

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

KELL GRANDJEAN DA COSTA

**INTRODUÇÃO AO MÉTODO CIENTÍFICO EM EDUCAÇÃO
FÍSICA ATRAVÉS DE UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM
LABORATÓRIO**

Campinas, 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

KELL GRANDJEAN DA COSTA

**INTRODUÇÃO AO MÉTODO CIENTÍFICO EM EDUCAÇÃO
FÍSICA ATRAVÉS DE UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM
LABORATÓRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Graduação da Faculdade de Educação Física da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Bacharel em Educação Física.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Lorenzi Lazarim

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR ANDRÉIA DA SILVA MANZATO – CRB8/7292
BIBLIOTECA “PROFESSOR ASDRÚBAL FERREIRA BATISTA”
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA - UNICAMP

C823i Costa, Kell Grandjean da, 1985-
Introdução ao método científico em educação física através de um estudo experimental em laboratório / Kell Grandjean da Costa. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Fernanda Lorenzi Lazarim.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas.

1. Método científico. 2. Treinamento de endurance. 3. Suplementação. 4. Estresse oxidativo. 5. Fígado. I. Lazarim, Fernanda Lorenzi. II. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Educação Física. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Introduction to the scientific method in physical education through na experimental study in laboratory.

Palavras-chaves em inglês:

Scientific method
Endurance training
Supplementation
Oxidative stress
Liver

Titulação: Bacharel em Educação Física

Banca examinadora:

Fernanda Lorenzi Lazarim [orientador]
Armindo Antonio Alves

Data da defesa: 06-12-2011

Dedicatória

Aos meus pais Vivaldo Fernando da Costa e Dorthé
Grandjean da Costa meu porto seguro e fonte de
sabedoria. Meus irmãos e família.

Agradecimentos

Agradeço a Prof. Dra. Fernanda Lorenzi Lazarim que orientou e apoiou o desenvolvimento deste trabalho e da iniciação científica, sempre receptiva e rigorosa nos momentos necessários. Ao Prof. Dr. Rodrigo Hohl que me orientou no início da iniciação científica e me introduziu para o mundo da ciência. Ao Prof. Dr. Armindo Alves banca do TCC por se disponibilizar para discutir o trabalho. Aos professores Rodrigo Ferraresso, Renato Buscariolli de Oliveira e Rafael Alkmin por estarem sempre disponíveis quando preciso e pelas discussões nos encontros filosóficos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. A todo o grupo do LABEX (Laboratório de Bioquímica do Exercício) fonte de muitas amizades. Ao Prof.Dr. René Brenzikofer que elaborou o modelo de método científico que orientou o desenvolvimento deste trabalho, e me orienta em diversas outras áreas que compõe o universo de conhecimento do ser humano. E em especial agradeço a Prof. Dra. Denise Vaz de Macedo que foi quem me inseriu no campo da pesquisa e ensino, e propiciou o conhecimento de todas as pessoas citadas acima.

Agradeço a Faculdade de Educação Física da UNICAMP e professores pela formação e recepção ao ambiente universitário, e que ela continue contribuindo para a formação de profissionais críticos e competentes .

Agradeço a todos os amigos feitos durante a faculdade em especial para os do ano de 2007!! Pelas festas, churrascos, jogos, estudos e discussões!! A todos os alunos de monitoria de Bioquímica do Exercício que contribuíram para meu crescimento frente ao ensino. Ao grupo de amigos de Barão Geraldo, os “*Soviéticos*”, por serem meu ambiente de descontração, diversão, e amizades!

E agradeço aos animais que fizeram parte deste estudo por doarem suas vidas para o bem da ciência.

COSTA, K.G.. 2011. **Introdução ao método científico em educação física através de um estudo experimental em laboratório**. 2011.Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

RESUMO

A Educação Física é um campo da ciência influenciado por conhecimentos tanto da área biológica quanto da área humana. Em ambas as áreas, o método científico pode ser adotado como caminho para gerar o conhecimento de forma sólida e com uma análise crítica. O objetivo do presente trabalho foi apresentar a utilização do método científico através de um estudo experimental em laboratório contribuindo para o crescimento científico na área da Educação Física. O método científico descrito apresenta dois caminhos: vertente analítica, na qual a partir do conhecimento prévio sobre o fenômeno a ser estudado é proposto um modelo e hipóteses de trabalho; e vertente empírica, na qual o modelo é testado para a obtenção dos dados. Os resultados obtidos são confrontados com o modelo proposto para afirmar ou não as hipóteses levantadas. O estudo experimental apresentado enquadra-se na área da ciência básica, no qual o fenômeno foi investigado em modelo animal. O fenômeno estudado é o estresse oxidativo em fígado de ratos suplementados com caldo de cana submetidos a um protocolo de endurance. A análise da atividade das enzimas antioxidantes (Catalase e Glutathione Redutase) e a Peroxidação Lipídica (TBARs) foram os métodos aplicados para verificação. Todos os animais submetidos ao treino aumentaram significativamente o desempenho quando comparado ao grupo controle. Não houve diferenças entre os grupos CT, TQ, TCC, TM. Observamos uma diminuição significativa na atividade da CAT nos grupos treinados e suplementados quando comparado ao grupo controle sedentário. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para a atividade da GR e para as concentrações de TBARs. Embora a hipótese de trabalho não tenha sido confirmada, ficou evidente a contribuição do método científico para o desenvolvimento do estudo permitindo que uma nova informação fosse extraída atingindo o objetivo da ciência de gerar conhecimento bem como perspectivas para futuras investigações.

Palavras-chaves: método científico, estudo experimental em laboratório, treino de endurance, suplementação, estresse oxidativo, fígado, ratos.

COSTA, K.G. 2011. **Introduction to the scientific method in physical education through an experimental study in laboratory.** 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

ABSTRACT

Physical education is a science field influenced by knowledge of both the biological and human area. In both areas, the scientific method can be adopted as a way to build a solid knowledge with a critical analysis. The goal of this study was to present the use of the scientific method through an experimental study in the laboratory contributing to the scientific growth in the area of physical education. The scientific method has described two ways: analytical aspects, in which from previous knowledge about the phenomenon being studied is proposed a model and working hypotheses, and empirical aspects, in which the model is tested to obtain the data. The results are compared with the model proposed to affirm or not the hypotheses. The experimental study presented is classified as basic science, in which the phenomenon was investigated in an animal model. The phenomenon studied was the oxidative stress in liver of rats supplemented with sugar cane juice submitted to an endurance protocol. The methods used for verification were the analysis of antioxidant enzymes activity (catalase and glutathione reductase) and lipid peroxidation (TBARs). All animals submitted to training significantly increased performance when compared to control. There were no differences between groups TC, TQ, TCC, TM. We observed a significant decrease in CAT activity in trained and supplemented groups compared to sedentary control group. There were no significant differences between groups for the activity of GR and the concentrations of TBARs. Although the working hypothesis has not been confirmed, it became clear the contribution of the scientific method to the study development enabling that a new information to be extracted and achieving the science goal that is to generate knowledge and perspectives for future investigations.

Keywords: scientific method, experimental study in the laboratory, endurance training, supplementation, oxidative stress, liver, rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação simplificada do método científico	18
Figura 2 - Representação completa do ciclo do método científico	19
Figura 3 - Ilustração da Cadeia de Transporte de Elétrons (CTE) e produção de Eros	24
Figura 4 - Mecanismos de defesa antioxidante	25
Figura 5 - Curva Padrão para a Catalase	35
Figura 6 - Curva Padrão para a Glutathiona Redutase	37
Figura 7 - Curva Padrão com diferentes concentrações de TEP e diferentes volumes de amostras de fígado	39
Figura 8 - Figuras representativas de gráficos hipotéticos de Boxplot	40
Figura 9 - Desempenho ao longo das 9 semanas de treino	41
Figura 10- Atividade da enzima catalase	42
Figura 11- Atividade da enzima glutathiona redutase	44
Figura 12 - Concentração de TBARs	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

TBARS	Ácido Tiobarbitúrico
EROs	Especies Reativas de Oxigênio
ATP	Adenosina Trifosfato
$O_2^{\cdot -}$	Ânion Superóxido
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
OH^{\cdot}	Radical Hidroxila
ADN	Ácido desoxiribonucleico
MDA	Malondialdeído
CAT	Catalase
GR	Glutathiona Redutase
SOD	Superóxido Dismutase
GPX	Glutathiona Peroxidase
GSH	Glutathiona Reduzida
GSSG	Glutathiona Oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
CT	Controle Treinado
TQ	Treinado suplementado com Quercetina
TCC	Treinado suplementado com caldo-de-cana
TM	Treinado suplementado com maltodextrina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
K_2HPO_4	Fosfato monobásico de potássio
PMSF	Fenilmetilsulfonil
DP	Desvio-Padrão
CV	Coefficiente de Variação
R	Índice de correlação
P	Índice de significância
TNB	2-nitro-5-mercapto-benzóico
DNTB	5, 5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
TEP	Tetraetoxipropano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. METODOLOGIA E CONTEXTUALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	14
3. MÉTODO CIENTÍFICO E O ESQUEMA DO MÉTODO	15
3.1. Esquema do Método Científico	18
3.1.1. Vertente Analítica.....	19
3.1.2. Vertente Empírica.....	20
3.1.3 Confronto/Avaliação	21
4. ESQUEMA DO MÉTODO CIENTÍFICO NO ESTUDO EXPERIMENTAL	23
4.1. Introdução: Entendendo o fenômeno.....	23
4.1.1 Fígado e Estresse Oxidativo.	26
4.1.2. Exercício e Suplementação.....	27
4.2. Objetivo: Construção do modelo e Hipótese.....	28
4.3. Materiais e Métodos: Planejamento e Otimização do experimento.	29
4.3.1. Animais.....	29
4.3.2. Adaptação à Esteira Rolante.....	30
4.3.3. Protocolo de Treinamento	30
4.3.4. Desempenho dos Animais	31
4.3.5. Suplementação.....	32
4.3.6. Coleta dos Tecidos	32
4.3.7. Padronização dos Procedimentos Experimentais: Análise de confiança das técnicas.	33
4.3.8. Determinação da Atividade da Catalase (CAT)	34
4.3.9. Glutathione Redutase (GR)	36
4.3.10. Cálculo da Atividade das Enzimas CAT e GR.....	38
4.3.11. Peroxidação Lipídica (TBARs)	38
4.3.12. Análise Estatística.....	39
4.4. Resultados: apresentação dos dados gerados.....	41
4.4.1. Desempenho dos animais ao longo do protocolo de treinamento.	41
4.4.2. Atividade das Enzimas Antioxidantes	42
4.4.3. Peroxidação Lipídica	43
4.5. Discussão: Confronto dos resultados com a previsão do modelo.	44
4.6. Conclusão: Gerando a nova informação.....	47
5. CONCLUSÃO DO TRABALHO	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

A Educação Física é um campo do saber influenciado por conhecimentos tanto da área biológica quanto da área humana sendo assim extremamente amplo o campo de atuação deste profissional na sociedade.

