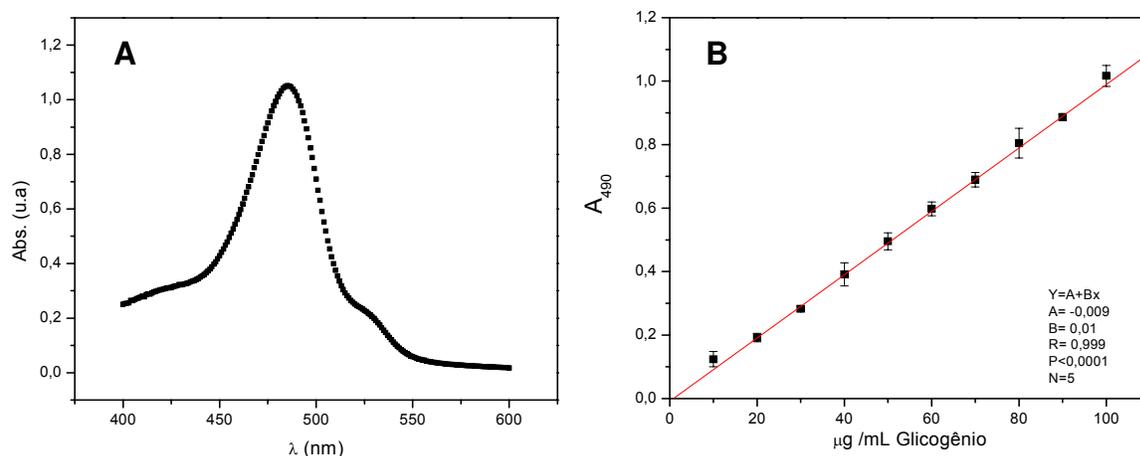
para que a enzima atuasse no máximo de sua velocidade mesmo em diferentes concentrações. Trabalhando em uma faixa linear garantimos que tanto aumentos da atividade da enzima quanto diminuições, em decorrência do treinamento e/ou suplementação, pudessem ser determinados.

### **Quantificação da Concentração de Glicogênio nos tecidos**

A quantificação da concentração de glicogênio nos tecidos foi feita pelo método colorimétrico proposto por Lo et al. (1970) Nele a glicose reage com o ácido fenol-sulfúrico e no final do processo é obtida uma solução laranja e a variação da intensidade da cor é analisada por espectrofotômetro a 490 nm.

Trinta a Cinquenta miligramas de tecido foram completamente imersos em 500  $\mu$ l de KOH 30% saturado com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  no intuito de realizar um digestão alcalina. Os tubos foram tampados com papel alumínio e levados ao banho-maria em água fervente por 30 minutos até que uma solução homogênea fosse obtida. Em seguidas, os tubos foram removidos do banho-maria e colocados em banho de gelo até esfriar. Foram adicionados 550  $\mu$ L de etanol (álcool etílico) a 95% para precipitar o glicogênio da digestão alcalina. As amostras foram deixadas no gelo por 30 minutos e então centrifugadas a 869g por 30 minutos. O sobrenadante foi aspirado. O precipitado de glicogênio foi dissolvido em 3.0 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  água purificada pelo sistema Milli-Q. Retirou-se uma alíquota de 1 ml da solução de glicogênio para outro tubo de ensaio. Adicionou-se um 1 ml da solução de Fenol 5% ao novo tubo. Cinco mililitros de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 98% foi adicionado rapidamente sobre a superfície da amostra (10 a 20 segundos), para assegurar uma boa mistura entre os dois. Os tubos foram colocados para esfriar em banho de água gelada por 10 minutos. Em seguida as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 490nm. As análises foram feitas em triplicata e o aparelho zerado com branco preparado com 1 ml de água purificada pelo sistema Milli-Q, 1 ml de fenol 5%, 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 98%.

Para a padronização da técnica fizemos experimentos iniciais que constaram da determinação do espectro de absorção de uma solução de glicogênio em água 100  $\mu$ g/ml (Figura 7A) e curva padrão obtida com soluções de glicogênio em concentrações que variaram de 10 a 100  $\mu$ g/ml (Figura 7B).



**Figura 7.** (A) Espectro de absorção de glicogênio em água (100µg/ml). (B) Curva padrão de glicogênio em água (10 a 100 µg/ml) dosado pela adição de fenol 5% em meio ácido. Cada ponto representa a média de três determinações.

O cálculo da concentração de glicogênio das amostras foi efetuado utilizando-se a equação abaixo:

$$\text{Concentração de Glicogênio (g/100g tecido)} = (A_{490}/k) \times (V/v) \times (10^{-4}/w)$$

Onde:  $A_{490}$  = absorbância a 490 nm;  $k$  = coeficiente angular da curva padrão de glicogênio;  $V$  = volume total da amostra de glicogênio;  $v$  = volume da alíquota da amostra usada no ensaio;  $w$  = massa do tecido

A unidade g (glicogênio) / 100 g tecido foi transformada em mmol unidade glicosil / Kg tecido, uma vez que 1 grama de glicogênio / 100g de tecido equivale a 55,5 mmol unidade glicosil /Kg tecido (Passonne.Jv e Lauderda.Vr, 1974).

### **Ataque Oxidativo: Quantificação dos peróxidos de lipídios (TBARS)**

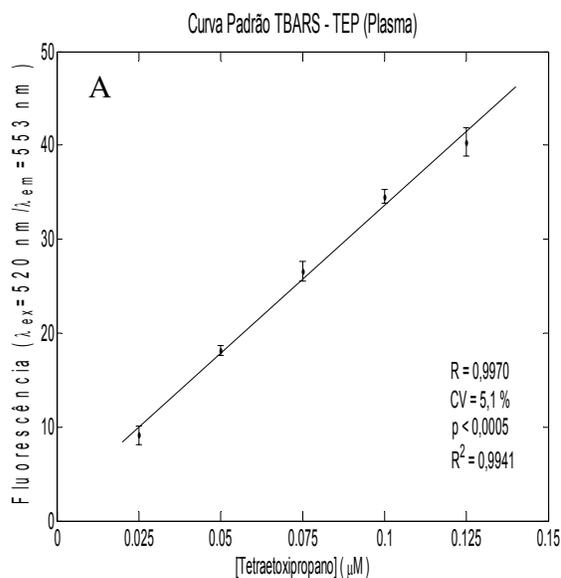
#### **Concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): no plasma**

Esse método é baseado na reação dos produtos de peroxidação lipídica com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Yagi, 1987), que resultam ao final do processo numa solução avermelhada acompanhada fluorimetricamente. Para isso, foram misturados 20 µL de plasma com 4,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,04M). Posteriormente, 0,5 mL de ácido fosfotungstico 10% foi adicionado à mistura. Após centrifugação à 1800 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido em 2,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,04M) e 0,3 mL de ácido fosfotungstico 10% e uma nova

centrifugação foi feita a 1800 g por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 4,0 mL de água destilada, 1,0 mL do reagente TBA (uma mistura de igual volume de solução de 0,67% TBA e ácido acético glacial). A mistura foi aquecida à 95° C por 60 minutos em banho maria e resfriada em banho de água gelada. Em seguida, 5 mL de n-butanol foi adicionado e as amostras foram centrifugadas à 1800 g por 15 minutos. Do sobrenadante (camada de n-butanol) foi aliqotado 1 ml para leitura da peroxidação lipídica em fluorímetro (Fluorescence Spectrophotometer F-4500, Hitachi) , a 515 nm de excitação e 553 nm de emissão. Após a medida de fluorescência, onde  $f$  é a intensidade de fluorescência da amostra, e  $F$  a intensidade de fluorescência da solução padrão (obtida pela reação de 0,5 nmol de tetraetoxipropano com TBA), o índice de peroxidação lipídica foi expresso em termos de malonaldeído (MDA) obtido pela fórmula (Yagi, 1987), mostrada a seguir:

$$Lp = 0,5 \times f / F \times 1,0 / 0,02 = f / F \times 25 \quad (\text{nmol MDA/ mL plasma})$$

Uma curva padrão foi feita para determinação da linearidade ( $r$ ) e do coeficiente de variação (CV) do procedimento experimental na qual utilizamos Tetraetoxipropano (TEP) [0,025 a 0,125  $\mu\text{M}$ ] para substituir os peróxidos de lipídio e reagir com o TBA (Figura 7). Cada um dos pontos da curva padrão foi feito em triplicata e as retas plotadas de acordo com a média dos três valores obtidos.



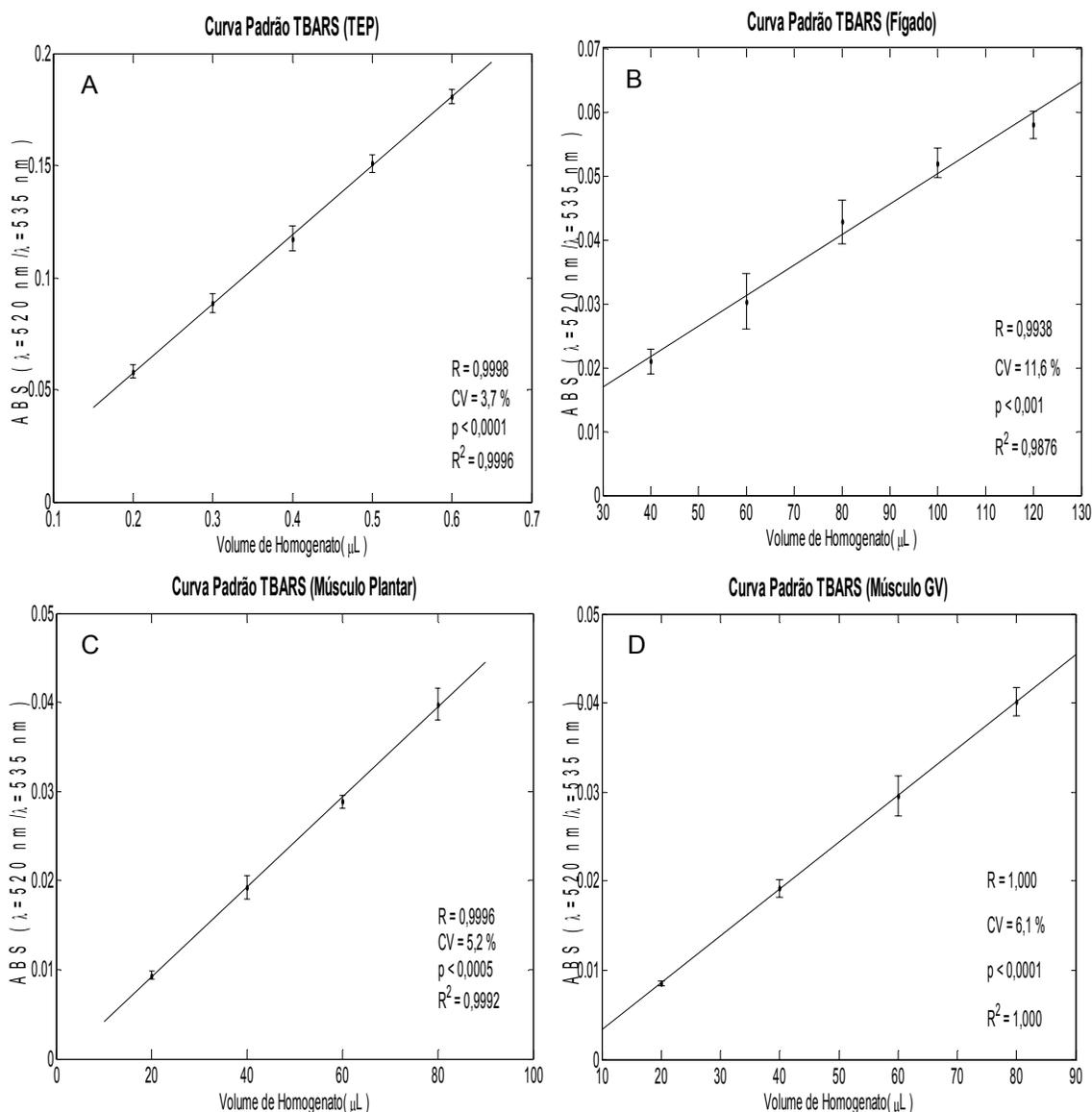
**Figura 8.** Curva padrão TBARS usando Tetraetoxipropano (TEP) nas concentrações de 0,025, 0,005, 0,075, 0,1, 0,125  $\mu\text{M}$ .

Para análise de TBARS foi utilizado o volume de 20  $\mu$ L de plasma (valor com menor desvio e próximo a reta linear correspondente a 0.05nM de TEP).

Concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecidos

O TBARS nos tecidos foi quantificado conforme os métodos descritos por Ohkawa (1979) e Uchiyama & Mihara (1978). No ensaio os produtos resultantes do ataque oxidativo às estruturas celulares (peróxidos lipídicos), reagem com o ácido 1-tiobarbitúrico (TBA), formando bases de Schiff. A interação entre os peróxidos lipídicos e o TBA forma um complexo colorido, mensurado em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 532 nm. Foram adicionados no homogenato 3mL de uma solução contendo ácido fosfórico 0,1%, solução KCl 1,15% para completar um volume de 0,5 e 1 ml de solução ácido tiobarbitúrico 0,6%. A mistura foi aquecida à 95° C por 60 minutos em banho maria e resfriada em banho de água gelada. Quatro mililitros de n-butanol foi adicionado e as amostras foram centrifugadas à 2415 g, 4°C por 15 minutos. Do sobrenadante (camada de n-butanol) foi aliqotado 1 ml para leitura da peroxidação lipídica em espectrofotômetro. O cálculo de determinação da peroxidação lipídica nos tecidos foi obtido a partir da diferença entre as absorbâncias nos comprimentos de onda de 520 nm e 535nm e da comparação entre as curvas padrão com TEP. Nos cálculos também foram levados em consideração a massa de tecido utilizada no preparo do homogenato e a diluição desse homogenato.

A Figura 9 apresenta as curvas padrões realizadas com TEP (A), diferentes volumes do homogenato de fígado (B), músculo plantar (C) e músculo gastrocnemio vermelho (D). Cada um dos pontos de ambas curvas padrão foram acompanhados em triplicata e as retas plotadas de acordo com a média dos três valores obtidos.



**Figura 9.** Curva padrão TBARS usando Tetraetoxipropano (TEP) [A], homogenato do fígado [B], homogenato do músculo plantar [C], homogenato do músculo gastrocnêmio vermelho [D]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas.

Uma boa linearidade (0.9998, 0.9938, 0.9996 e 1.000) e coeficiente de variação próximo ou abaixo de 5% (3,7%, 11,6%, 5,2% e 6,1%) foram obtidos nas curvas padrões mostradas acima. Diante disso, os volumes escolhidos para realizar os ensaios foram: 100  $\mu\text{L}$  de homogenato do fígado; 60  $\mu\text{L}$  de homogenato do músculo plantar; 80  $\mu\text{L}$  de homogenato do músculo GV. Esta escolha foi feita devido as médias das triplicatas estarem mais próximas à reta e possuírem o menor desvio padrão.

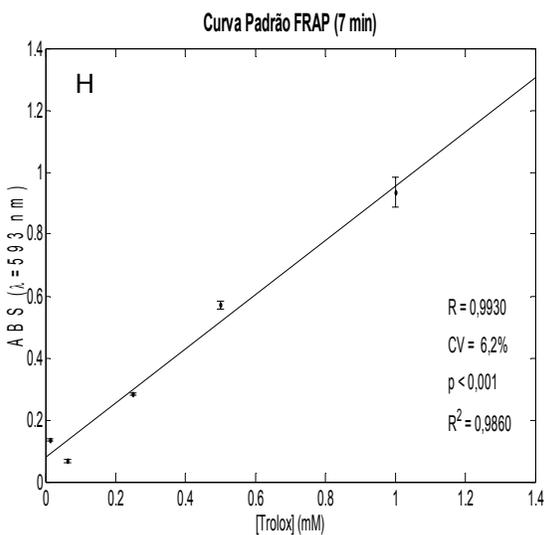
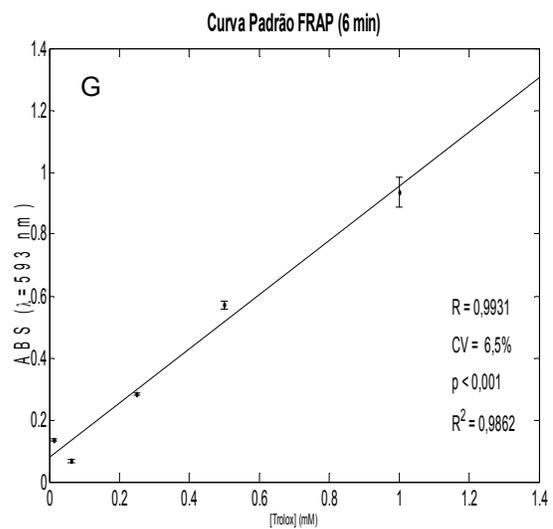
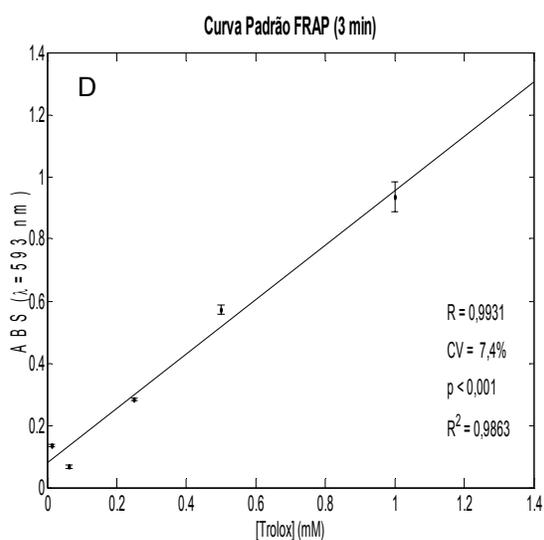
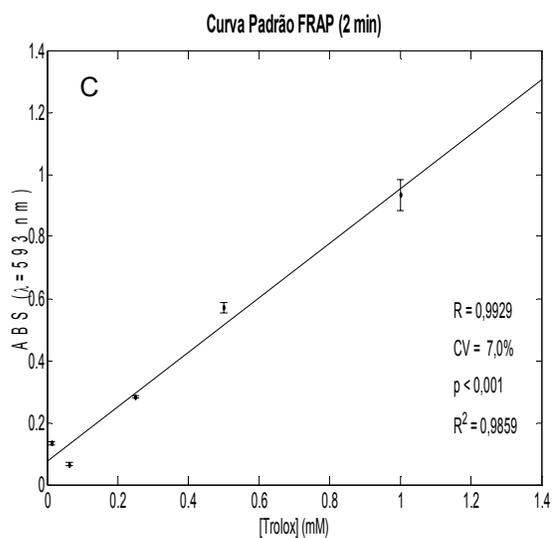
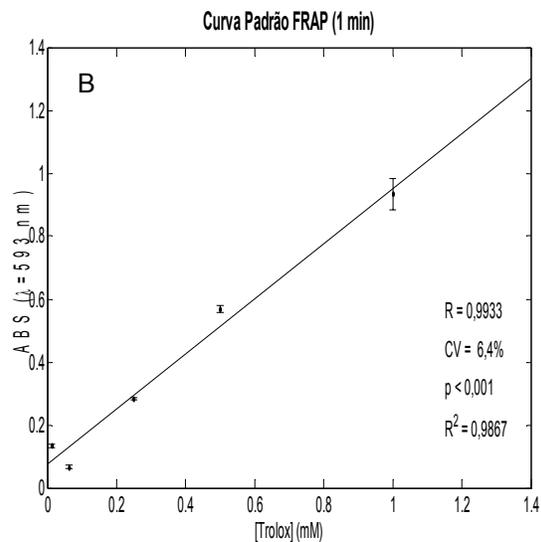
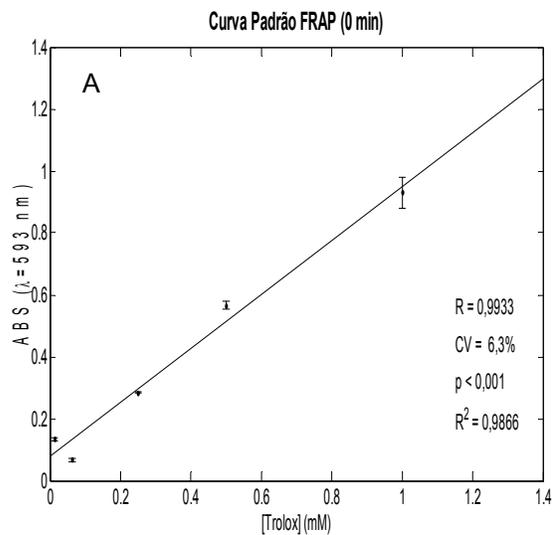
### **Sistema de Defesa Antioxidante: não enzimático**

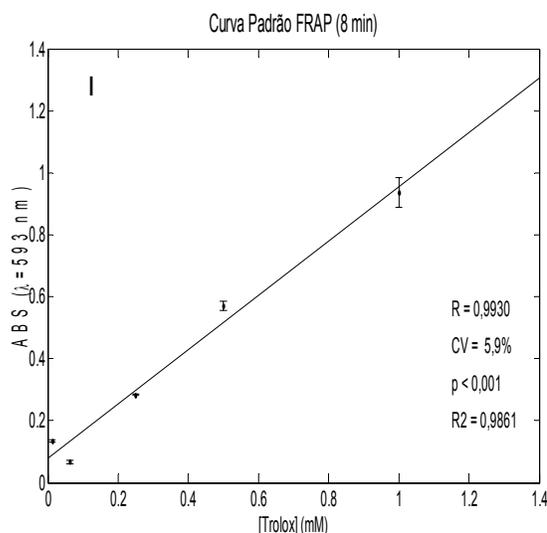
#### Quantificação da capacidade antioxidante total do plasma - capacidade do plasma em reduzir o ferro (FRAP)

É uma técnica comumente utilizada para quantificação da *capacidade antioxidante total* (Oh, Lim *et al.*, 2007; Panza, Wazlawik *et al.*, 2008). O método proposto por Benzie & Strain (1996), tem como objetivo medir a capacidade do plasma em reduzir o íon férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) [FRAP]. Nele, quando um complexo férrico-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{+3} - \text{TPTZ}$ ) é reduzido a forma ferroso ( $\text{Fe}^{+2} - \text{TPTZ}$ ), em baixo pH, uma cor azul intensa com absorção máxima à 593 nm é desenvolvida. A variação de intensidade da cor da solução final indica os valores de FRAP. Na técnica do FRAP, excesso de  $\text{Fe}^{+3}$  é utilizado e o fator limitante para a formação de  $\text{Fe}^{+2} - \text{TPTZ}$ , e consequentemente da cor, é a capacidade de redução da amostra.

Para isso, partimos de três soluções: tampão acetato 0.3 M, pH 3.6; de 10 mM de TPTZ (tripiridiltriazina) diluídos em 40 mM de HCl; e de 20 mM de cloreto de ferro ( $\text{FeCl}_3$ ) diluídos em tampão acetato descrito acima. Um reagente de trabalho foi preparado com 10 volumes de tampão acetato (300 mM), 1 volume da solução de TPTZ (10 mM) e 1 volume da solução de  $\text{FeCl}_3$  (20 mM). Em um microtubo, 750  $\mu\text{L}$  de reagente de trabalho somados à 25  $\mu\text{L}$  de plasma e 75  $\mu\text{L}$  de água foram imersos em banho maria durante 10 min à 37°C. Para a leitura do branco, os 25  $\mu\text{L}$  da amostra (plasma) foram substituídos por água.

Para determinar o tempo em que as amostras permaneceriam em temperatura ambiente, após o banho maria, foram traçadas diversas curvas padrão utilizando solução de Trolox, que substitui os antioxidantes plasmáticos, em concentrações conhecidas [0.0625 à 1 mM] (Figura 10). Para cada concentração foram feitas leituras em triplicata e as médias das absorbâncias obtidas foram plotadas versus a respectiva concentração de Trolox.





**Figura 10.** Curvas padrão Trolox em concentrações conhecidas (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mM.) e diferentes tempos de exposição à temperatura ambiente: 0 min [A], 1 min [B], 2 min [C], 3 min [D], 4 min [E], 5 min [F], 6 min [G], 7 min [H], 8 min [I] minutos. Todas as análises foram feitas em triplicadas e representadas no gráfico como Med ± DP.

Analisando os valores de linearidade e coeficiente de variação obtidos nas curvas padrão apresentadas acima, observamos que em todos os momentos encontramos valores muito próximos um do outro. Diante disso, mantivemos as amostras expostas por 4 minutos em temperatura ambiente antes de mensurar a capacidade antioxidante total do plasma, como o sugerido por Benzie & Strain (1996) no trabalho original.

As concentrações de FRAP apresentadas neste trabalho foram calculadas em relação à concentrações conhecidas de Trolox, através da equação da reta resultante da curva padrão escolhida acima (Figura 10E).