O educador físico tem a possibilidade de atuar desde a formação humana básica uma vez que a educação física é disciplina integrante da grade curricular nas escolas, assim como no planejamento do treinamento de atletas de alto rendimento das diversas modalidades esportivas que representarão o país em competições mundiais. Além disto, cabe aos profissionais de educação física a atuação em grupos multidisciplinares para promoção da saúde através de atividades físicas programadas, atividades recreacionais e de lazer.

A busca pela saúde e bem estar tem crescido atualmente pelo fato de nas últimas décadas a população mundial ter se abdicado da prática de regular de exercícios elevando os índices de sedentarismo e doenças relacionadas. A atividade física como ferramenta para promoção da saúde, ou mesmo para melhora de desempenho, deve ser feita de maneira sistematizada, programada, baseada no princípios do treinamento e/ou fisiológicos, bioquímicos do organismo (BOMPA, 2001; MCARDLE, 2008). Controlando as variáveis do treinamento (volume e intensidade) e entendendo a resposta fisiológica do organismo frente ao estímulo proposto, o profissional é capaz de planejar a atividade física de acordo com objetivos específicos do indivíduo ou grupo com qual está trabalhando. Nesse contexto fica evidente a contribuição da área biológica e uma metodologia de treino a ser seguida para se atingir os efeitos positivos do exercício sobre a saúde e performance.

Ao mesmo tempo, o programa de atividades a ser planejado também é influenciado pelo ambiente cultural e social em que o indivíduo ou grupo está inserido. “A tentativa de vários estudiosos da área de educação física parece ter sido compreender as manifestações corporais humanas sob uma perspectiva cultural, contextualizando o indivíduo em seu próprio meio” (DAOLIO, 2006, p. 91). Neste contexto, fica evidente a importância da área de humanas para se propor um programa de atividades que busque a socialização e que faça parte da realidade cultural a qual o indivíduo pertence.

Notamos que a Educação Física trabalha com as manifestações corporais tanto dentro um contexto biológico quanto humano. Contudo, o fenômeno atividade física é um só que na verdade está sendo observado e interpretado sob pontos de vistas diferentes. Segundo Brenzikofer (1997), o universo e a natureza fazem parte de um todo, as sucessivas

divisões em áreas distintas de conhecimento, são frutos das dificuldades encontradas pelo homem em entender a natureza (ou mesmo o próprio homem) como um todo.

Daolio (2006) considera que esta dicotomia entre biológicas e humanas ou biológico e cultural, se deve ao fato destas áreas serem, por tradição na educação física, tratadas em oposição. “ Quando se fala do físico, do aspecto inato ou da sua natureza, quase sempre está se referindo ao nível biológico. E quando se fala de educação, ou do aspecto adquirido, refere-se ao nível sociocultural”(DAOLIO, 2006, p.64). No entanto elas devem ser vistas como parte de um todo que compõe o ser humano, no qual uma complementa e interfere na outra.

O homem tem sido objeto de estudo de inúmeras áreas científicas. Como exemplos reconhecemos a antropologia, psicologia, sociologia, anatomia, fisiologia, entre outras, que tem o objetivo de entender o homem, tanto em relação a sua constituição física quanto ao seu comportamento com a natureza. (DEPRÁ, 1998, p.1)

Entendendo o homem como objeto de estudo da Educação Física através de diferentes áreas do conhecimento e a Educação Física como uma área da ciência, a compreensão dos fenômenos relacionados ao homem durante a prática da atividade física é de extrema importância para consolidação do conhecimento científico nesta área.

A produção do conhecimento ocorre através da ciência. “A ciência tem como objetivo gerar conhecimento para melhor entender e interpretar os fenômenos manifestados pela natureza. O caminho comum para chegar a isso é o método científico” (DEPRÁ, 1998).

O método científico, no qual método (do grego métodos, caminho para chegar ao fim), incorpora um conjunto de regras, observações, técnicas, instrumentos, procedimentos, ferramentas, entre outros, que quando organizados em um esquema lógico e uma linguagem específica orientam o pesquisador a compreender um problema ou testar uma hipótese sobre determinado fenômeno, gerando o conhecimento científico (GEWANDSZNADJER, 1989; HEGENBERG, 1976; BREZIKOFER, 1998).

Dentro da ciência, segundo o filósofo Mario Bunge, existe diferença entre ciência básica, ciência aplicada e tecnologia. A ciência básica busca aumentar nossos conhecimentos sobre leis da natureza, mesmo que estes conhecimentos sejam aparentemente desprovidos de uma aplicação imediata. Já a ciência aplicada procura compreender os fenômenos mais específicos, que possam ter uma utilidade prática imediata. Enquanto a tecnologia se utiliza tanto do conhecimento comum quanto dos conhecimentos obtidos na pesquisa básica ou aplicada, para criar novos artefatos ou produtos para melhorar a produção,

modificar o ambiente ou organizar as atividades humanas (GEWANDSZNADJER, 1989).

O Laboratório de Bioquímica do Exercício (LABEX), do qual faço parte, tem como objetivo a produção do conhecimento científico através da pesquisa básica e aplicada na área da educação física, no qual o conhecimento adquirido em modelo animal e humano estão em constante diálogo. Todo conhecimento produzido é transposto para sociedade através de metodologias de ensino-aprendizagem, ministradas na disciplina de Bioquímica do Exercício para os alunos de primeiro ano do curso educação física da Unicamp, e também para diferentes profissionais da área da saúde no curso de especialização em Bioquímica, Fisiologia, Treinamento e Nutrição Esportiva. A transmissão deste conhecimento torna estes profissionais mais capacitados para atender a população e promover sua saúde por meio da atividade física assim como buscar o alto rendimento de atletas reforçando o papel da Universidade como fonte de produção de conhecimento para o bem estar e crescimento da sociedade.

Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho é apresentar a utilização do método científico através de um estudo experimental em laboratório contribuindo para o crescimento científico na área da Educação Física e portanto influenciando o dia-a-dia destes profissionais no desenvolvimento de um trabalho de melhor qualidade para a promoção da saúde e melhora da performance em praticantes de atividade física e atletas.

2 METODOLOGIA E CONTEXTUALIZAÇÃO DO ESTUDO

O trabalho está dividido duas em partes:

1º Método Científico e o Esquema do Método.

2º Esquema do Método Científico no Estudo Experimental.

Em “**Método Científico e o Esquema do Método**” será discutido o contexto histórico de como surgiu o método científico e suas propriedades segundo alguns pensadores da área. Será descrito o esquema do método proposto por Brenzikofer (1998) desenvolvido para curso de graduação no Instituto de Física “Gleb Wataghin” da Universidade Estadual da Campinas (Unicamp). O modelo apresenta o método de forma didática, facilitando o desenvolvimento do estudo e a compreensão das etapas da investigação científica.

Em “**Esquema do Método Científico no Estudo Experimental**” o objetivo é demonstrar como a utilização do método científico orientou o desenvolvimento, análise, interpretação e aprendizado do pesquisador (naquele momento aluno de iniciação científica) através do estudo experimental. Entende-se por estudo experimental um conhecimento adquirido fixando, manipulando e introduzindo variáveis no objeto de estudo, que pela sua característica não permite a interpretação do fenômeno apenas por uma via teórica, mas são necessárias também medições e dados obtidos empiricamente para gerar uma interpretação (BRENZIKOFER, 1998).

O estudo experimental que será apresentado enquadra-se no contexto da ciência básica, no qual será investigado a ocorrência de um fenômeno em modelo animal, com o intuito de adquirir conhecimento para posteriormente ser transposto para aplicação em humanos. O fenômeno investigado é o estresse oxidativo em fígado de ratos suplementados com caldo de cana submetidos a um protocolo de endurance. A análise da atividade das enzimas antioxidantes (Catalase e Glutathione Redutase) e a Peroxidação Lipídica (TBARs) são os métodos para sua verificação.

3 MÉTODO CIENTÍFICO E O ESQUEMA DO MÉTODO

Desde a primeira vez que o homem, nos seus primórdios na Terra, acendeu a primeira fogueira, olhou para o céu estrelado para fora de sua caverna ou assistiu a fúria de uma tempestade, ele se questionou sobre a origem e funcionamento dos fenômenos manifestados pela natureza.

O homem é um animal curioso e inteligente, que tem necessidade de explorar seu ambiente, resolver problemas, explicar fenômenos. Ele tem sede de saber, de compreender tanto o universo quanto a si próprio (GEWANDSZNADJER, 1989, p.3).

Nas civilizações mais antigas encontramos atribuições de deuses e histórias mitológicas para estes fenômenos na tentativa de explica-los. Os feiticeiros ou Xamãs das tribos e civilizações eram aqueles incumbidos de interpretar os fenômenos da natureza. Muitas vezes os faziam através de explicações divinas, e eram pouco contestados. Enquanto outras figuras como os artesãos, eram responsáveis em produzir artefatos para facilitar a vida do homem. Faziam isso principalmente pela tentativa e erro não se preocupando com a interpretação dos fatos (MEIS, 2005).

E assim foi por muitos anos...Xamãs e Artesãos conviviam nas mesmas comunidades e suas diferentes formas de pensar nunca se misturavam. Os Xamãs se preocupavam em interpretar a fenomenologia natural e a veracidade de suas conclusões não eram testadas nem contestadas. Por outro lado, os artesãos não se preocupavam com a interpretação dos fatos e sua forma de pensar se limitava aos conceitos de tentativa e erro e do que funcionava ou não funcionava (MEIS, 2005, p.34).

Na Grécia Antiga, os gregos tinham muitos deuses e deusas, alguns dos quais eram associados às grandes forças da natureza ou aos sentimentos humanos. Os gregos buscavam, através de suas histórias e lendas, explicações para fenômenos difíceis de serem compreendidos pela mente humana (GIBSON, 1978).

No entanto a mesma Grécia Antiga foi berço dos primeiros grandes pensadores como Aristóteles, Demócrito, Platão e Sócrates. Estes começaram a pensar nas forças da natureza sobre o aspecto da observação e da lógica, sendo uma das primeiras formas de organização do pensamento humano na história (MEIS, 2005).

A análise lógica procura examinar as relações que existem entre uma conclusão e a evidência (observação) que lhe serve de apoio. A lógica trata da relação entre premissas e conclusão. Trata de objetos factuais ou idéias cujos argumentos e teoremas não

precisam ser testados experimentalmente pois utilizam-se apenas do raciocínio lógico (GEWANDSZNADJER, 1989). “Porém nem todas as premissas levam a uma conclusão correta através da lógica. Por exemplo: Enzimas são proteínas. A hemoglobina é uma proteína. As afirmações levariam a incorreta conclusão de que a hemoglobina é uma enzima!”(informação verbal).¹

Esta forma de pensamento, principalmente decorrente do legado de Aristóteles, perdurou até o final do período renascentista (século XVI), que somado ao dogmatismo religioso predominante da época, freava a produção do conhecimento científico.

No entanto neste mesmo período Galileu Galilei se contrapôs a seus antecessores e propôs um método de investigação no qual a verdade científica se dava pela correspondência entre suposições teóricas e evidências encontradas nos fatos manifestados pela natureza (BRENZIKOFER, 1997; KOCHE, 1997). Francis Bacon contemporâneo de Galileu, vai contra a forma de pensamento dominante da época e propõe o método indutivo e o empirismo.

Francis Bacon, por sua vez, também descontente com o aristotelismo dominante, escreve o *Novum Organum* (1620) para preconizar novos métodos de investigar e alcançar a verdade a cerca do mundo que nos rodeia. Sua posição é a do empirista. O cientista precisa, antes de mais nada, observar os fatos, deixando de parte as “antecipações mentais” (HEGENBERG, 1976, p. 118).

A partir daí a forma de interpretação da natureza pelos Xamãs e artesãos (descrita por Meis, 2005) começa a se misturar. Agora as observações e interpretações geradas por determinado fenômeno devem ser testadas e experimentadas para serem confirmadas.

A indução experimental proposta por Bacon (1620) consiste em observar determinadas propriedades do fenômeno, testa-las e em seguida partir para uma proposição mais ampla. Em linhas gerais os seguidores da idéia de Bacon, devem partir de três etapas: observação meticulosa do fenômeno, generalização (formulação das leis) e a confirmação das leis. (HEGENBERG, 1976; KOCHE, 1997).

Mais tarde Karl Popper, David Hume e Albert Einstein apontaram algumas falhas no conhecimento científico obtido por observação e lógica. Segundo eles não era um processo confiável, como no exemplo: se observamos muitos corvos negros em uma determinada região, isso pode nos induzir a concluir que todos os corvos são negros, mas

¹ Informação fornecida por Bayardo B. Torres no curso de Metodologia do Ensino Superior – Área Biológica – NB 282 – Departamento de Bioquímica – Unicamp, 2011.

basta apenas um corvo branco para falsificar a conclusão (OTTONI, 2011). Como já exposto Bacon propunha o teste da hipótese obtida por indução, ao contrário do pensamento Aristotélico obtido por observação e lógica, como no caso dos corvos negros. A observação e lógica pode servir de base para o início da investigação, como propõe Bacon (OTTONI, 2011).

Para Karl Popper toda teoria ou hipótese para se tornar confiável deve ser passível de ser falsificada. Para isto ela deve ser exposta a diversos testes que tentem falsificá-la. Quanto maior a resistência em ser falsificada, mais confiável se torna a hipótese ou teoria. Contudo, é necessário que ela continue tendo a possibilidade de ser falsificada. É o princípio do falseonismo proposto por Popper que demarca o conhecimento científico (HEGENBERG, 1976; OTTONI, 2011).

O conhecimento científico, a ciência e o método científico recebem contribuições de diferentes áreas e está sendo construído ao longo da história da humanidade. É este conhecimento que mudou e continua a mudar a vida do homem. É o que possibilitou aos homens, que um dia atribuíram explicações divinas para os fenômenos da natureza, chegarem a Lua, entenderem os fenômenos físicos envolvidos em uma tempestade ou na combustão causada pelo fogo (GEWANDSZNADJER, 1989; MEIS, 2005). A evolução do conhecimento através de diferentes métodos permitiu ao homem partir de uma teoria atômica pré-socrática, na qual Demócrito considerava o átomo como um elemento indivisível, a chegar no contestado controle da energia nuclear provocada pela fissão do átomo. Ou propor teorias sobre a origem do universo como a desconcertante idéia do Big Bang ou sobre a evolução das espécies proposta por Charles Darwin (MOLEDO, MAGNANI, 2009).

Mas a ciência não é apenas descoberta, descrição de fatos, enunciado de leis ou mensuração de variáveis. Entender e fazer ciência é principalmente entender o método científico e como ele orienta a interpretação do universo que o ser humano se encontra. A investigação científica é um processo contínuo de correção de erros e construção de novas hipóteses, que muitas vezes são influenciados pelo pensamento dominante na sociedade. Neste processo contínuo ocorreram diversos erros, alguns acidentais que levaram a revoluções científicas, outros que atrasaram o processo do conhecimento. Isso demonstra a necessidade das hipóteses e teorias serem testadas e discutidas, conforme a idéia do falseonismo de Popper. Desta forma, quanto mais as teorias resistirem aos testes e discussões, mais confiáveis se tornam e conseqüentemente contribuem para a produção do conhecimento. (DARDEN, 2001; GEWANDSZNADJER, 1989; MOLEDO; MAGNANI, 2009; BREZIKOFER, 1997,

1998).

3.1 Esquema do Método Científico

Descreveremos o esquema do método científico proposto por Brenzikofer (1998) que é um conjunto de etapas que ligam o fenômeno a sua interpretação.

Para a análise crítica do fenômeno o método é dividido em duas partes: uma vertente analítica e uma vertente empírica (Figura 1), no qual ambas devem ser confrontadas ao final da investigação, para gerar uma interpretação dos dados obtidos a respeito do fenômeno investigado.

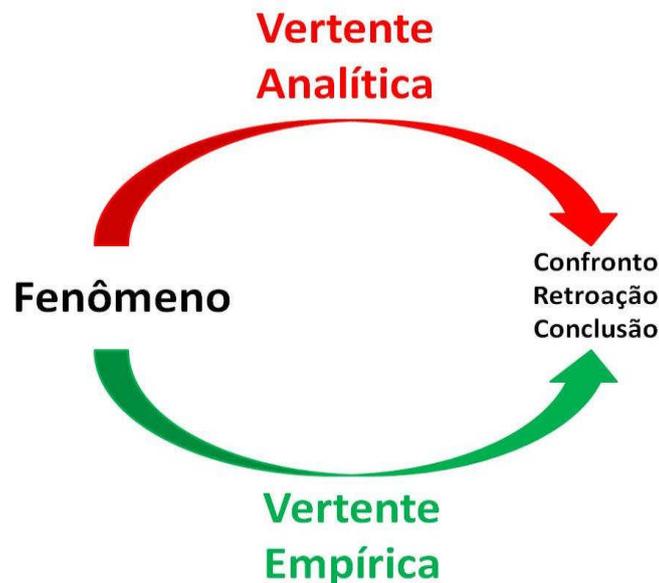


Figura 1. Representação simplificada do método científico.

Cada vertente é subdividida em outras partes, para tornar o sistema mais operacional (Figura 2), com o intuito de orientar o pesquisador dos passos a serem tomados dentro de cada vertente, assim como possibilitar que erros sejam identificados mais facilmente nas etapas da investigação.

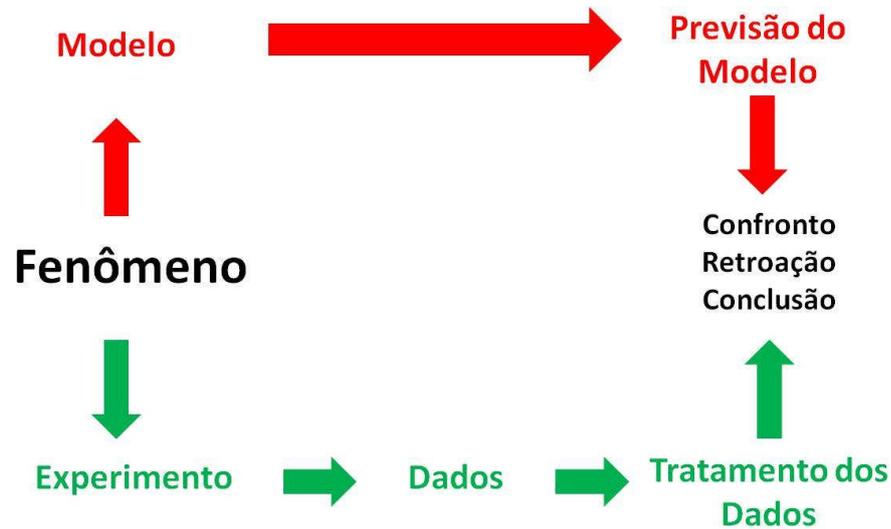


Figura 2. Representação completa do ciclo do método científico. Em vermelho passos da vertente analítica. Em verde passos da vertente empírica.

Notamos nas Figuras 1 e 2 que existem dois caminhos que nos levam ao estudo do fenômeno. No primeiro, da vertente analítica (em vermelho), é aproveitado o conhecimento prévio sobre o fenômeno para gerar um modelo e suas previsões (Figura 2). Enquanto no segundo, da vertente empírica (em verde), o fenômeno é reproduzido em laboratório em condições favoráveis com o modelo imaginado para ser testado e medido. Os resultados gerados através das mensurações devem ser confrontados com o modelo proposto e assim gerar uma interpretação para verificar se os resultados representam ou não as previsões do modelo. É importante ressaltar que o ciclo deve se fechar para se chegar as conclusões favoráveis a respeito da investigação. Caso não feche significa que houve falhas em alguma das etapas e é necessário uma reavaliação para localizar e corrigir a etapa responsável pelo erro. A seguir analisaremos cada etapa mais detalhadamente.