### **Sistema de Defesa Antioxidante: enzimático**

#### Quantificação da Atividade da Enzima Glutathione Redutase (GR):

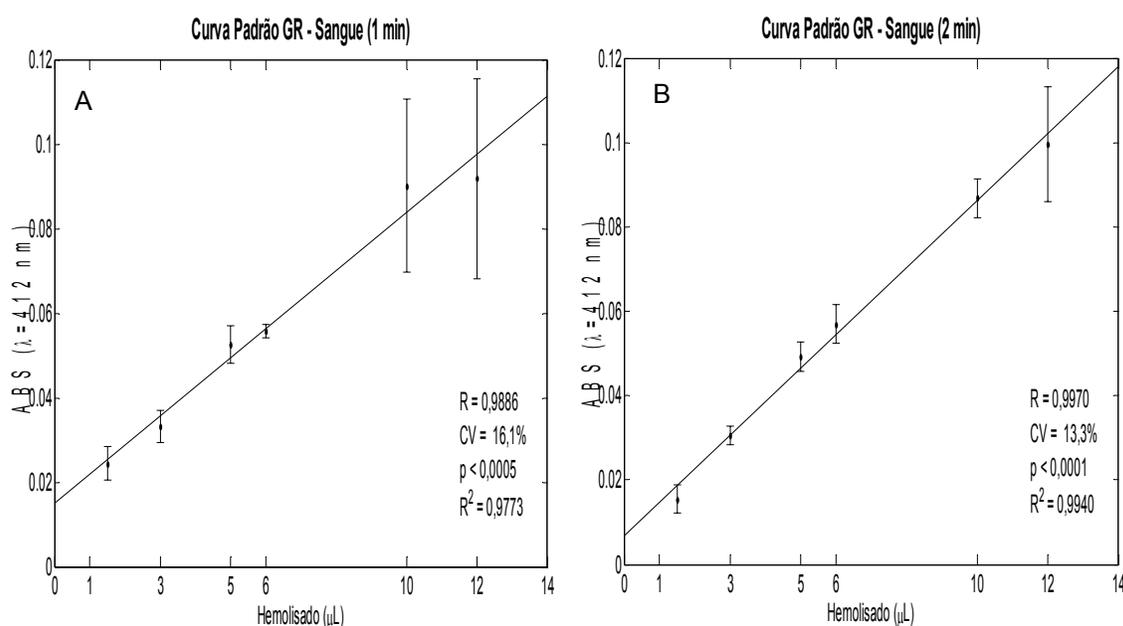
Os ensaios foram conduzidos de acordo com Smith et al (1988). O princípio do método baseia-se no aumento da absorvância à 412 nm, quando 5,5'-ditiobis(2-ácidonitrobenzóico) [DTNB] é reduzido pela Glutathione (GSH) e a diferença nos valores obtidos ( $\Delta A_{412}$ ) é a medida da atividade da GR. Este método é mais sensível e menos passível a interferências do que o método normalmente realizado de monitoramento da oxidação do NADPH. Além disso, a utilização do DTNB permite a realização do ensaio da glutathione redutase mesmo na presença de outras enzimas dependentes de NADPH e extratos protéicos comumente contaminantes (Smith, Vierheller *et al.*, 1988).

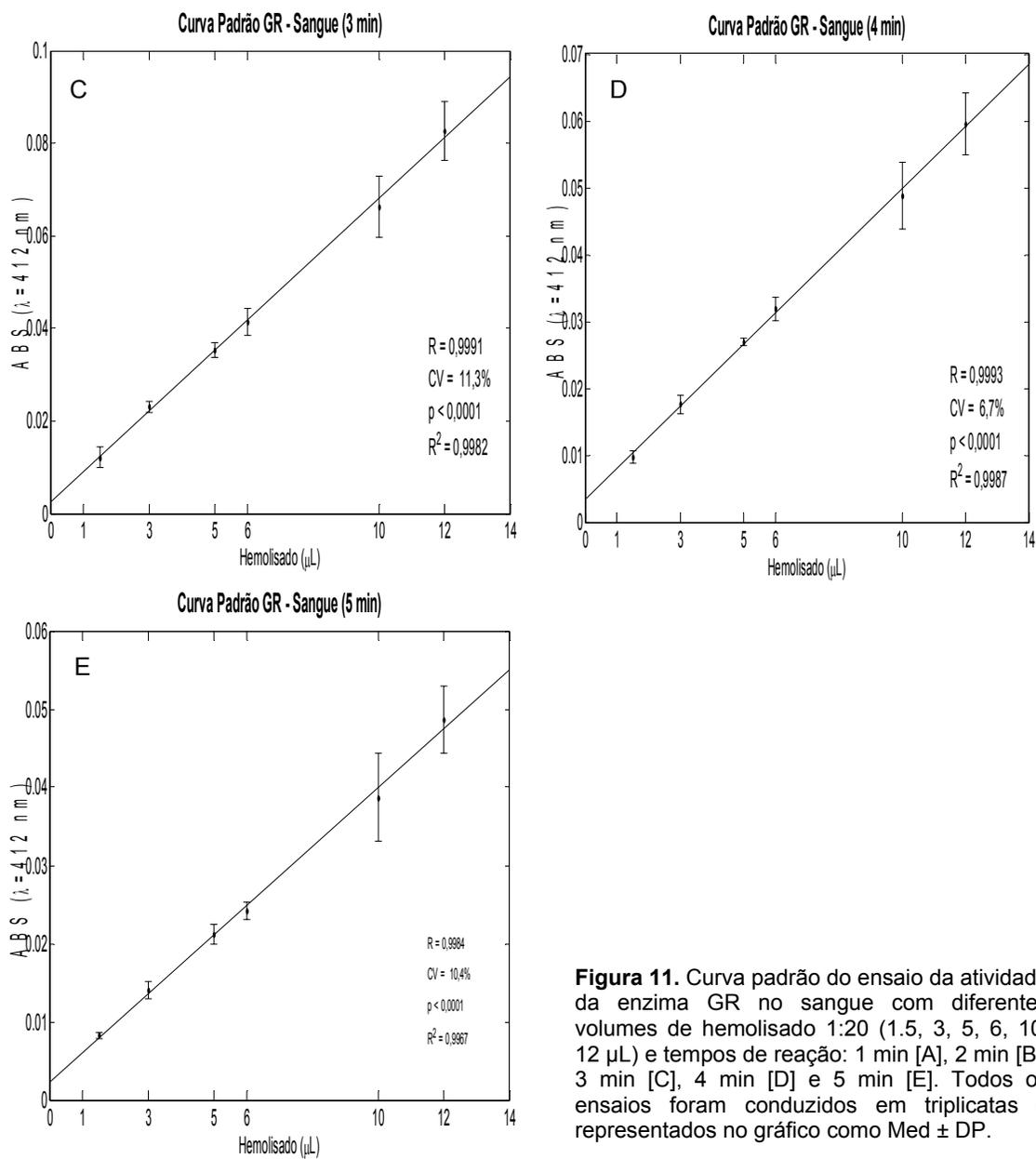


Para a realização dos ensaios tanto as amostras de hemolisado quanto as amostras de homogenato precisaram ser previamente preparadas para leitura. Após descongeladas, as amostras de hemolisado 1:1 foram diluídas em 1:20. Já às amostras de homogenato foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  etanol (95%) por mililitro de homogenato. Após 30 minutos em banho de gelo, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  Triton X (1%) por mililitro de homogenato. O intuito desse preparo do homogenato foi propiciar maior liberação das enzimas através do rompimento das membranas e solubilização dos lipídios.

Em seguida, adicionamos as amostras (hemolisado 1:20 ou homogenatos) à um meio de incubação contendo solução  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2 M) e EDTA (1 mM) em pH 7.4, DTNB (3 mM), NADPH (0,2 mM) e  $\text{H}_2\text{O}$  purificada. A Glutaciona Oxidada (GSSG) [20 mM] foi adicionada para iniciar a reação.

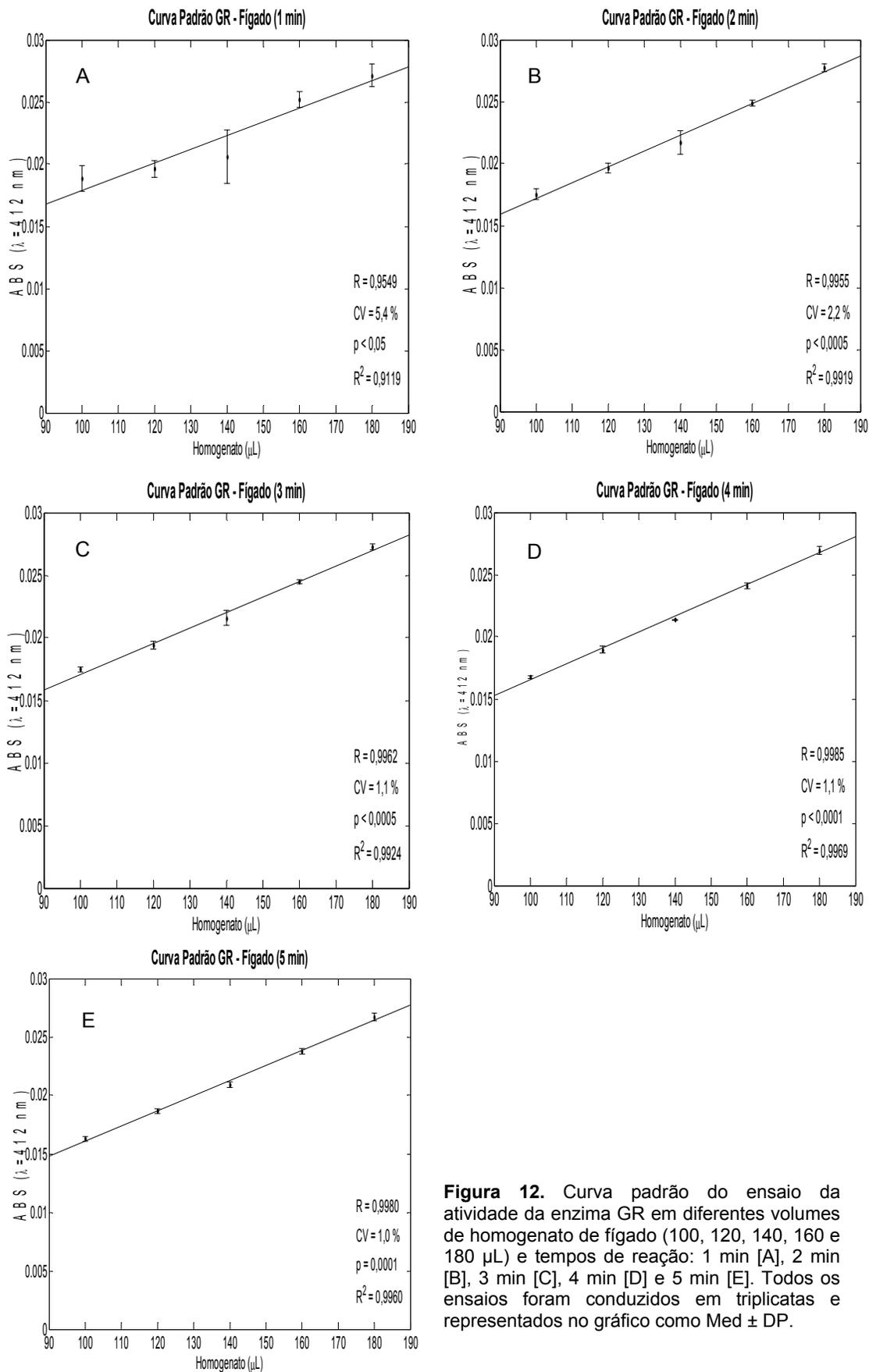
Para determinação da melhor condição experimental para análise da atividade da enzima GR, foram feitas curvas padrão variando os tempos de reação (1, 2, 3, 4 e 5 minutos) e os volumes de amostra: hemolisado 1:20 (1.5, 3, 6, 10 e 12  $\mu\text{L}$ ) (Figura 11), homogenato de fígado (100, 120, 140, 160 e 180  $\mu\text{L}$ ) (Figura 12), homogenato de músculo plantar (20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{L}$ ) (Figura 13) e homogenato de músculo gastrocnêmio vermelho (20, 40, 80, 100 e 120  $\mu\text{L}$ ) (Figura 14). Cada ponto das curvas foi acompanhado em triplicata e as retas plotadas de acordo com a média dos três valores obtidos.