3.1.1 Vertente Analítica

Esta é a etapa que podemos relacionar com o método indutivo proposto por Bacon. É neste momento que o pesquisador elabora suas hipóteses e constrói o modelo para ser testado. Para isso ele precisa partir de conhecimentos prévios sobre o fenômeno, ou seja, precisa entender o conhecimento já produzido a respeito do que irá estudar. A partir deste conhecimento é elaborado um modelo para que as previsões sejam testadas e as informações sejam obtidas. “O modelo é uma representação simplificada e hipotética de algo que supomos real” (GEWANDSZNADJER, 1989, p.11).

No entanto o fenômeno e as informações são de naturezas diferentes. O fenômeno acontece em nosso espaço físico, que pode ser desde um salto em distância, quanto

o comportamento do ser humano em uma determinada sociedade, ou a resposta inflamatória no músculo causada por micro-lesões das fibras musculares após um exercício excêntrico. Enquanto as informações são oriundas das interpretações geradas a partir dos dados experimentais, que podem ser a distância realizada no salto, a ideologia predominante na sociedade, ou os marcadores bioquímicos que indicam um processo inflamatório instalado. Ou seja, as informações são elaboradas pela parte intelectual do ser humano a partir de dados obtidos da natureza. A distância que separa o fenômeno da informação representa a falta de compreensão ou entendimento a respeito do assunto. O conhecimento prévio sobre o fenômeno pode diminuir esta distância.

Quando construímos de forma estruturada e lógica uma idéia que nos leve da informação já existente em direção ao fenômeno estamos construindo o modelo. O modelo geralmente não consegue abranger toda a lacuna existente entre a informação e o fenômeno, por isso a necessidade do experimento para gerar mais conhecimento. “É importante que o próprio modelo, construído com conhecimentos prévios, seja testado e confirmado pelo experimento” (BRENZIKOFER, 1998, p.5).

3.1.2 Vertente Empírica

Na vertente analítica analisamos o fenômeno e construímos o modelo a ser testado. No entanto é na vertente empírica que o fenômeno se manifesta gerando os dados para a interpretação. É neste momento que procuramos as correspondências entre as suposições teóricas e os fatos manifestados pela natureza proposto por Galileu, ou o empirismo proposto por Bacon. “Em uma situação experimental o fenômeno está inserido no universo local que chamamos de Sistema Experimental” (BRENZIKOFER, 1998, p.5).

Neste sistema se encontram todas as situações experimentais possíveis. São incluídos todos os elementos presentes no experimento, o fenômeno, aparelhos, acessórios, a montagem, instrumentos, condições locais e o próprio pesquisador. É dentro deste sistema que o modelo é testado e a informação deve ser encontrada!

No entanto obter a informação num sistema amplo não é algo trivial pois não requer apenas medir variáveis, mas necessita de um processo de planejamento e otimização do experimento.

O planejamento é o momento no qual se deve fazer um levantamento sobre os conceitos envolvidos e técnicas de investigação do fenômeno que podem ser utilizadas e devem ser integradas dentro do modelo. Nesta etapa são definidos os parâmetros, as variáveis

dependentes e independentes, assim como as faixas de variação das variáveis. A intenção é que os dados obtidos pelo experimento represente a manifestação do fenômeno e seja passível de interpretação.

Ao concluir o planejamento, o pesquisador deve poder visualizar cada uma das ações que serão executadas quando realizar o experimento real, cada uma com as exigências e condições necessárias para sua adequação ao objetivo (BRENZIKOFER, 1998, p.5).

A otimização representa o momento em que se define a confiabilidade e precisão dos dados obtidos. Esta etapa inclui a quantidade de vezes que o experimento será repetido, quais dados serão levantados e qual tratamento será dado aos resultados numéricos para gerar a interpretação a respeito do fenômeno.

É neste sistema experimental que o fenômeno deve se manifestar. No entanto, o pesquisador só realiza as medições após todo o planejamento e montagem do experimento serem feitas. Das medições serão extraídos os dados para serem interpretados gerando alguma informação a respeito do fenômeno. Desta forma se torna evidente a importância da qualidade do planejamento, montagem e realização do experimento.

3.1.3 Confronto/Avaliação

Após a experimentação o momento é de extrair a informação procurada dos resultados obtidos. Os resultados das medidas não são apenas dados numéricos. Existem característica intrínsecas contidas nos mesmos que representam o conjunto de circunstâncias envolvidas no experimento. Exemplo: os resultados das medidas, possuem nome(velocidade), dimensão(distância/tempo), unidade(m/s), valor numérico(1, 75) e grau de incerteza ou probabilidade, como o desvio padrão (+- 0, 06) que foram definidos na etapa de planejamento e otimização do experimento. Agora, o objetivo é confronta-los com o proposto no modelo e retirar a informação contida na experimentação do fenômeno.

Esta etapa de confronto e avaliação pode tanto gerar informações que comprovam o modelo previsto, quanto informações que não comprovam as projeções propostas no modelo. É importante ressaltar que obter dados que não comprovam o modelo, não é demérito da pesquisa ou do pesquisador, desde que este entenda as situações que possam ter ocorrido, incluindo possíveis falhas no experimento. Para isso ele deve retornar as etapas do método e buscar onde as falhas possam ter ocorrido, ou se realmente sua hipótese não foi comprovada pela experimentação. Após esta verificação o pesquisador deve elaborar

uma interpretação a respeito desta não confirmação.

Em ambas as situações de comprovação ou não do modelo proposto, uma nova informação a respeito do fenômeno é gerada. Esta informação é aquela que deve ser debatida, publicada e discutida para testar sua confiabilidade. Muitas vezes os pesquisadores que se incluem no sistema experimental, não conseguem visualizar determinadas situações que outros pesquisadores fora do sistema podem perceber, ou até mesmo ter informações a respeito do fenômeno que não foram levantadas na etapa da vertente analítica. No momento em que a informação obtida resiste a estes tipos de testes podemos dizer que existe um grau de confiabilidade e estamos produzindo o conhecimento científico. No entanto é importante ressaltar que nunca atingimos a verdade absoluta a respeito do fenômeno.

4 ESQUEMA DO MÉTODO CIENTÍFICO NO ESTUDO EXPERIMENTAL

Para se iniciar o estudo, os conhecimentos prévios a respeito do fenômeno a ser investigado deve ser levantada, como proposto na vertente analítica. Esta contextualização é feita na introdução do trabalho.

4.1 Introdução: Entendendo o fenômeno

O exercício físico sob o ponto de vista fisiológico e bioquímico pode ser caracterizado como um estímulo perturbador da homeostase do organismo, que gera depleção de substratos energéticos e micro-traumas nas fibras musculares (BOMPA, 2001; WEINECK, 2003). Quando o período de recuperação entre um estímulo e outro é respeitado, as fibras musculares se regeneram dos micro traumas e os níveis de atividade enzimática e de substratos metabólicos são restabelecidos acima dos níveis detectados antes do treinamento, propiciando uma maior disponibilidade energética e adaptação metabólica para o próximo estímulo (FRY ET AL., 1992; BRUIN ET AL., 1994).

Diversos estudos tem mostrado aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (O_2) (EROs) devido ao aumento da demanda de ATP para manutenção da atividade contrátil muscular (DAVIES et al., 1982; ALESSIO, 1993; VOLLARD et al. 2005; BLOOMER 2008; POWERS E JACKSON 2008). Durante a redução da molécula de oxigênio para formar água e adenosina trifosfato (ATP) na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, são produzidas espécies parcialmente reduzidas, tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), as quais são resultantes, respectivamente, da redução por um, dois e três elétrons (Figura 3). Essas espécies derivadas do oxigênio possuem um número ímpar de elétrons em seu último orbital e, devido à tendência dos elétrons permanecerem pareados, essas moléculas (EROs) são altamente reativas (HALLIWELL AND GUTTERIDGE, 1989).

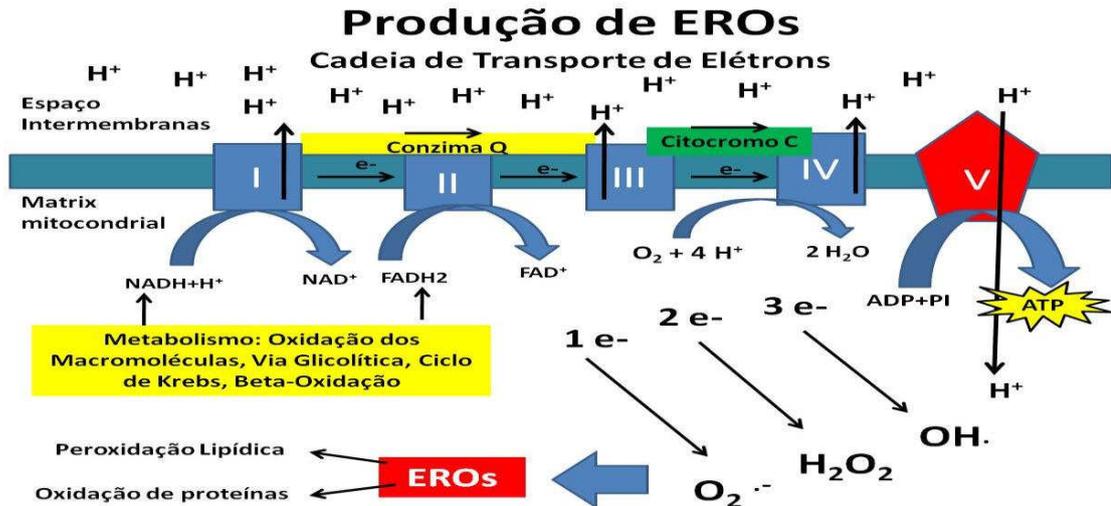


Figura 1. Ilustração da Cadeia de Transporte de Elétron (CTE) e produção de EROs.