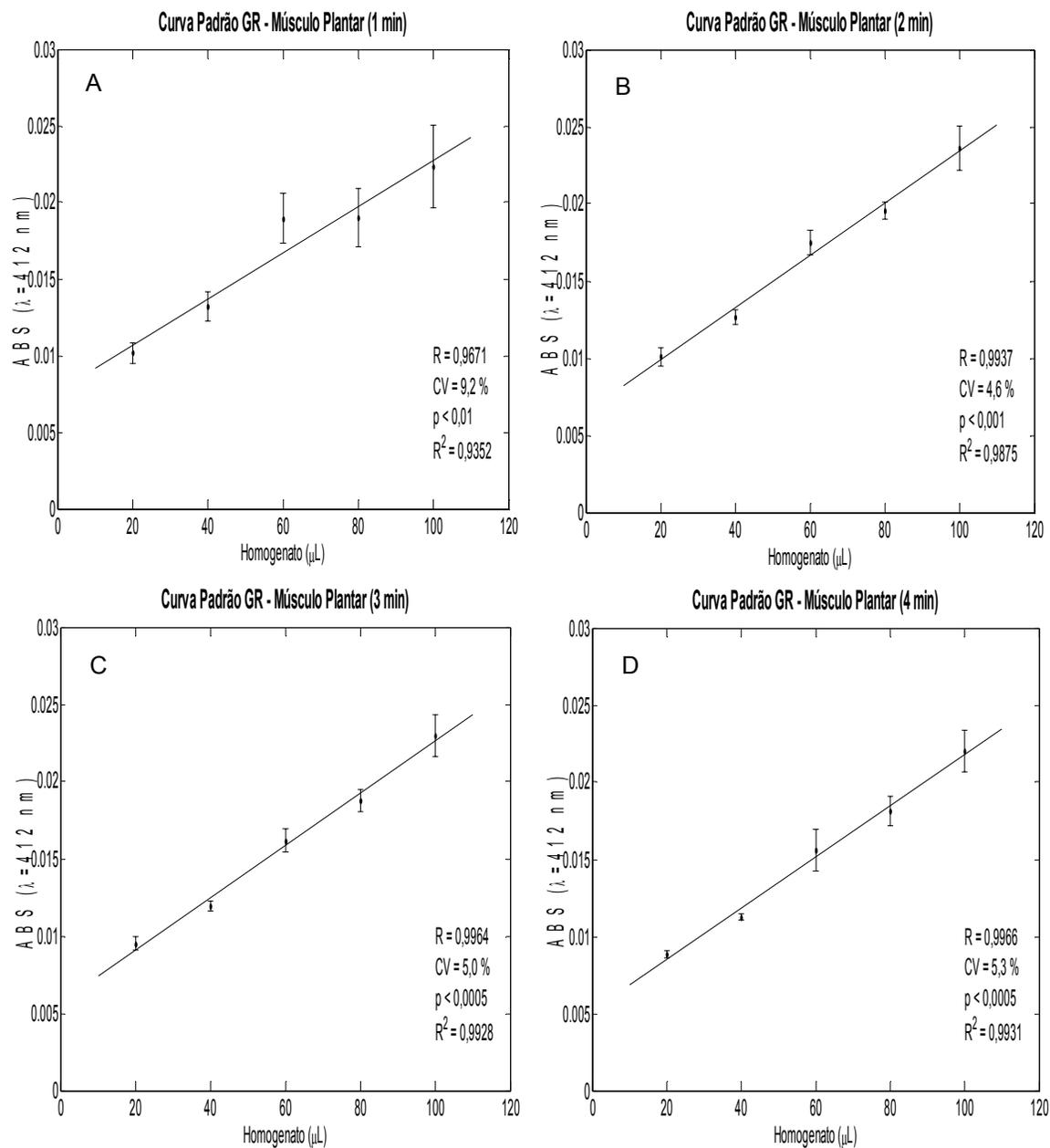
**Figura 11.** Curva padrão do ensaio da atividade da enzima GR no sangue com diferentes volumes de hemolisado 1:20 (1.5, 3, 5, 6, 10, 12  $\mu\text{L}$ ) e tempos de reação: 1 min [A], 2 min [B], 3 min [C], 4 min [D] e 5 min [E]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med  $\pm$  DP.

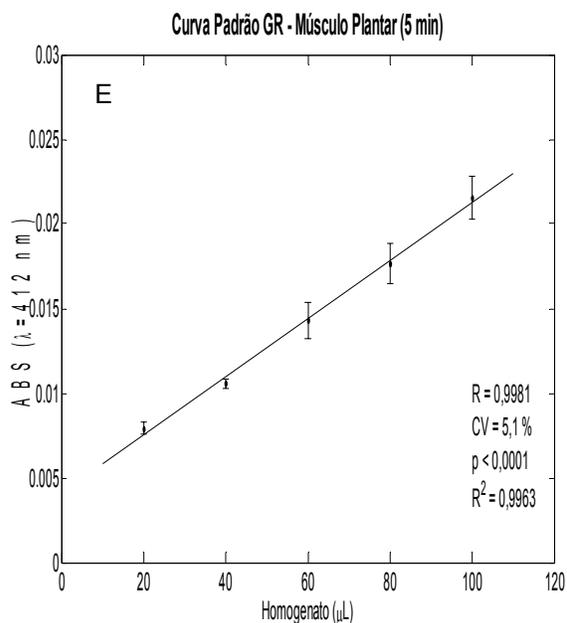
De acordo com a Figura 11, padronizamos para a análise sanguínea da atividade da enzima GR, 4 minutos de reação ( $r=0,9964$  e  $CV=6,7\%$ ) e 5  $\mu\text{L}$  de hemolisado 1:20, por este ponto estar localizado mais próximo à reta e possuir o menor desvio padrão.



**Figura 12.** Curva padrão do ensaio da atividade da enzima GR em diferentes volumes de homogenato de fígado (100, 120, 140, 160 e 180  $\mu\text{L}$ ) e tempos de reação: 1 min [A], 2 min [B], 3 min [C], 4 min [D] e 5 min [E]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med  $\pm$  DP.

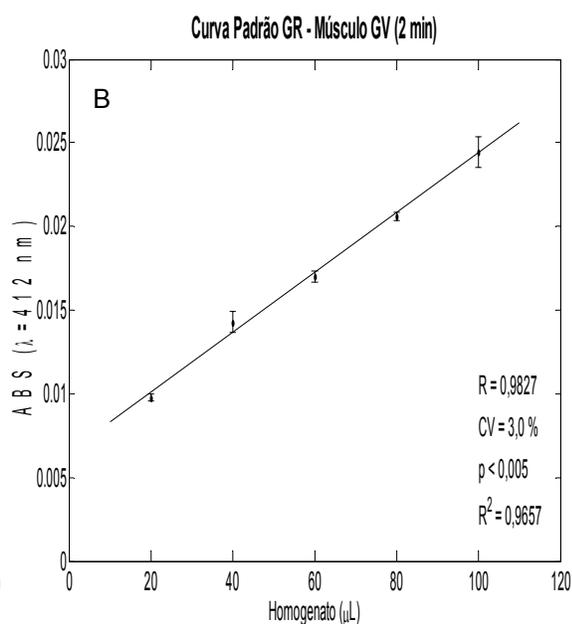
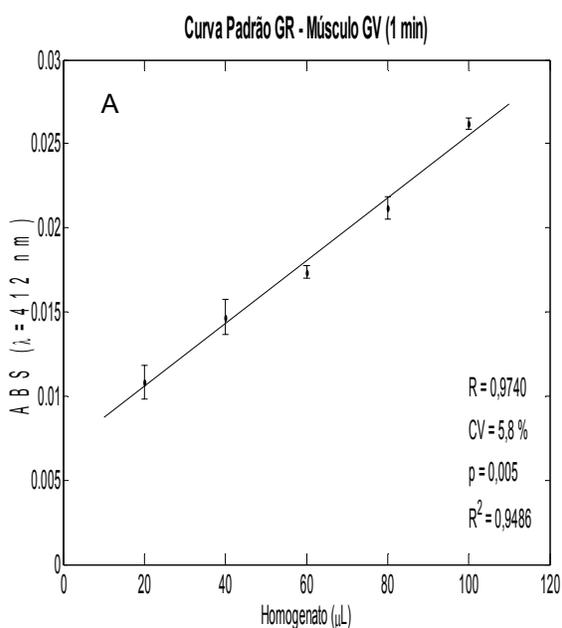
Observando a Figura 12, foi definido o volume de 160  $\mu\text{L}$  de homogenato de fígado com 3 minutos de reação (Figura 12C) como a melhor condição experimental para dosagem da atividade da enzima GR no fígado dos animais ( $r = 0.9962$  e  $\text{CV} = 1,1\%$ ).

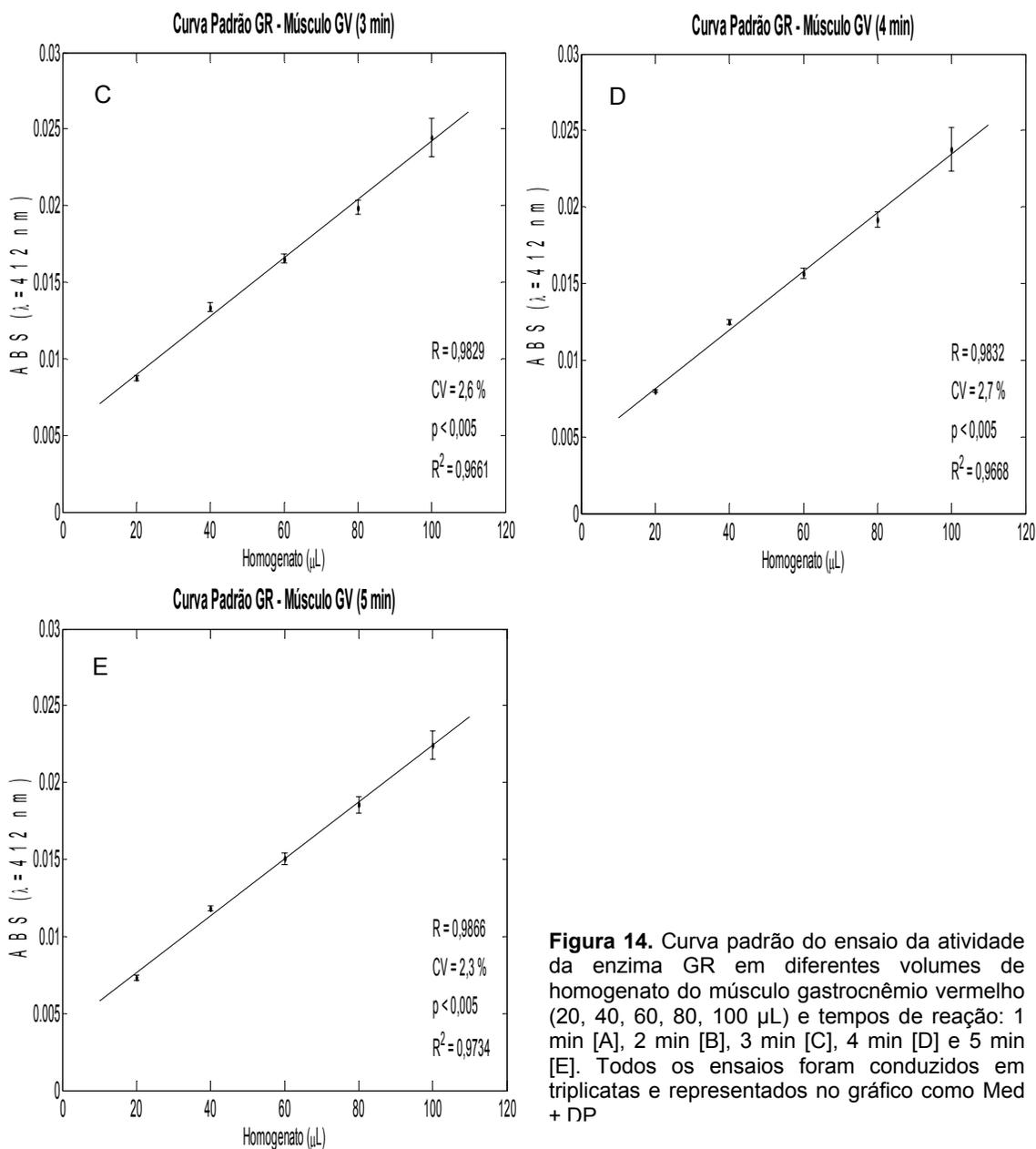




**Figura 13.** Curva padrão do ensaio da atividade da enzima GR em diferentes volumes de homogenato do músculo plantar (20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{L}$ ) e tempos de reação: 1 min [A], 2 min [B], 3 min [C], 4 min [D] e 5 min [E]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med  $\pm$  DP.

Analisando as curvas padrão do músculo plantar, estabelecemos a melhor condição experimental nos ensaios para determinação da atividade da enzima GR como sendo 3 minutos de reação (Figura 13). Isto porque é o menor tempo de reação com boa linearidade ( $r=0,9964$ ) e coeficiente de variação experimental de 5%. Além disso, o volume de 40  $\mu\text{L}$  de homogenato foi escolhido para realização do ensaio, por este ponto apresentar a média das triplicatas mais próxima à reta e possuir o menor desvio padrão (Figura 13C).





**Figura 14.** Curva padrão do ensaio da atividade da enzima GR em diferentes volumes de homogenato do músculo gastrocnêmio vermelho (20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{L}$ ) e tempos de reação: 1 min [A], 2 min [B], 3 min [C], 4 min [D] e 5 min [E]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med + DP

Dos dados obtidos das curvas padrão (Figura 14) realizadas em amostras de músculo gastrocnêmio vermelho, padronizamos para o ensaio enzimático da GR o tempo de 5 minutos de reação e volume de 60 $\mu\text{L}$  de homogenato (Figura 14E).