Exercícios de endurance aumentam a produção de EROs em função da alta demanda de ATP para realizar a contração muscular obtidas através do metabolismo aeróbico do qual faz parte o funcionamento da mitocôndria. Outra fonte de EROs relacionado ao exercício pode ser a via da Xantina Oxidase (XO), uma enzima que atua no músculo, principalmente em situações de baixa disponibilidade de O_2 e ATP. A reação de desaminação catalisada pela enzima, transforma AMP em IMP. O IMP é transformado em hipoxantina. A reação é importante para permitir a ação contínua da mioquinase na formação de ATP. Em situações normais a hipoxantina é degradada a ácido úrico pela ação da forma desidrogenase da enzima (XDH), que utiliza NAD^+ comoceptor de elétrons. No entanto, em situações de baixas concentrações de O_2 e altas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , a enzima passa para sua forma oxidase, que durante a reperfusão utiliza O_2 comoceptor de elétrons, produzindo também radical anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) no final do processo (SJODIN ET AL., 1990 APUD FERRARESSO, 2010).

A produção exacerbada de EROs ocasionada pelo exercício físico pode gerar danos oxidativos nas macromoléculas, ácido desoxirribonucléico (ADN) e membranas celulares (POWERS E JACKSON, 2008). Um dos principais danos celulares que ocorre em virtude do estresse oxidativo é conhecido como peroxidação lipídica, no qual há uma deterioração dos ácidos graxos da membrana plasmática da célula por uma série de reações em cadeia, com participação das EROs e oxigênio. Essas reações incorporam quantidades anormais de oxigênio nos lipídios, aumentando a vulnerabilidade da célula e seus componentes, podendo levá-la a morte (OHARA, 2006).

A alta reatividade das EROs prejudica sua mensuração direta em sistemas

vivos (MOLLER, 1996), o que justifica o estudo dos produtos (marcadores bioquímicos) oriundos das reações dos EROs no organismo. Encontrar marcadores específicos de estresse oxidativo relacionado a cada tecido tem sido outra dificuldade, visto que cada tecido apresenta diferentes respostas aos efeitos pro-oxidantes e no sistema de defesa antioxidante. Yagi (1976) e Ohkawa et al (1979) mostraram que hidroperóxidos formados pela peroxidação lipídica reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARs), formando complexos que podem ser quantificados em virtude da coloração obtida. Desde então a mensuração do TBARs tem sido usada como ferramenta para identificar a ocorrência da peroxidação lipídica nas membranas das células. Assim como o malonaldeído (MDA), que é um lipoperóxido liberado na peroxidação lipídica, fornecem um índice indireto de injúria oxidativa na membrana celular (Souza et al, 2005).

No entanto nosso organismo possui um elaborado sistema de defesa antioxidante enzimático (ex. catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), sistema glutaciona peroxidase (GPx)/glutaciona redutase (GR) e não enzimático (ex. glutaciona, ácido úrico, vitaminas antioxidantes, polifenóis, ácidos graxos poliinsaturados), que atua no combate ao excesso de EROs produzido. A defesa antioxidante possibilitou a utilização do oxigênio para produção de energia e conseqüentemente favoreceu a evolução da espécie (DAVIES et al., 1982; JI et al. 1993; OHARA, 2006; RADAK et al., 2001). A Figura 4 ilustra os mecanismos de defesa antioxidantes.

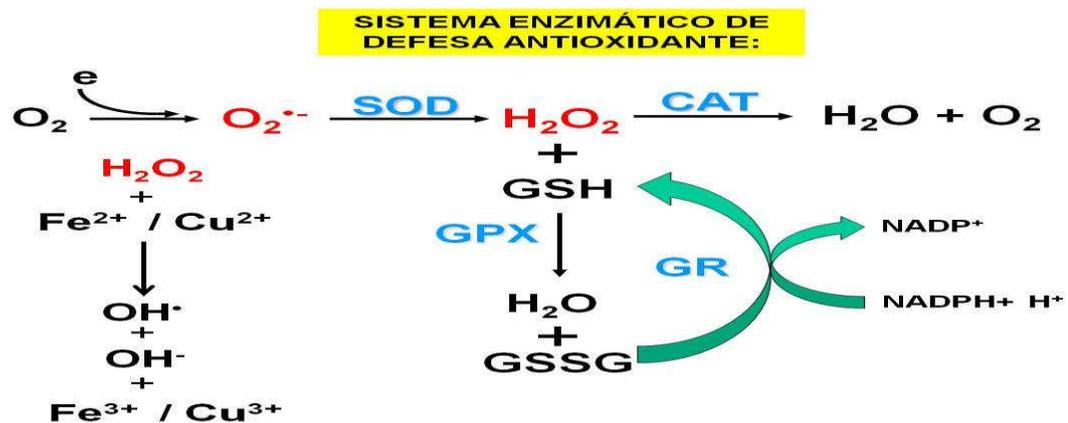


Figura 4. Mecanismo de defesa antioxidante.

A primeira defesa contra o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), uma molécula altamente reativa com um número ímpar de elétrons na sua última camada, é a reação catalisada pela enzima SOD que dismuta do radical superóxido à H_2O_2 e H_2O . Posteriormente a enzima CAT,

irá catalisar a reação de transformação do H_2O_2 em H_2O e O_2 (FERREIRA E MATSUBARA, 1997). A GPX também tem capacidade de detoxificar o H_2O_2 com a participação da glutathiona reduzida (GSH), que funciona como doador de elétrons na reação. Quando a GSH é oxidada nesta reação, ocorre a formação da glutathiona oxidada (GSSG). Diminuição nos níveis de GSH podem prejudicar o sistema de defesa antioxidante, e conseqüentemente a defesa celular contra a ação das EROs. Para que isso não ocorra a enzima GR as custas de NADPH reduz a GSSG formada para sua forma reduzida GSH, mantendo desta forma a razão GSH/GSSG alta, preservando as defesas celulares (SMITH, 1988).

É importante ressaltar que as EROs também são responsáveis pela regulação de diversas vias de controle da expressão gênica, que tem como produtos proteínas de reparo de ADN, proteínas de estresse, proteínas da cadeia de transporte de elétrons e as do sistema de defesa antioxidante (JI et al. 2002). Neste contexto, é necessário um equilíbrio sutil entre a produção de EROs e a defesa antioxidante para a regulação do metabolismo. Qualquer situação onde a produção de EROs exceder a capacidade de defesa do organismo foi denominada pelo pesquisador alemão Helmut Sies de estresse oxidativo (OHARA, 2006). O exercício regular equilibrado com um tempo adequado de recuperação pode gerar adaptação do sistema de defesa antioxidante, prevenindo este quadro (DUNCAN et al., 1997; CARNETHON et al., 2003).

4.1.1 Fígado e Estresse Oxidativo

Durante o exercício físico de longa duração a alta demanda energética das células musculares faz com que a captação de glicose do sangue pelo músculo aumente. No entanto a glicemia é mantida durante o exercício pela estimulação da quebra do glicogênio hepático e síntese de glicose que ocorrem no fígado através das vias metabólicas glicogenólise e gliconeogênese respectivamente (SANG-HOON SUH ET AL., 2007).

A gliconeogênese é um processo de síntese de glicose à partir de aminoácidos num processo que consome energia (TORRES, MARZZOCO, 2007). A energia necessária para que a gliconeogênese ocorra é decorrente da oxidação de ácidos graxos através do metabolismo aeróbico no hepatócito. Devido ao aumento desta via, o produção de EROs no fígado também pode estar aumentada durante o exercício. Segundo Ogonovszky et al (2005) o fígado é um dos órgãos mais sensíveis ao estresse oxidativo induzido pelo exercício.

Liu et al (2000) investigou as respostas ao estresse oxidativo induzido por

exercícios crônicos e agudos. Os resultados mostraram elevações nos níveis de malondealdeído (MDA, marcador de peroxidação lipídica), ácido ascórbico (antioxidante), diminuição da síntese de glutamina, e nos níveis de ubiquinol e cisteína (antioxidantes) no tecido hepático.

Sun et al (2010) aponta o exercício de endurance como um fator causal do estresse oxidativo mitocondrial em fígado de ratos. Os autores observaram níveis elevados da atividade das enzimas antioxidantes glutathione S-transferase e NADPH-quinona-oxidoreductase 1 e também aumento da concentração do MDA no tecido hepático. Também foi observado aumento na atividade dos complexos I, IV e V da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias hepáticas.

Huang (2010) investigou o perfil de diversos metabólitos em tecido hepático de ratos submetidos a treinamentos de endurance e exaustivos. Foram encontrados níveis aumentados dos aminoácidos cisteína e glicina, que em conjunto com glutamato são precursores para a síntese de glutathione, um importante antioxidante (LEEUWENBURGH E JI, 1995). O aumento da produção de GSH no fígado demonstrado por Huang et al. (2010), pode estar relacionado com a maior necessidade de defesa antioxidante decorrente da maior produção de EROs no exercício.

Adicionalmente, Huang et al. (2010) verificaram que o exercício exaustivo, ocasionava uma severa resposta inflamatória no fígado chamando a atenção o aumento de EROs em decorrência da ação de neutrófilos durante a inflamação. Miranda et al. (2004) relatam que em situações de isquemia e reperfusão no fígado, os neutrófilos são grandes responsáveis pela produção de EROs no processo inflamatório em um evento conhecido como Burst Respiratório.

4.1.2 Exercício e Suplementação

A suplementação esportiva na atividade física tem o objetivo de contribuir para uma melhora de desempenho, melhor adaptação aos estímulos de treino e proteger contra lesões indesejadas. Nesse sentido, há uma considerável propaganda a respeito da suplementação com antioxidantes, principalmente pela comunidade esportiva, no qual diversos atletas e treinadores, profissionais ou amadores, tem buscado evitar os danos causados pelo estresse oxidativo através de suplementação seja através de dietas ricas em nutrientes com função antioxidante ou produtos industrializados (YANFAT ET AL., 2009).

Powers et al (1999) discutiram sobre a necessidade de estudos que

enfocarem os efeitos do treinamento nos níveis de antioxidantes não enzimáticos devido ao papel que estes exercem, assim como a possíveis alterações nas necessidades dietéticas durante o treinamento físico que estas variações possam implicar.

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, os polifenóis têm sido um dos compostos mais estudados no combate ao estresse oxidativo, principalmente após a década de 90. A capacidade antioxidante destes compostos é atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático presente em sua estrutura, que reduz radicais livres reativos e produz o radical fenoxila estabilizado por ressonância. São importantes ainda pela sua capacidade de quelar íons metálicos (CERQUEIRA et al., 2007).

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 fenóis, constituindo uma importante fonte desses compostos na dieta (DUARTE-ALMEIDA ET AL., 2006). A quercetina é o flavonóide mais abundante na dieta humana e exerce importantes funções no nosso organismo devido ao seu poder antioxidante (BEHLING et al., 2004).

Além de compostos com ação antioxidante na sua composição, o caldo de cana é um alimento rico em sacarose, sendo também uma fonte de carboidratos para recuperação dos estoques de glicogênio muscular e hepático. O glicogênio é uma das principais fontes de energia para exercícios prolongados, e a restauração de seus estoques parece interferir diretamente no tempo de recuperação muscular (JENTJENS & JEUKENDRUP, 2003). Devido a sua composição, o caldo de cana apresenta-se como uma alternativa barata para ser utilizada como um suplemento pós-treino.

4.2 Objetivo: Construção do modelo e Hipótese

Com as informações prévias a respeito do fenômeno é possível a construção do modelo e hipótese de trabalho estabelecendo o que será investigado.

Pelo conhecimento já existente sabemos que o exercício pode levar a um quadro de estresse oxidativo no fígado e neste sentido, a suplementação com antioxidantes poderia auxiliar a evitar os efeitos deletérios destas moléculas na célula hepática. Neste contexto, o caldo de cana pode ser uma alternativa uma vez que além de antioxidantes possui carboidrato na sua composição o que pode auxiliar na recuperação das reservas de glicogênio tanto muscular quanto hepática que foram depletados durante a atividade.

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar parâmetros de estresse oxidativo

em fígado de ratos submetidos a um protocolo de treinamento em esteira (endurance) suplementados com caldo de cana.

Para responder a hipótese levantada são necessárias ferramentas que possibilitem sua análise. Entendendo que o estresse oxidativo é caracterizado por uma situação em que a produção de agentes oxidantes é maior que a defesa antioxidante do organismo, é necessário analisar tanto a defesa antioxidante quanto o ataque oxidativo. As ferramentas propostas na literatura são as atividades das enzimas antioxidantes CAT e GR e a concentração de ácido tiobarbitúrico (TBARs).

Além da análise do estresse oxidativo é necessário um modelo de treinamento confiável para obtenção das amostras nas condições planejadas. Neste contexto, o LABEX desenvolveu um protocolo de treinamento de endurance em esteira para ratos. O modelo de treinamento já foi testado em diversos trabalhos sendo reprodutível e mimetizando o treinamento aplicado em humanos (HOHL et al, 2009).

4.3 Materiais e Métodos: Planejamento e Otimização do experimento.

Partindo para a vertente empírica do estudo, neste momento todas as condições necessárias para a manifestação do fenômeno dentro do modelo proposto são estabelecidas e delineadas sendo cada etapa minuciosamente planejada e otimizada.

4.3.1 Animais

Cinquenta e três ratos machos, albinos, da linhagem Wistar, com dois meses de vida foram adquiridos no início do experimento do Centro de Bioterismo da Unicamp. Os animais foram acomodados em biotério climatizado a 25°C (\pm 1°C), com controle de ciclo invertido de luz claro/escuro de 12 h e alimentação ad libitum. Os protocolos experimentais utilizados com os animais foram previamente submetidos e aprovados (1446-1) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IB-Unicamp – (CEEA – IB – UNICAMP).

Atender as exigências do Comitê de Ética implica em manter as condições adequadas para vivência dos animais durante a execução do projeto minimizando assim interferências ambientais nos dados obtidos.

4.3.2 Adaptação à Esteira Rolante

Todos os ratos foram adaptados à esteira rolante 15 dias antes do início do protocolo (60 dias de idade). A fase de adaptação consistiu em colocá-los na esteira 5 dias/semana durante 5 minutos com velocidade de 12 m/min. Essas semanas iniciais tiveram a finalidade separar os animais que correm voluntariamente daqueles que se recusam a correr. Os grupos controle e treinado foram compostos apenas com os animais que correram voluntariamente. Os animais que não correram foram excluídos do trabalho (n=5).

A importância de escolher apenas os animais que correram voluntariamente representa uma forma de deixar o grupo mais homogêneo minimizando a interferência de algum componente (seja genético, fisiológico e/ou metabólico) que “prediz” ou influencia o animal a correr na esteira. Desta forma minimizamos o uso de estímulos externos para que o animal corra minimizando cada vez mais possíveis interferentes nos dados que serão obtidos.

4.3.3 Protocolo de Treinamento

Os ratos foram divididos nos grupos: controle sedentário (CS, n=11) e treinados (n=36) sendo que este grupo foi dividido após a suplementação em: Controle Treinado (CT), Treinado suplementado com Quercetina (TQ), Treinado suplementado com Caldo de Cana (TCC) e Treinado suplementado com Maltodextrina (TM), com nove animais em cada grupo. O grupo controle sedentário realizou uma atividade que consistia em serem colocados na esteira três vezes por semana na velocidade de 12 m/min por 10 minutos. O grupo treinado foi submetido as nove primeiras semanas do protocolo de overtraining desenvolvido previamente no nosso laboratório (HOLH et al. 2009) conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Protocolo de Treinamento.

Semanas Experimentais	Velocidade de Treino (m/min)	Duração do Treino (min)	Número de Sessões diárias	Recuperação entre as sessões(h)
Adaptação	12	10	1	24
1 ^a	15	20	1	24
2 ^a	22	30	1	24
3 ^a	22, 5	45	1	24
4 ^a	25	60	1	24
5 ^a a 8 ^a	25	60	1	24
9 ^a	25	60	2	4

Importante ressaltar que o estudo de Holh et al. (2009) já havia demonstrado o aumento de desempenho dos ratos nas primeiras nove semanas de treino, assim como aumento da atividade da Cintrato Sintase marcadora da capacidade aeróbia. Desta forma dentro do nosso planejamento garantimos que os animais iriam realizar um exercício de endurance, foco da investigação.

4.3.4 Desempenho dos Animais

A adaptação dos animais ao protocolo de treino foi acompanhada através de um teste de performance. O teste consistiu em um exercício incremental na esteira rolante até a exaustão, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Protocolo do teste de desempenho.

Tempo (min)	Início	2	4	6	8	10	12	14	16	18	21	24
Velocidade (m/min)	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	24	26

Os testes foram realizados em quatro momentos: antes do início da 1^a semana treino (T1), após a 4^a semana (T2), após a 8^a semana (T3) e após 9^a semana (T4).

Para o calculo do desempenho dos animais levou-se em consideração a massa de cada animal e a distância percorrida no teste, possibilitando a obtenção de uma variável relacionada ao trabalho desenvolvido (HOHL ET AL., 2009). O cálculo da variável relacionada ao trabalho desenvolvido é dada pela somatória do trabalho realizado em cada estágio do protocolo incremental. A soma do trabalho representa a quantificação do desempenho do teste, como mostra a equação abaixo.

$$W=M \times d$$

Onde: (W) = trabalho mecânico realizado pelo rato; (m) = massa do rato; (d) = distância percorrida pelo rato. OBS: (W) não é o trabalho mecânico definido pela física, e sim uma quantificação proporcional a este trabalho. Ao envolver a massa do animal esta variável W permite comparar o desempenho dos animais longitudinalmente. W é expresso em Kg*m.

4.3.5 Suplementação

A suplementação, realizada através de gavagem estomacal, foi feita nas 7^a, 8^a e 9^a semanas de treino sempre após o término da sessão de exercício. Essas semanas foram escolhidas visto que nessa etapa do protocolo de treino há um maior volume de treino. Desta forma neste momento a homeostase dos animais estaria mais perturbada, e a suplementação poderia ser mais eficaz na recuperação.

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 E JEUKENDRUP 2003). Para o grupo suplementado apenas com antioxidantes foi feita uma solução de quercetina na mesma concentração de antioxidantes encontrada no caldo de cana de acordo com Duarte-Almeida (2006) que é de 0,16 mg antioxidantes/ ml de caldo. Para o grupo controle treinado que ingeriu apenas água para servir como controle do treinamento foi dado o mesmo volume de líquido ingerido pelo grupo suplementado com caldo de cana.

A divisão dos grupos e quantidade dos suplementos a serem utilizados é fundamental na construção do sistema experimental.

Para investigar a resposta do exercício temos um grupo de animais controle (CS) que tiveram apenas contato com a esteira e o grupo de animais treinados (CT). Para testar os efeitos da suplementação com caldo de cana, o grupo treinado (CT) foi suplementado com água para funcionar como controle do grupo suplementado com caldo de cana (TCC). Como o caldo de cana é constituído de carboidrato e antioxidantes, para isolar os efeitos de cada um destes nutrientes dois grupos treinados foram suplementados com maltodextrina, um carboidrato (TM) e quercetina, um antioxidante (TQ) na mesma quantidade que foi ingerida pelo grupo caldo de cana.

4.3.6 Coleta dos Tecidos

Os animais foram sacrificados 24 h após o último teste de performance (T4),

sendo anestesiados via intramuscular com o Zoletil® (50mg/kg peso), em associação com o relaxante muscular xilazina (10un/kg peso). Após a anestesia, o fígado foi cuidadosamente dissecado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, sendo armazenados a uma temperatura de -80°C. Posteriormente foram homogeneizados 60mg de fígado com Politron (Politron PT-MR 2100, Kinematica, Switzerland) em 3mL de tampão contendo sacarose (15%), EDTA (0, 3%), K₂HPO₄ (50mM), PMSF, etanol (1%) e triton (1%) e em seguida centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm a 4°C para a análise da atividade das enzimas Catalase e Glutathione Redutase. Para a análise da peroxidação lipídica (TBARs) os tecidos foram homogeneizados com Politron em tampão KCL (1, 15%) na concentração de 10% (massa:volume).