**Quantificação Atividade da Enzima Catalase (CAT):**

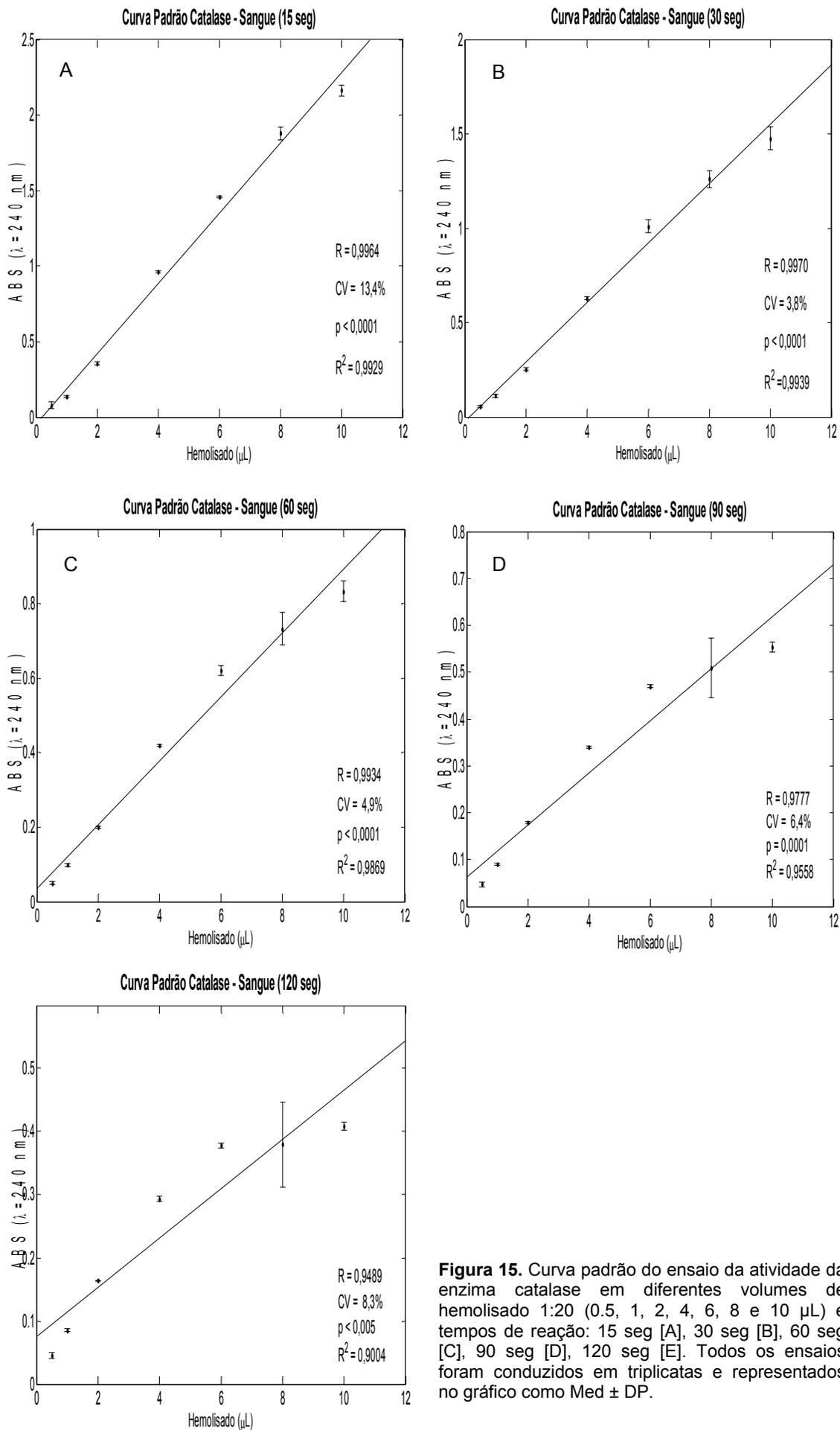
De acordo com o método desenvolvido por Aebi (1984), a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é seguida pela diminuição na absorbância à 240 nm, em espectrofotômetro. A diferença nos valores obtidos ( $\Delta A_{240}$ ) por unidade de tempo é a medida da atividade da catalase.



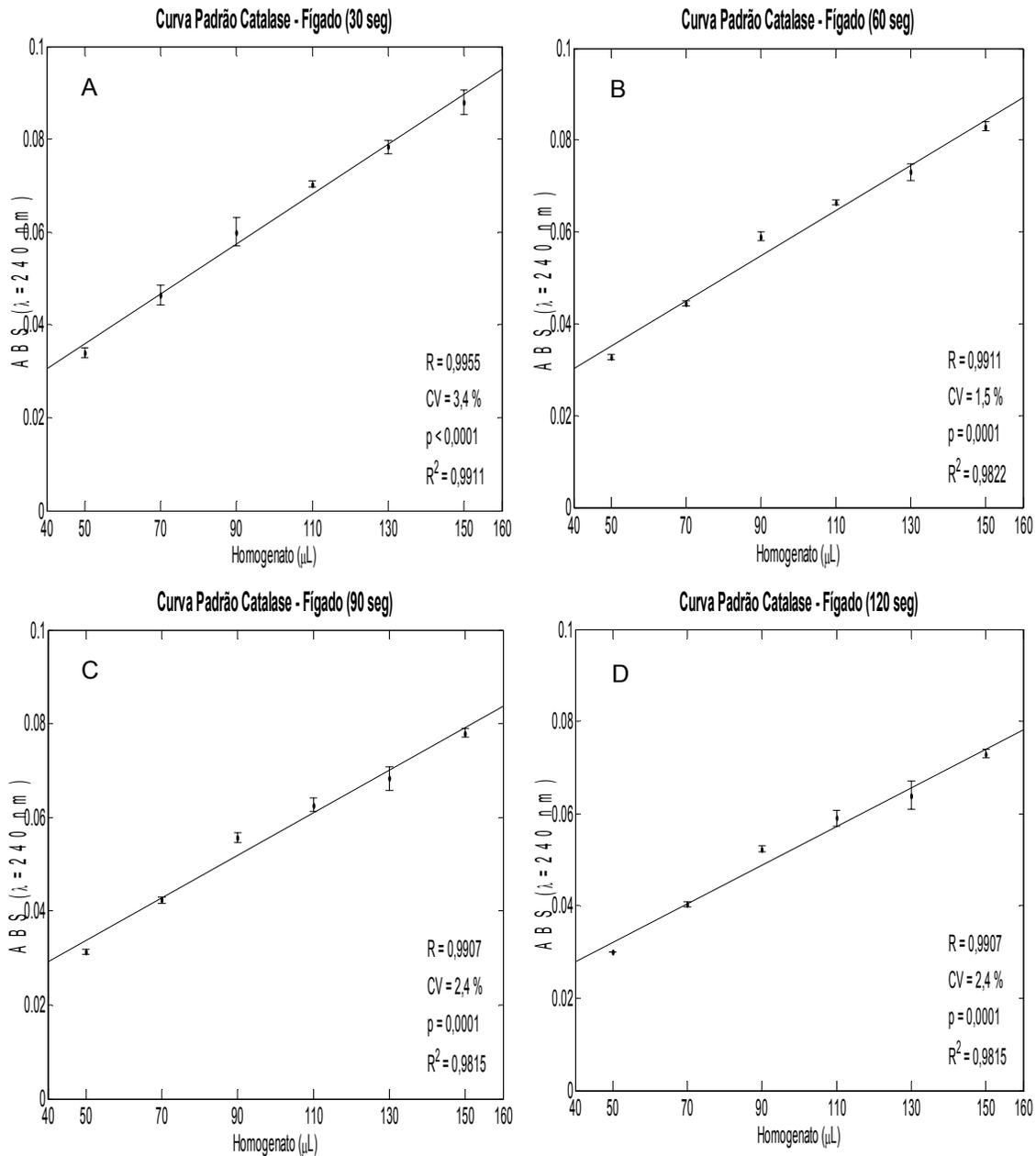
Assim como nos ensaios da GR, para análise da atividade da Catalase as amostras precisaram ser previamente preparadas antes da realização dos experimentos. Após descongeladas, as amostras de hemolisado 1:1 foram diluídas em 1:20. Às amostras de homogenato foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  etanol (95%) por mililitro de homogenato e mantidas por 30 minutos em banho de gelo. Foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  Triton X (1%) por mililitro de homogenato e a partir daí as amostras estavam prontas para quantificação da atividade enzimática.

Os ensaios para dosagem da atividade da catalase foram conduzidos adicionando-se as amostras (hemolisado 1:20, homogenatos de fígado e músculos plantar e gastrocnêmio vermelho) à uma solução contendo tampão fosfato (50 mM), pH 7.0, e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 mM) (Aebi, 1984).

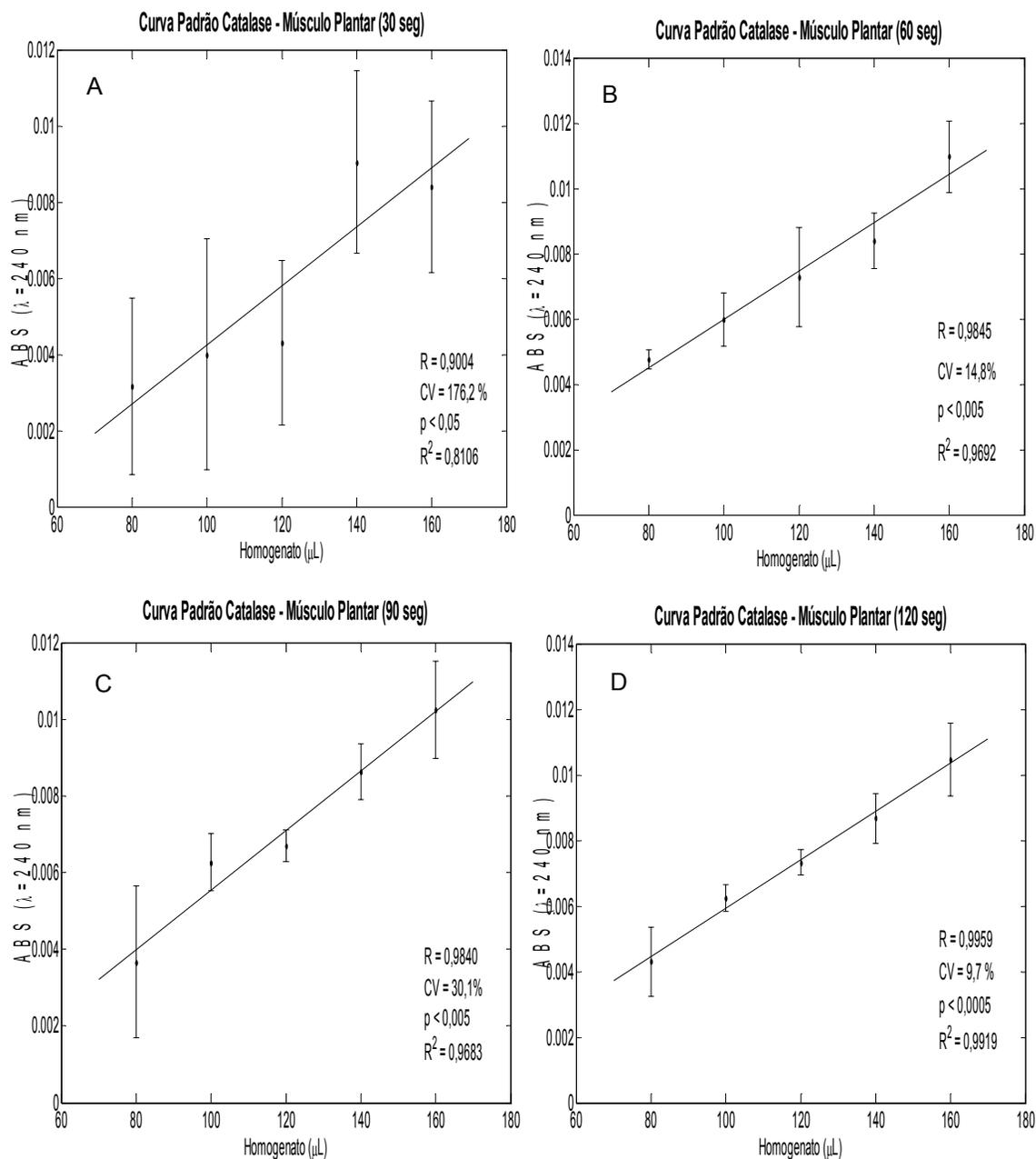
Para definir os melhores, volume de amostra e tempo de reação para determinação da atividade da catalase, foram feitas curvas padrão, nas quais o decaimento na absorbância foi acompanhado por 15, 30, 60, 90 e 120 segundos para análises no sangue, e 30, 60, 90 e 120 segundos para as amostras de tecidos. Foram testados diferentes volumes de hemolisado 1:20 (0.5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{L}$ ) (Figura 15), homogenato do fígado (50, 70, 90, 110, 130 e 150  $\mu\text{L}$ ) (Figura 16), homogenato do músculo plantar (80, 100, 120, 140 e 160  $\mu\text{L}$ ) (Figura 17) e homogenato do músculo gastrocnêmio vermelho (100, 120, 140, 160 e 180  $\mu\text{L}$ ) (Figura 18).