A escolha dos materiais e procedimentos utilizados deve-se a informação prévia, no qual o anestésico e relaxante muscular já eram técnicas padronizadas no LABEX que demonstraram ter um baixo índice de hemólise e degradação de glicogênio hepático e muscular (MACHADO, et al. 2009). Assim como os tampões utilizados seguem a recomendação da literatura para análise da atividade das enzimas (AEBI, 1984; SMITH, 1988) e peroxidação lipídica (OHKAWA, 1978; UCHIYAMA & MIHARA, 1977).

4.3.7 Padronização dos Procedimentos Experimentais: Análise de confiança das técnicas.

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 padronização dos procedimentos experimentais se encontra dentro do processo de otimização do sistema experimental. Embora a atividade das enzimas CAT e GR e a peroxidação lipídica através do TBARs, são técnicas bem descritas e utilizadas na literatura mostrando uma boa reprodutibilidade para avaliar o estresse oxidativo, é importante que essas técnicas sejam reproduzidas nas condições do laboratório e do pesquisador antes de serem utilizadas para a análise dos grupos de animais. Desta forma garantimos que o fenômeno estejam acontecendo dentro de um intervalo de confiança e tenham reprodutibilidade.

Nesse sentido 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) hepáticas. 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 desvio padrão (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 homogênea 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 (R). Também foi levado em consideração o menor valor de p que representa a probabilidade, que varia de 0 a 1, de encontrar na pesquisa uma diferença igual ou maior que observada. Ou seja, quanto menor o valor de p, menor a chance do valor encontrado ter sido causado pelo acaso, ou devido a variabilidade da amostra (DORIA FILHO, 1999).

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.

4.3.8 Determinação da Atividade da Catalase (CAT)

A CAT foi padronizada através de método enzimático descrito por Aebi (1984). A atividade enzimática é avaliada a partir da decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), podendo essa ser determinada diretamente pela diminuição da absorvância no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 240nm.

Para a padronização das melhores condições experimentais para o ensaio da catalase, foram testados os volumes de 50, 70, 90, 110, 130 e 150 μL de homogenato e os tempos de reação de 30, 60, 90 e 120 segundos. As curvas relacionadas aos diferentes tempos de leituras e concentração de homogenato, assim como o coeficiente de variação, índice de correlação (R) entre a absorvância e concentração de homogenato e o índice de significância através do valor de P podem ser visualizadas na Figura 5.

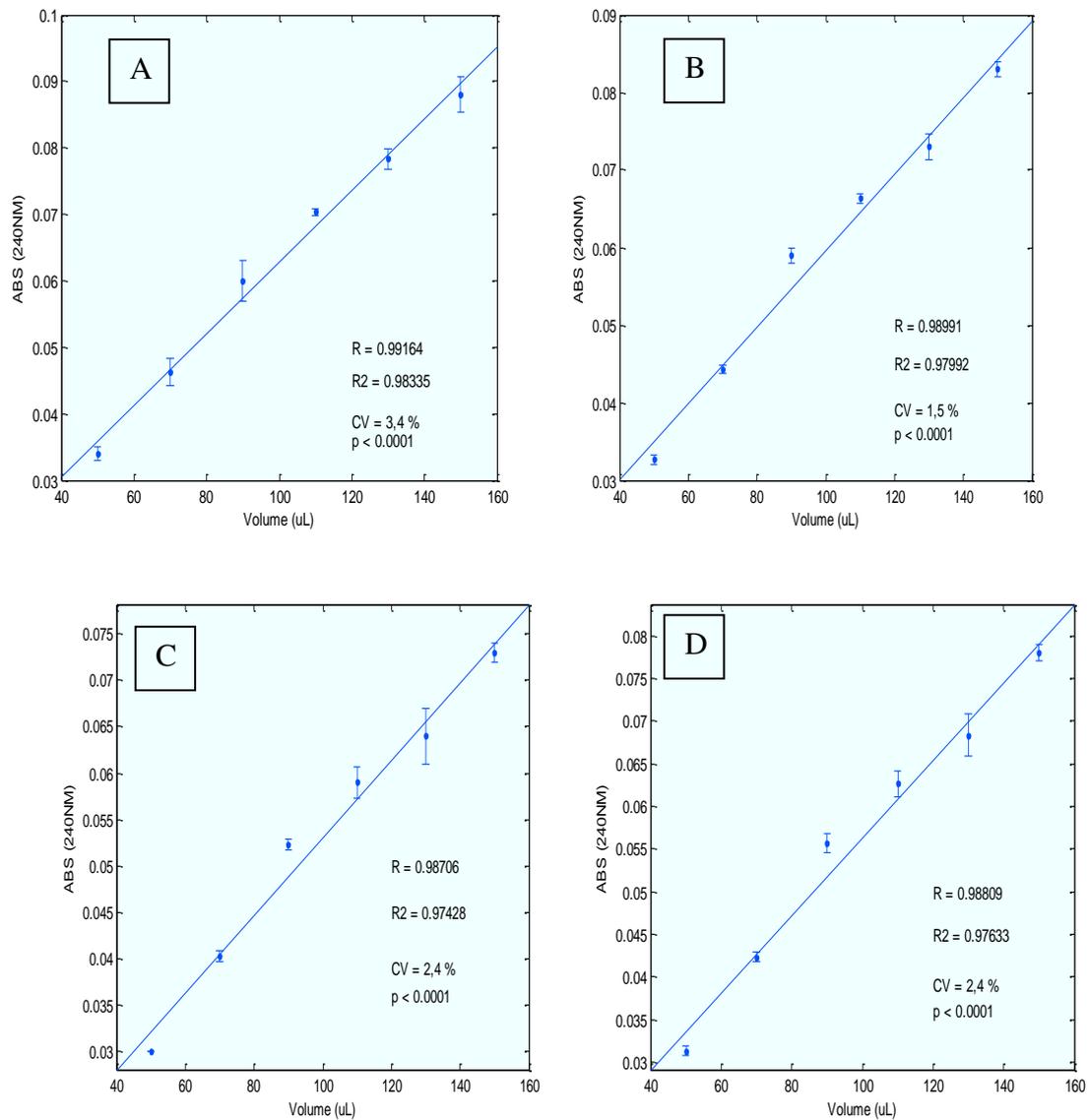


Figura 5. Curva Padrão para a CAT nos seguintes tempos de reação: 30 seg (A), 60 seg (B), 90 seg (C) e 120 seg (D).

Pelas curvas obtidas, padronizamos para determinação da atividade da enzima catalase a utilização de 110 μ L de homogenato (volume com menor desvio e próximo a reta linear) e tempo total de reação de 30 segundos (melhor linearidade e coeficiente de variação inferior a 5%).

4.3.9 Glutathione Redutase (GR)

A GR foi padronizada através do método enzimático descrito por Smith et al (1988). O procedimento padrão adotado para quantificação da GR foi seguir espectrofotometricamente a formação de TNB a 412nm a partir do ácido 5, 5'-ditiobinitrobenzóico (DTNB) conforme esquema abaixo.



Para a padronização das melhores condições experimentais para o ensaio da GR, foram testados os volumes de 100, 120, 140, 160 e 180 μL de homogenato e os tempos de reação de 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. As curvas relacionadas aos diferentes tempos de leituras e concentração de homogenato, assim como o coeficiente de variação, índice de correlação entre a absorbância e concentração de homogenato e o índice de significância através do valor de P podem ser visualizadas na Figura 6.

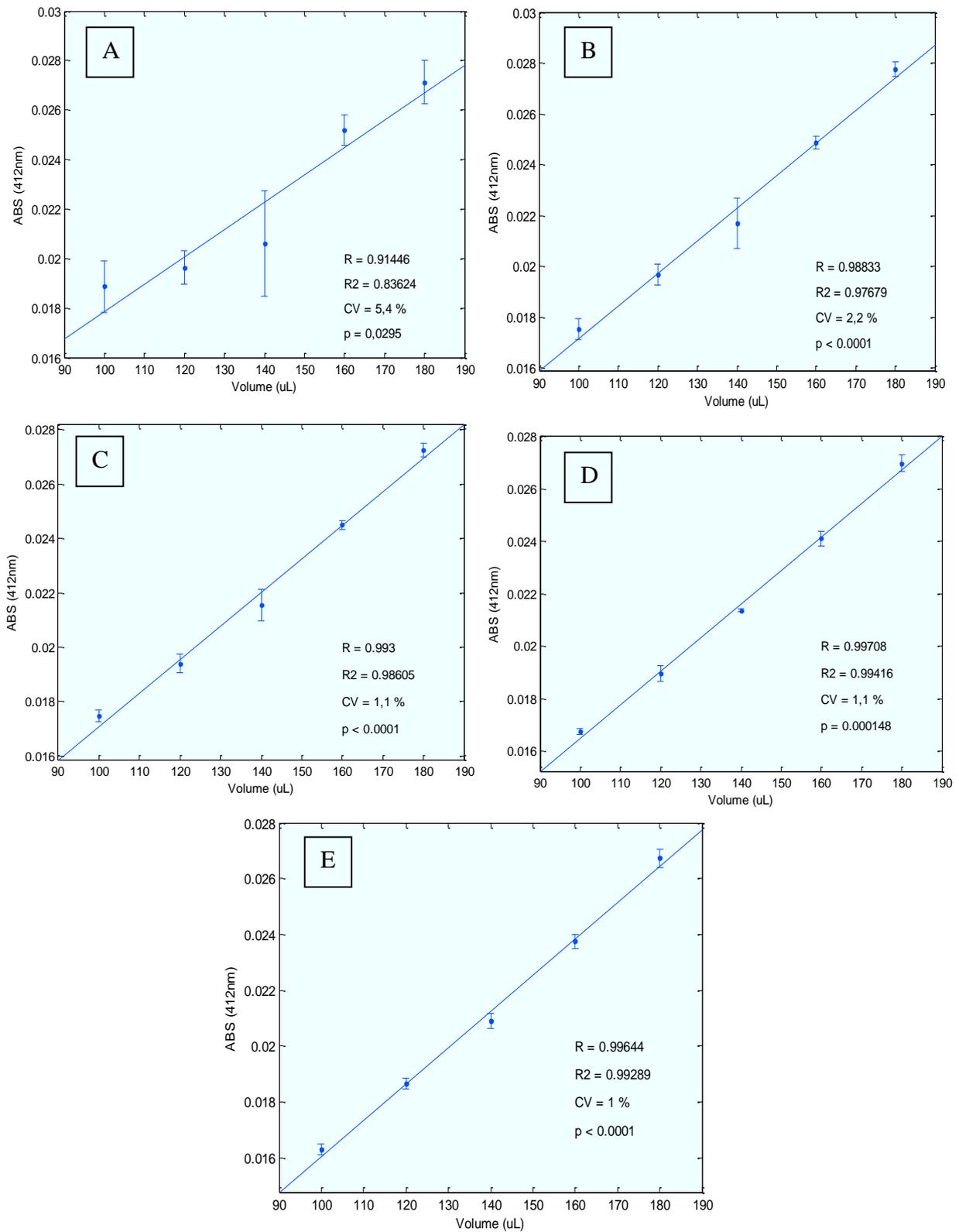


Figura 6. Curva Padrão para a GR nos seguintes tempos de reação: 1min (A), 2min (B), 3min (C), 4min (D) e 5min (E).