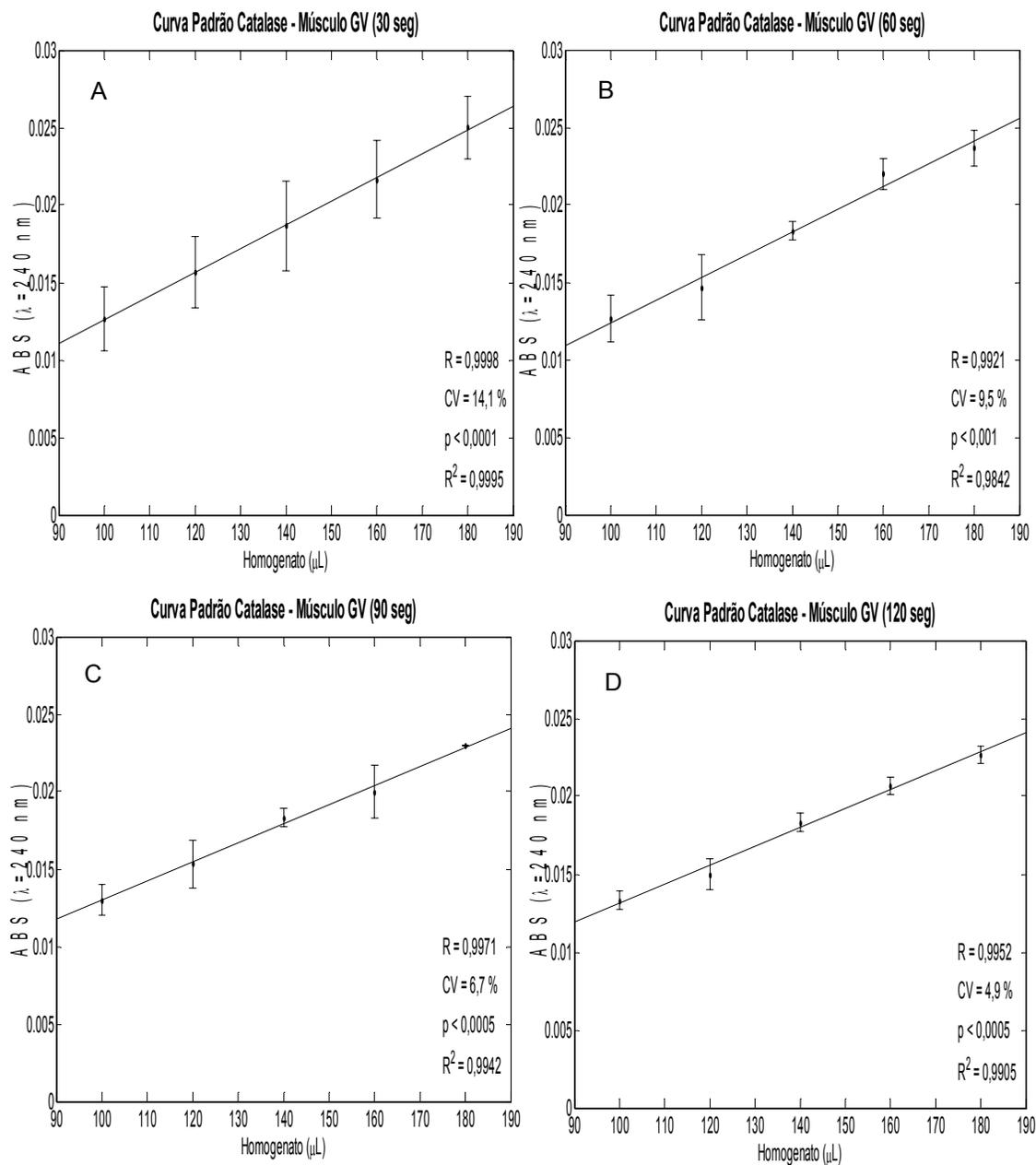
**Figura 15.** Curva padrão do ensaio da atividade da enzima catalase em diferentes volumes de hemolisado 1:20 (0.5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{L}$ ) e tempos de reação: 15 seg [A], 30 seg [B], 60 seg [C], 90 seg [D], 120 seg [E]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med  $\pm$  DP.



**Figura 16.** Curva padrão do ensaio da atividade da enzima catalase em diferentes volumes de homogenato de fígado (50, 70, 90, 110, 130 e 150 µL) e tempos de reação: 30 seg [A], 60 seg [B], 90 seg [C], 120 seg [D]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med ± DP.



**Figura 17.** Curva padrão do ensaio da atividade da enzima catalase em diferentes volumes de homogenato de músculo plantar (80, 100, 120, 140, 160  $\mu\text{L}$ ) e tempos de reação: 30 seg [A], 60 seg [B], 90 seg [C], 120 seg [D]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med  $\pm$  DP.



**Figura 18.** Curva padrão do ensaio da atividade da enzima catalase em diferentes volumes de homogenato do músculo gastrocnêmio vermelho (100, 120, 140, 160 e 180  $\mu\text{L}$ ) e tempos de reação 30 seg [A], 60 seg [B], 90 seg [C], 120 seg [D]. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas e representados no gráfico como Med  $\pm$  DP.

Pela análise das curvas, foram padronizadas as seguintes condições experimentais para as amostras: 4  $\mu\text{L}$  de hemolisado 1:20 com 30 segundos de reação (Figura 15B); 110  $\mu\text{L}$  de homogenato do fígado com 30 segundos de reação (Figura 16A); 120  $\mu\text{L}$  de homogenato do músculo plantar com 120 segundos de reação (Figura 17D); 140  $\mu\text{L}$  de homogenato do músculo gastrocnêmio vermelho com 120 segundos de reação (Figura 18D).

### **Cálculo da Atividade enzimática**

Nas padronizações apresentadas anteriormente, fica evidente que os experimentos foram conduzidos em uma faixa linear de leitura. Diante disso, para o cálculo da atividade enzimática tanto no sangue como nos tecidos foi utilizada a Lei de Beer e os valores expressos em U/g. Assim, as equações para determinação da atividade enzimática no sangue [Equação 8] e nos tecidos [Equação 9] foram descritas da seguinte maneira:

$$\text{Ativ. Enz.} = \frac{\text{Taxa (ABS/min)} \times V_C (\mu\text{L}) \times \text{FD}}{\epsilon (\text{mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \times V_A (\mu\text{L}) \times [\text{Hb}] (\text{g/mL}) \times \text{caminho óptico (cm)}} \quad [\text{Equação 8}]$$

Onde  $V_C$  é o volume total da cubeta;  $FD$  é o fator de diluição do hemolisado;  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar, para o  $\text{H}_2\text{O}_2$  equivale a  $0,04 \text{ mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  e para o  $TNB$  equivale a  $13,6 \text{ mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ;  $V_A$  é o volume de amostra padronizado no ensaio;  $[\text{Hb}]$  é a quantidade de hemoglobina presente no hemolisado, quantificada pelo método do Cianeto de Hemiglobina (Drabkin & Austin, 1935; Henry JB, 1999).

$$\text{Ativ. Enz.} = \frac{\text{Taxa (ABS/min)} \times V_C (\mu\text{L}) \times V_H (\text{mL})}{\epsilon (\text{mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \times V_A (\mu\text{L}) \times M (\text{g}) \times \text{caminho óptico (cm)}} \quad [\text{Equação 9}]$$

Onde  $V_C$  é o volume total da cubeta;  $V_H$  é o volume total de homogenato preparado;  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar, para o  $\text{H}_2\text{O}_2$  equivale a  $0,04 \text{ mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  e para o  $TNB$  equivale a  $13,6 \text{ mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ;  $V_A$  é o volume de amostra padronizado no ensaio;  $M$  é a massa de tecido utilizada no preparo do homogenato.

## 9. ANEXO III

### Resultados dos grupos treinados e suplementados com Caldo de Cana (CC), Maltodextrina (M) ou Quercetina (Q)

**Tabela 7.** Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutatona redutase (GR), nas hemácias. Capacidade antioxidante total (FRAP), concentração de ácido úrico, peroxidação lipídica (TBARS) no plasma.

	Unidade	Sangue			
		CT	CC	Q	M
<b>CAT</b>	(U /g Hb)	$(8,1 \pm 1,1)10^5$	$(7,7 \pm 1,7)10^5$	$(8,4 \pm 1,8)10^5$	$(7,2 \pm 1,3)10^5$
<b>GR</b>	(U /g Hb)	$10,3 \pm 7,7$	$12,9 \pm 12,7$	$14,2 \pm 9,2$	$9,7 \pm 5,6$
<b>FRAP</b>	Eq. Trolox ( $\mu$ M)	$246 \pm 43$	$260 \pm 48$	$276 \pm 65$	$271 \pm 38$
<b>Ácido Úrico</b>	(mg/ dL)	$0,98 \pm 0,43$	$0,93 \pm 0,23$	$1,13 \pm 0,47$	$1,17 \pm 0,34$
<b>TBARS</b>	[MDA] (nmol/ ml plasma)	$7,3 \pm 2,0$	$7,3 \pm 1,2$	$7,3 \pm 2,0$	$8,5 \pm 2,6$

Resultados apresentados em Med  $\pm$  DP. Anova One-way e pós teste de Tukey (CAT, GR, FRAP e Ácido úrico). Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's (TBARS).

**Tabela 8.** Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutatona redutase (GR), peroxidação lipídica (TBARS) no homogenato de fígado.

	Unidade	Fígado			
		CT	CC	Q	M
<b>CAT</b>	U/ g tecido)	$(5,5 \pm 0,5)10^6$	$(5,7 \pm 0,5)10^6$	$(5,4 \pm 0,5)10^6$	$(5,6 \pm 0,4)10^6$
<b>GR</b>	U/ g tecido)	$589 \pm 61$	$626 \pm 72$	$610 \pm 49$	$611 \pm 44$
<b>TBARS</b>	( $\mu$ M)	$13,0 \pm 6,0$	$13,0 \pm 3,5$	$11,0 \pm 3,7$	$11,4 \pm 6,0$

Resultados apresentados em Med  $\pm$  DP. Anova One-way e pós teste de Tukey (CAT). Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's (GR e TBARS).

**Tabela 9.** Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutatona redutase (GR), peroxidação lipídica (TBARS) no homogenato do músculo gastrocnêmio vermelho.

Unidade	M. Gastrocnêmio Vermelho			
	CT	CC	Q	M
<b>CAT</b> (U/ g tecido)	$(2,0 \pm 0,6)10^4$	$(1,8 \pm 0,7)10^4$	$(1,9 \pm 0,8)10^4$	$(1,8 \pm 0,7)10^4$
<b>GR</b> (U/ g tecido)	$175 \pm 42$	$162 \pm 41$	$147 \pm 38$	$189 \pm 46$
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{M}$ )	$0,048 \pm 0,025$	$0,064 \pm 0,027$	$0,073 \pm 0,023$	$0,054 \pm 0,020$

Resultados apresentados em Med  $\pm$  DP. Anova One-way e pós teste de Tukey.

**Tabela 10.** Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutatona redutase (GR), peroxidação lipídica (TBARS) no homogenato do músculo plantar.

Unidade	M. Plantar			
	CT	CC	Q	M
<b>CAT</b> (U/ g tecido)	$137 \pm 47$	$138 \pm 45$	$195 \pm 70$	$205 \pm 50$
<b>GR</b> (U/ g tecido)	$2,1 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{M}$ )	$30,3 \pm 17,8$	$23,7 \pm 11,2$	$27,8 \pm 12,5$	$22,3 \pm 15,0$

Resultados apresentados em Med  $\pm$  DP. Anova One-way e pós teste de Tukey.

## 10. Referências Bibliográficas

- AEBI, H. (1984). Catalase invitro. — *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
- ALDERTON, W. K., COOPER, C. E. & KNOWLES, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. — *Biochem J* 357, 593-615.
- ALESSIO, H. M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. — *Med Sci Sports Exerc* 25, 218-24.
- ALESSIO, H. M., HAGERMAN, A. E., FULKERSON, B. K., AMBROSE, J., RICE, R. E. & WILEY, R. L. (2000). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. — *Med Sci Sports Exerc* 32, 1576-81.
- ALONSO, M. D., LOMAKO, J., LOMAKO, W. M. & WHELAN, W. J. (1995). A new look at the biogenesis of glycogen. — *FASEB J* 9, 1126-37.
- ALVES, A. A., PEREIRA DA SILVA, L., MACEDO, D. V. & KUBOTA, L. T. (2003). Amperometric sensor for glutathione reductase activity determination in erythrocyte hemolysate. — *Anal Biochem* 323, 33-8.
- ASHTON, T., YOUNG, I., PETERS, J., JONES, E., JACKSON, S., DAVIES, B. & ROWLANDS, C. (1999). Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. — *Journal of Applied Physiology* 87, 2032-2036.
- BAAR, K. (2004). Involvement of PPAR gamma co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR alpha in the adaptive response to endurance exercise. — *Proceedings of the Nutrition Society* 63, 269-273.
- BAILEY, D. M., WILLIAMS, C., BETTS, J. A., THOMPSON, D. & HURST, T. L. (2011). Oxidative stress, inflammation and recovery of muscle function after damaging exercise: effect of 6-week mixed antioxidant supplementation. — *Eur J Appl Physiol* 111, 925-36.
- BALON, T. W. & YERNENI, K. K. (2001). Redox regulation of skeletal muscle glucose transport. — *Med Sci Sports Exerc* 33, 382-5.
- BARREIROS, A., DAVID, J. & DAVID, J. (2006). Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. — *Quimica Nova* 29, 113-123.
- BENZIE, I. & STRAIN, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. — *Analytical Biochemistry* 239, 70-76.
- BERGSTRO, J., HERMANSE, L., HULTMAN, E. & SALTIN, B. (1967). Diet muscle glycogen and physical performance. — *Acta Physiologica Scandinavica* 71, 140-&.
- BIANCHI, M. D. L. P. & ANTUNES, L. M. G. (1999). Free Radicals and the main dietary antioxidants. — *Revista da Nutrição* 12, 123-130.
- BLOM, P., HOSTMARK, A., VAAGE, O., KARDEL, K. & MAEHLUM, S. (1987). Effect of different postexercise sugar diets on the rate of muscle glycogen-synthesis. — *Medicine and Science in Sports and Exercise* 19, 491-496.
- BOOTS, A., HAENEN, G. & BAST, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. — *European Journal of Pharmacology* 585, 325-337.

- BURKE, L., COLLIER, G., BEASLEY, S., DAVIS, P., PRICKER, P., HEELEY, P., WALDER, K. & HARGREAVES, M. (1995). Effect of coingestion of fat and protein with carbohydrate feedings on muscle glycogen-storage. — *Journal of Applied Physiology* 78, 2187-2192.
- CASEY, A., MANN, R., BANISTER, K., FOX, J., MORRIS, P., MACDONALD, I. & GREENHAFF, P. (2000). Effect of carbohydrate ingestion on glycogen resynthesis in human liver and skeletal muscle, measured by C-13 MRS. — *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 278, E65-E75.
- CLARKSON, P. (1995). Antioxidants and physical performance. — *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35, 131-141.
- COOMBES, J., ROWELL, B., DODD, S., DEMIREL, H., NAITO, H., SHANELY, R. & POWERS, S. (2002). Effects of vitamin E deficiency on fatigue and muscle contractile properties. — *European Journal of Applied Physiology* 87, 272-277.
- COSTILL, D. (1988). Carbohydrates for exercise - dietary demands for optimal performance. — *International Journal of Sports Medicine* 9, 1-18.
- COYLE, E. F. (2000). Physical activity as a metabolic stressor. — *Am J Clin Nutr* 72, 512S-20S.
- CRISWELL, D., POWERS, S., DODD, S., LAWLER, J., EDWARDS, W., RENSHLER, K. & GRINTON, S. (1993). High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. — *Med Sci Sports Exerc* 25, 1135-40.
- CURETON, K., TOMPOROWSKI, P., SINGHAL, A., PASLEY, J., BIGELMAN, K., LAMBOURNE, K., TRILK, J., MCCULLY, K., ARNAUD, M. & ZHAO, Q. (2009). Dietary quercetin supplementation is not ergogenic in untrained men. — *Journal of Applied Physiology* 107, 1095-1104.
- DAVIS, J., MURPHY, E. & CARMICHAEL, M. (2009a). Effects of the Dietary Flavonoid Quercetin Upon Performance and Health. — *Current Sports Medicine Reports* 8, 206-213.
- DAVIS, J., MURPHY, E., CARMICHAEL, M. & DAVIS, B. (2009b). Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. — *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 296, R1071-R1077.
- DECKER, E. (1997). Phenolics: Prooxidants or antioxidants? — *Nutrition Reviews* 55, 396-398.
- DEVI, S., PRATHIMA, S. & SUBRAMANYAM, M. (2003). Dietary vitamin E and physical exercise: I. Altered endurance capacity and plasma lipid profile in ageing rats. — *Experimental Gerontology* 38, 285-290.
- DORIA FILHO, U. (1999). *Introdução à bioestatística: Para simples mortais*. Ed. Elsevier. São Paulo.
- DUPOUY, V. M., FERRE, P. J., URO-COSTE, E. & LEFEBVRE, H. P. (2006). Time course of COX-1 and COX-2 expression during ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. — *J Appl Physiol* 100, 233-9.
- FAVIER, F. B., BENOIT, H. & FREYSSENET, D. (2008). Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. — *Pflugers Arch* 456, 587-600.
- FERRARESSO, R., DE OLIVEIRA, R., MACEDO, D., NUNES, L., BREZIKOFER, R., DAMAS, D. & HOHL, R. (2012). Interaction between Overtraining and the Interindividual Variability May (Not) Trigger Muscle Oxidative Stress and Cardiomyocyte Apoptosis in Rats. — *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

- FINAUD, J., LAC, G. & FILAIRE, E. (2006). Oxidative stress : relationship with exercise and training. — *Sports Med* 36, 327-58.
- FRANCO, G. (2001). *Tabela de Composição Química dos Alimentos*. 9a ed., São Paulo, Editora Atheneu.
- GANDRA, P. G., ALVES, A. A., MACEDO, D. V. D. & KUBOTA, L. T. (2004). Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. — *Química Nova* 27, 980-985.
- GANDRA, P. G., MACEDO, D. V. & ALVES, A. A. (2006). Fontes de espécies reativas de oxigênio na musculatura esquelética durante o exercício. — *Revista Brasileira de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular* 2, C.
- GANIO, M., ARMSTRONG, L., JOHNSON, E., KLAU, J., BALLARD, K., MICHNIAK-KOHN, B., KAUSHIK, D. & MARESH, C. (2010). Effect of quercetin supplementation on maximal oxygen uptake in men and women. — *Journal of Sports Sciences* 28, 201-208.
- GATÉ, L., PAUL, J., BA, G. N., TEW, K. D. & TAPIERO, H. (1999). Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. — *Biomed Pharmacother* 53, 169-80.
- GOMES, E. C., SILVA, A. N. & DE OLIVEIRA, M. R. (2012). Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. — *Oxid Med Cell Longev* 2012, 756132.
- GOMEZ-CABRERA, M. C., BORRÁS, C., PALLARDÓ, F. V., SASTRE, J., JI, L. L. & VIÑA, J. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. — *J Physiol* 567, 113-20.
- GOMEZ-CABRERA, M. C., DOMENECH, E., ROMAGNOLI, M., ARDUINI, A., BORRAS, C., PALLARDO, F. V., SASTRE, J. & VIÑA, J. (2008). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. — *Am J Clin Nutr* 87, 142-9.
- HALLIWELL, B. (2000). The antioxidant paradox. — *Lancet* 355, 1179-80.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. — Oxford, New York, USA.
- HANSEN, B., DERAIVE, W., JENSEN, P. & RICHTER, E. (2000). No limiting role for glycogen in determining maximal attainable glycogen levels in rat skeletal muscle. — *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 278, E398-E404.
- HARGREAVES, M., FINN, J., WITHERS, R., HALBERT, J., SCROOP, G., MACKAY, M., SNOW, R. & CAREY, M. (1997). Effect of muscle glycogen availability on maximal exercise performance. — *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* 75, 188-192.
- HAWLEY, J., HARGREAVES, M., ZIERATH, J. & WAGENMAKERS, A. (2006). Signalling mechanisms in skeletal muscle: Role in substrate selection and muscle adaptation. — *Essays in Biochemistry*, Vol 42 42, 1-12.
- HAYASHI, T., WOJTASZEWSKI, J. F. & GOODYEAR, L. J. (1997). Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. — *Am J Physiol* 273, E1039-51.

- HESSEL, E., HABERLAND, A., MÜLLER, M., LERCHE, D. & SCHIMKE, I. (2000). Oxygen radical generation of neutrophils: a reason for oxidative stress during marathon running? — *Clin Chim Acta* 298, 145-56.
- HILL, A., LONG, C. & LUPTON, H. (1924). Muscular exercise, lactic acid and the supply and utilisation of oxygen - Parts VII-VIII. — *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 97, 155-176.
- HOHL, R., FERRARESSO, R., DE OLIVEIRA, R., LUCCO, R., BREZIKOFER, R. & DE MACEDO, D. (2009). Development and Characterization of an Overtraining Animal Model. — *Medicine and Science in Sports and Exercise* 41, 1155-1163.
- HOLLOSZY, J. (2005). Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. — *Journal of Applied Physiology* 99, 338-343.
- HOPKINS, W. (2000). Measures of reliability in sports medicine and science. — *Sports Medicine* 30, 1-15.
- HOUSTIS, N., ROSEN, E. & LANDER, E. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. — *Nature* 440, 944-948.
- HUDSON, M. B., HOSICK, P. A., MCCAULLEY, G. O., SCHRIEBER, L., WRIEDEN, J., MCANULTY, S. R., TRIPLETT, N. T., MCBRIDE, J. M. & QUINDRY, J. C. (2008). The effect of resistance exercise on humoral markers of oxidative stress. — *Med Sci Sports Exerc* 40, 542-8.
- HULTMAN, E. (1967). Physiological role of muscle glycogen in man with special reference to exercise. — *Circulation Research* 20, 199-&.
- ICHIMORI, K., FUKAHORI, M., NAKAZAWA, H., OKAMOTO, K. & NISHINO, T. (1999). Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide - Nitric oxide converts reduced xanthine-oxidizing enzymes into the desulfo-type inactive form. — *Journal of Biological Chemistry* 274, 7763-7768.
- IVY, J. (1991). Muscle glycogen-synthesis before and after exercise. — *Sports Medicine* 11, 6-19.
- IVY, J. L. (1999). Role of carbohydrate in physical activity. — *Clin Sports Med* 18, 469-84, v.
- IVY, J. L. & KUO, C. H. (1998). Regulation of GLUT4 protein and glycogen synthase during muscle glycogen synthesis after exercise. — *Acta Physiol Scand* 162, 295-304.
- JACKSON, M. J. (1999). Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation? — *Proc Nutr Soc* 58, 673-6.
- JENKINS, R. R. (1988). Free radical chemistry. Relationship to exercise. — *Sports Med* 5, 156-70.
- JENTJENS, R. & JEUKENDRUP, A. (2003). Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. — *Sports Medicine* 33, 117-144.
- JESINA, P., KHOLOVÁ, D., BOLEHOVSKÁ, R., CERVINKOVÁ, Z., DRAHOTA, Z. & HOUSTEK, J. (2004). Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by rat liver mitochondria. — *Physiol Res* 53, 305-10.
- Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. — *Proc Soc Exp Biol Med* 222, 283-92.

- Ji, L. L. (2002). Exercise-induced modulation of antioxidant defense. — *Ann N Y Acad Sci* 959, 82-92.
- Ji, L. L. (2007). Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. — *Exp Gerontol* 42, 582-93.
- Ji, L. L. (2008). Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. — *Free Radic Biol Med* 44, 142-52.
- Ji, L. L., DILLON, D. & WU, E. (1990). Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. — *Am J Physiol* 258, R918-23.
- JOYEUX, M., MORTIER, F. & FLEURENTIN, J. (1995). Screening of antiradical, antilipoperoxidant and hepatoprotective effects of 9 plant-extracts used in caribbean folk medicine. — *Phytotherapy Research* 9, 228-230.
- KOHEN, R. & NYSKA, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. — *Toxicol Pathol* 30, 620-50.
- LAMPRECHT, M., GREILBERGER, J. & OETTL, K. (2004). Analytical aspects of oxidatively modified substances in sports and exercises. — *Nutrition* 20, 728-30.
- LIU, J., YEO, H. C., OVERVIK-DOUKI, E., HAGEN, T., DONIGER, S. J., CHYU, D. W., BROOKS, G. A., AMES, B. N. & CHU, D. W. (2000). Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. — *J Appl Physiol* 89, 21-8.
- LO, S., RUSSELL, J. & TAYLOR, A. (1970). Determination of glycogen in small tissue samples. — *Journal of Applied Physiology* 28, 234-&.
- LOMAKO, J., LOMAKO, W. & WHELAN, W. (1990). The nature of the primer for glycogen-synthesis in muscle. — *Febs Letters* 268, 8-12.
- LOMAKO, J. (1991). Proglycogen - a low-molecular-weight form of muscle glycogen. — *Febs Letters* 279, 223-228.
- LOMAKO, J., LOMAKO, W., WHELAN, W., DOMBRO, R., NEARY, J. & NORENBORG, M. (1993). Glycogen-synthesis in the astrocyte - from glycogenin to proglycogen to glycogen. — *Faseb Journal* 7, 1386-1393.
- MACHADO, E.F.A. Suplementação com caldo de cana de açúcar comparado a outros carboidratos na reposição do glicogênio e cinética de biomarcadores pós-exercício agudo em ratos. *Tese de Mestrado*, 2009.
- MARSHALL, R., SCOTT, K., HILL, R., LEWIS, D., SUNDSTROM, D., JONES, G. & HARPER, J. (2002). Supplemental vitamin C appears to slow racing greyhounds. — *Journal of Nutrition* 132, 1616S-1621S.
- MARZATICO, F., PANSARASA, O., BERTORELLI, L., SOMENZINI, L. & DELLA VALLE, G. (1997). Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. — *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 37, 235-239.
- MAURÍCIO DUARTE-ALMEIDA, J., NOVOA, A. V., LINARES, A. F., LAJOLO, F. M. & INÉS GENOVESE, M. (2006). Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. — *Plant Foods Hum Nutr* 61, 187-92.

- MCANULTY, S. R., HOSICK, P. A., MCANULTY, L. S., QUINDRY, J. C., STILL, L., HUDSON, M. B., DIBARNARDI, A. N., MILNE, G. L., MORROW, J. D. & AUSTIN, M. D. (2007). Effect of pharmacological lowering of plasma urate on exercise-induced oxidative stress. — *Appl Physiol Nutr Metab* 32, 1148-55.
- MCARDLE, F., PATTWELL, D. M., VASILAKI, A., MCARDLE, A. & JACKSON, M. J. (2005). Intracellular generation of reactive oxygen species by contracting skeletal muscle cells. — *Free Radic Biol Med* 39, 651-7.
- MCGILL, R., TUKEY, J. & LARSEN, W. (1978). Variations of box plots. — *American Statistician* 32, 12-16.
- MC EWEN, B. S. (1998). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. — *Ann N Y Acad Sci* 840, 33-44.
- MEILHAC, O., RAMACHANDRAN, S., CHIANG, K., SANTANAM, N. & PARTHASARATHY, S. (2001). Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. — *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 21, 1681-1688.
- MEISTER, A. (1983). Selective modification of glutathione metabolism. — *Science* 220, 472-7.
- MELLO, L., ALVES, A., MACEDO, D. & KUBOTA, L. (2005). Peroxidase-based biosensor as a tool for a fast evaluation of antioxidant capacity of tea. — *Food Chemistry* 92, 515-519.
- MIYAZAKI, H., OH-ISHI, S., OOKAWARA, T., KIZAKI, T., TOSHINAI, K., HA, S., HAGA, S., JI, L. L. & OHNO, H. (2001). Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. — *Eur J Appl Physiol* 84, 1-6.
- NADER, G. A. & ESSER, K. A. (2001). Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. — *J Appl Physiol* 90, 1936-42.
- NIEMAN, D., WILLIAMS, A., SHANELY, R., JIN, F., MCANULTY, S., TRIPLETT, N., AUSTIN, M. & HENSON, D. (2010). Quercetin's Influence on Exercise Performance and Muscle Mitochondrial Biogenesis. — *Medicine and Science in Sports and Exercise* 42, 338-345.
- NIKOLAIDIS, M. G., KYPAROS, A., SPANOU, C., PASCHALIS, V., THEODOROU, A. A. & VRABAS, I. S. (2012). Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues. — *J Exp Biol* 215, 1615-25.
- NIKOLAIDIS, M. G., PASCHALIS, V., GIAKAS, G., FATOUROS, I. G., KOUTEDAKIS, Y., KOURETAS, D. & JAMURTAS, A. Z. (2007). Decreased blood oxidative stress after repeated muscle-damaging exercise. — *Med Sci Sports Exerc* 39, 1080-9.
- NORMAND, A.C.R. Comparação do efeito ergogênico do caldo de cana e da maltodextrina na reposição das reservas de glicogênio muscular e hepático na recuperação de exercícios exaustivos. *Iniciação Científica*. SAE/Unicamp (08/2006 à 07/2007).
- NORMAND, A., MACHADO, E., NUNES, L., BREZIKOFER, R. & MACEDO, D. (2009). Effects of different general anesthetics on serum hemolysis and hepatic and muscular glycogenolysis in rats. — *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42, 1035-1038.
- NOVELLI, G., BRACCIOTTI, G. & FALSINI, S. (1990). Spin-trappers and vitamin-e prolong endurance to muscle fatigue in mice. — *Free Radical Biology and Medicine* 8, 9-13.

- NUNES, L. A. S., LAZARIM, F. L., BREZIKOFER, R., MACEDO, D.V. (2012). Applicability of the Reference Interval and Reference Change Value of Hematological and Biochemical Biomarkers to Sport Science. — *Sports Medicine and Sports Injury* chapter 4.
- OH, H., LIM, S., LEE, J., KIM, D., ANN, E. & YOON, S. (2007). A combination of soy isoflavone supplementation and exercise improves lipid profiles and protects antioxidant defense-systems against exercise-induced oxidative stress in ovariectomized rats. — *Biofactors* 29, 175-185.
- OHKAWA, H., OHISHI, N. & YAGI, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. — *Anal Biochem* 95, 351-8.
- PADILLA, J. & MICKLEBOROUGH, T. D. (2007). Does antioxidant supplementation prevent favorable adaptations to exercise training? — *Med Sci Sports Exerc* 39, 1887; author reply 1888.
- PANZA, V., WAZLAWIK, E., SCHUETZ, G., COMIN, L., HECHT, K. & DA SILVA, E. (2008). Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. — *Nutrition* 24, 433-442.
- PASSONNE, J.V. & LAUDERDA, V.R. (1974). Comparison of 3 methods of glycogen measurement in tissues. — *Analytical Biochemistry* 60, 405-412.
- PATTWELL, D. M., PATWELL, D. M., MCARDLE, A., MORGAN, J. E., PATRIDGE, T. A. & JACKSON, M. J. (2004). Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. — *Free Radic Biol Med* 37, 1064-72.
- PEAKE, J., SUZUKI, K. & COOMBES, J. (2007). The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and the relationship to oxidative stress after exercise. — *Journal of Nutritional Biochemistry* 18, 357-371.
- PETIBOIS, C., CAZORLA, G., POORTMANS, J. R. & DÉLÉRIS, G. (2003). Biochemical aspects of overtraining in endurance sports : the metabolism alteration process syndrome. — *Sports Med* 33, 83-94.
- POWERS, S. & JACKSON, M. (2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. — *Physiological Reviews* 88, 1243-1276.
- POWERS, S. K., DERUISSEAU, K. C., QUINDRY, J. & HAMILTON, K. L. (2004). Dietary antioxidants and exercise. — *J Sports Sci* 22, 81-94.
- POWERS, S. K., Ji, L. L. & LEEUWENBURGH, C. (1999). Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. — *Med Sci Sports Exerc* 31, 987-97.
- POWERS, S. K., NELSON, W. B. & HUDSON, M. B. (2011). Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. — *Free Radic Biol Med* 51, 942-50.
- PRADA, F., VOLTARELLI, F., OLIVEIRA, C., GOBETTO, C., MACEDO, D. & MELLO, M. (2004). Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. — *Revista Brasileira de Ciência e Movimento* 12, 29-34.
- PRICE, T., LAURENT, D., PETERSEN, K., ROTHMAN, D. & SHULMAN, G. (2000). Glycogen loading alters muscle glycogen resynthesis after exercise. — *Journal of Applied Physiology* 88, 698-704.
- QUINDRY, J. C., McANULTY, S. R., HUDSON, M. B., HOSICK, P., DUMKE, C., McANULTY, L. S., HENSON, D., MORROW, J. D. & NIEMAN, D. (2008). Oral quercetin supplementation and blood oxidative

- capacity in response to ultramarathon competition. — *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 18, 601-16.
- QUINDRY, J. C., STONE, W. L., KING, J. & BROEDER, C. E. (2003). The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. — *Med Sci Sports Exerc* 35, 1139-45.
- RADAK, Z., CHUNG, H. Y. & GOTO, S. (2005). Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. — *Biogerontology* 6, 71-5.
- RAMIRES, P. & JI, L. (2001). Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. — *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281, H679-H688.
- REID, M. (1996). Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. — *News in Physiological Sciences* 11, 114-119.
- REID, M. (2001). Invited Review: Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. — *Journal of Applied Physiology* 90, 724-731.
- REID, M., DURHAM, W. & HARMAN, D. (2002). Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle - Potential impact on aging. — *Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process* 959, 108-116.
- REID, M. B. (1998). Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. — *Acta Physiol Scand* 162, 401-9.
- RISTOW, M., ZARSE, K., OBERBACH, A., KLÖTING, N., BIRNINGER, M., KIEHNTOFF, M., STUMVOLL, M., KAHN, C. R. & BLÜHER, M. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8665-70.
- ROMIJN, J., COYLE, E., SIDOSSIS, L., GASTALDELLI, A., HOROWITZ, J., ENDERT, E. & WOLFE, R. (1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate-metabolism in relation to exercise intensity and duration. — *American Journal of Physiology* 265, E380-E391.
- RYAN, M., DUDASH, H., DOCHERTY, M., GERONILLA, K., BAKER, B., HAFF, G., CUTLIP, R. & ALWAY, S. (2010). Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. — *Experimental Gerontology* 45, 882-895.
- SANTOS-SILVA, A., REBELO, M. I., CASTRO, E. M., BELO, L., GUERRA, A., REGO, C. & QUINTANILHA, A. (2001). Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. — *Clin Chim Acta* 306, 119-26.
- SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. 3 Edição, 2009.
- SEN, C. & ROY, S. (2005). Relief from a heavy heart: redox-sensitive NF-kappa B as a therapeutic target in managing cardiac hypertrophy. — *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289, H17-H19.
- SEN, C. K. (2001). Antioxidants in exercise nutrition. — *Sports Med* 31, 891-908.
- SIES, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. — *Eur J Biochem* 215, 213-9.
- SILVA, F. O. C., MACEDO, D. V. (2011). Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. — *Rev Bras Cineantropon Desempenho Hum* 13(4):320-328.

- SILVEIRA, L. R., PEREIRA-DA-SILVA, L., JUEL, C. & HELLSTEN, Y. (2003). Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. — *Free Radic Biol Med* 35, 455-64.
- SMITH, I., VIEHELLER, T. & THORNE, C. (1988). Assay of glutathione-reductase in crude tissue-homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). — *Analytical Biochemistry* 175, 408-413.
- SMITH, M. A. & REID, M. B. (2006). Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. — *Respir Physiol Neurobiol* 151, 229-41.
- STANCANELLI, M. Efeito ergogênico do caldo de cana. *Tese de Mestrado*, 2006.
- ST-PIERRE, J., DRORI, S., ULDRY, M., SILVAGGI, J. M., RHEE, J., JÄGER, S., HANDSCHIN, C., ZHENG, K., LIN, J., YANG, W., SIMON, D. K., BACHOO, R. & SPIEGELMAN, B. M. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. — *Cell* 127, 397-408.
- SUPINSKI, G. (1998). Free radical induced respiratory muscle dysfunction. — *Mol Cell Biochem* 179, 99-110.
- TAULER, P., AGUILÓ, A., GIMENO, I., FUENTESPINA, E., TUR, J. A. & PONS, A. (2006). Response of blood cell antioxidant enzyme defences to antioxidant diet supplementation and to intense exercise. — *Eur J Nutr* 45, 187-95.
- TAULER, P., AGUILÓ, A., GUIX, P., JIMÉNEZ, F., VILLA, G., TUR, J. A., CÓRDOVA, A. & PONS, A. (2005). Pre-exercise antioxidant enzyme activities determine the antioxidant enzyme erythrocyte response to exercise. — *J Sports Sci* 23, 5-13.
- TAULER, P., GIMENO, I., AGUILÓ, A., GUIX, M. P. & PONS, A. (1999). Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activities in athletes during competition and short-term recovery. — *Pflugers Arch* 438, 782-7.
- TAYLOR, R. P. & STARNES, J. W. (2003). Age, cell signalling and cardioprotection. — *Acta Physiol Scand* 178, 107-16.
- TAYSI, S., OZTASAN, N., EFE, H., POLAT, M., GUMUSTEKIN, K., SIKTAR, E., CANAKCI, E., AKCAY, F., DANE, S. & GUL, M. (2008). Endurance training attenuates the oxidative stress due to acute exhaustive exercise in rat liver. — *Acta Physiologica Hungarica* 95, 337-347.
- TRETTER, L. & ADAM-VIZI, V. (2004). Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. — *J Neurosci* 24, 7771-8.
- UCHIYAMA, M. & MIHARA, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. — *Analytical Biochemistry* 86, 271-278.
- VIITALA, P. E., NEWHOUSE, I. J., LAVOIE, N. & GOTTARDO, C. (2004). The effects of antioxidant vitamin supplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. — *Lipids Health Dis* 3, 14.
- WADLEY, G. D. & MCCONELL, G. K. (2010). High-dose antioxidant vitamin C supplementation does not prevent acute exercise-induced increases in markers of skeletal muscle mitochondrial biogenesis in rats. — *J Appl Physiol* 108, 1719-26.
- WANG, L., ZHANG, H., LU, R., ZHOU, Y., MA, R., LV, J., LI, X., CHEN, L. & YAO, Z. (2008). The decapeptide CMS001 enhances swimming endurance in mice. — *Peptides* 29, 1176-1182.

- WILMS, L., HOLLMAN, P., BOOTS, A. & KLEINJANS, J. (2005). Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. — *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 582, 155-162.
- YAGI, K. (1987). Lipid peroxides and human diseases. — *Chem Phys Lipids* 45, 337-51.
- YFANTI, C., AKERSTRÖM, T., NIELSEN, S., NIELSEN, A. R., MOUNIER, R., MORTENSEN, O. H., LYKKESFELDT, J., ROSE, A. J., FISCHER, C. P. & PEDERSEN, B. K. (2010). Antioxidant supplementation does not alter endurance training adaptation. — *Med Sci Sports Exerc* 42, 1388-95.
- YU, F., LIU, Y., CUI, Y., CHAN, E., XIE, M., MCGUIRE, P. & YU, F. (2010). Effects of a Flavonoid Extract from *Cynomorium songaricum* on the Swimming Endurance of Rats. — *American Journal of Chinese Medicine* 38, 65-73.
- ZAIDI, S. M., AL-QIRIM, T. M. & BANU, N. (2005). Effects of antioxidant vitamins on glutathione depletion and lipid peroxidation induced by restraint stress in the rat liver. — *Drugs R D* 6, 157-65.