Padronizamos para o ensaio enzimático da GR o tempo de 3 minutos de reação (menor tempo com boa linearidade e coeficiente de variação inferior a 5%) e volume de 160 μ L de homogenato (volume com menor desvio e próximo a reta linear).

4.3.10 Cálculo da Atividade das Enzimas CAT e GR

O cálculo da atividade enzimática foi realizado a partir da seguinte equação: $A = (tga \cdot V) / (\epsilon \cdot v) \times FD$, onde A é a atividade enzimática; tga é = ΔA (variação da absorbância da amostra) / Δt (variação no tempo); V é o volume total de solução na cubeta; $\epsilon = 3,94 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (coeficiente de extinção molar do H_2O_2) para CAT; e $\epsilon = 13,6 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (coeficiente de extinção molar do DTNB) para GR; v é o volume da amostra e FD o fator de diluição da massa de fígado no tampão de preparação do homogenato.

A cálculo da atividade da enzima respeita uma relação linear que existe entre a absorbância medida no espectrofotômetro e a concentração da substância absorvente na solução, dada pela lei de Lambert-Beer, que leva em consideração o coeficiente de extinção molar característico de cada substância, as dimensões e diluições na cubeta utilizada (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003).

Este cálculo da atividade da enzima, assim como o cálculo do desempenho e as curvas com seus DP, CV e índice de significância, podem ser relacionados com a colocação de Galileu que os fenômenos da natureza podem ser interpretados através de fórmulas matemáticas (GEWANDSZNADJER, 1989).

4.3.11 Peroxidação Lipídica (TBARS)

O TBARS foi quantificado conforme os métodos descritos por Ohkawa, 1978 e Uchiyama & Mihara, 1977. 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 535 nm. Foram adicionados no homogenato posteriormente a uma solução contendo ácido fosfórico, KCl, ácido tiobarbitúrico e butanol. O cálculo da concentração de TBARS foi feito através da comparação com a curva-padrão de tetraetoxipropano (TEP).

Na Figura 7 abaixo estão representadas a curva-padrão obtida com TEP, assim como a curva para verificação da linearidade com diferentes volumes de amostra de homogenato de fígado.

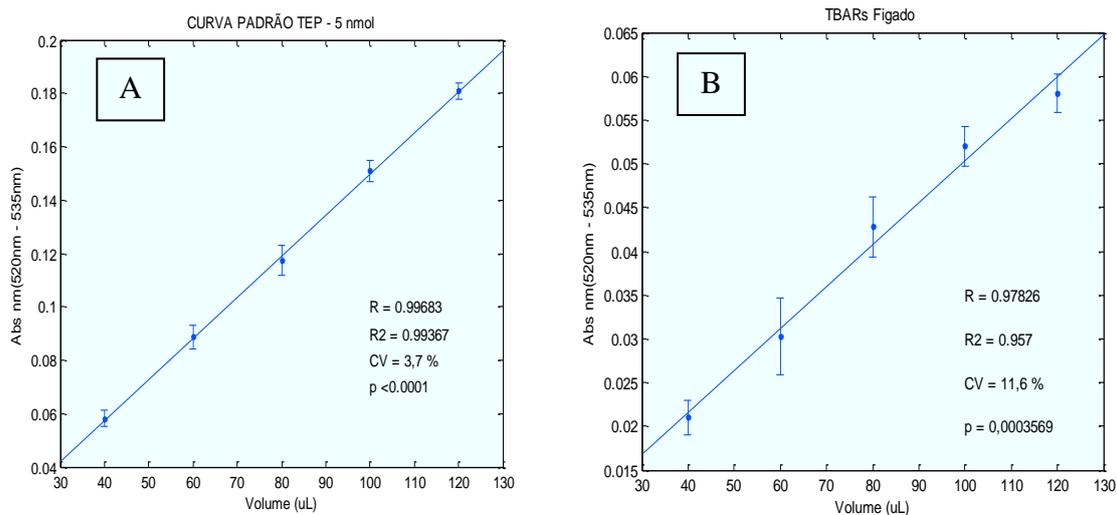


Figura 7. Curva Padrão com diferentes concentrações de TEP (A) e diferentes volumes de amostras de fígado (B).

Para análise de TBARs foi utilizado o volume de 100 μ L de homogenato (valor com menor desvio e próximo a reta linear).

4.3.12 Análise Estatística

A análise estatística auxiliará na comprovação da hipótese a partir das comparações dos resultados obtidos em cada grupo. Para isto é utilizado a estatística analítica ou indutiva que permite ao investigador através da teoria das probabilidades calcular o risco que ele assume ao chegar a determinada conclusão, a famosa diferença significativa (DORIA FILHO, 1999).

Para apresentação dos dados foram feitos gráficos do tipo boxplot utilizando-se o programa MATLAB 7.0. Este tipo de apresentação possibilita uma melhor visualização da dispersão dos valores obtidos. Além disto, segundo McGill et al (1978), caso os intervalos de confiança das medianas não estejam sobrepostos podemos inferir que a diferença entre as amostras é significativa. A figura 8 ilustra a forma de apresentação e interpretação do gráfico tipo boxplot.

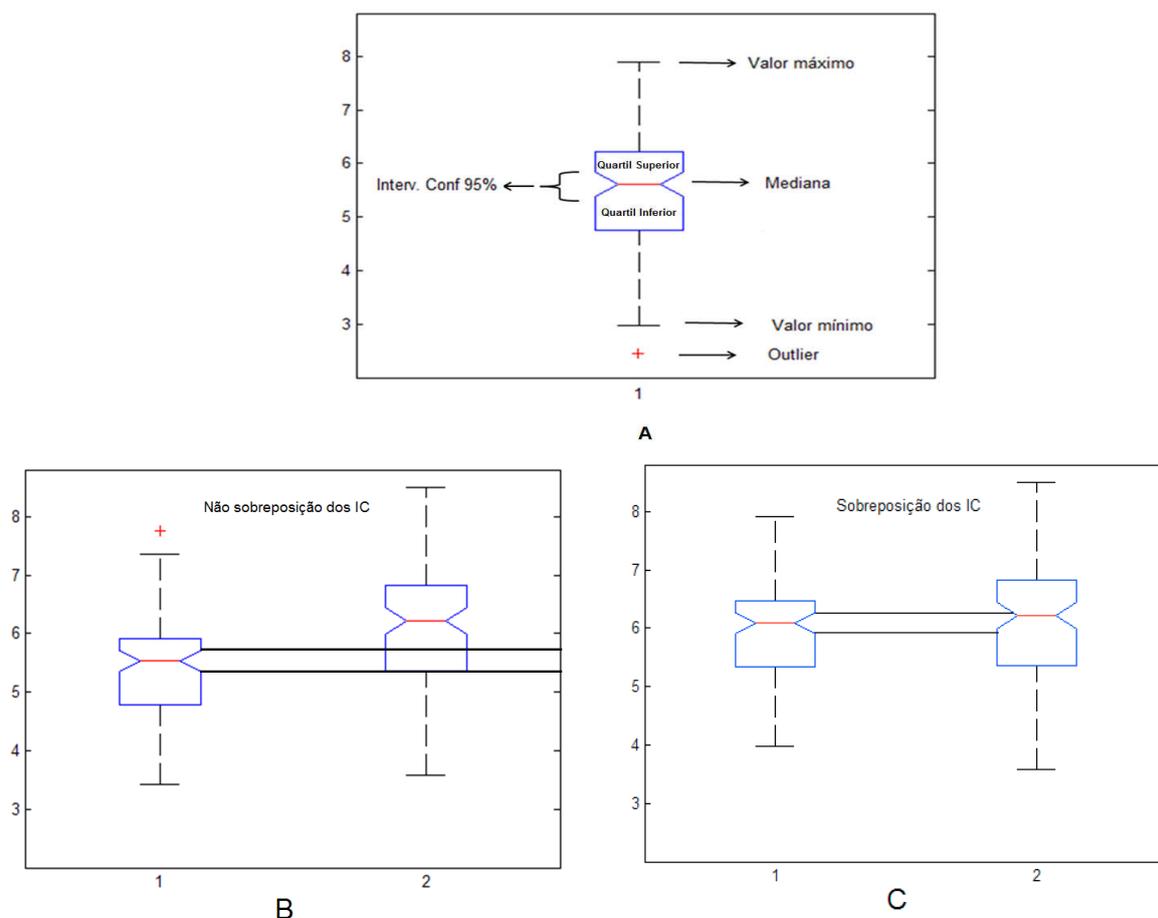


Figura 8. Figuras representativas de gráficos hipotéticos de Boxplot. A figura A apresenta todos os dados fornecidos por um gráfico de boxplot. A figura B exemplifica uma condição onde não há sobreposição dos intervalos de confiança dos boxplot (diferenças significativas entre as amostras dos boxplots (95%)). Já a figura C exemplifica uma condição onde há a sobreposição dos intervalos de confiança dos boxplots (ausência de diferenças significativas entre as amostras dos boxplots).

Para comprovar a descrição dos dados obtidos pelo boxplot foram aplicados testes estatísticos utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Para definir o teste estatístico adequado, inicialmente é necessário conhecer a distribuição dos dados, ou seja se são paramétricos (se distribuem de acordo com uma curva normal ou Gaussiana) ou não paramétricos. Para saber o comportamento dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk test no qual um valor com $p < 0,05$ indica uma distribuição não paramétrica. Para os dados paramétricos (atividade da CAT e GR) a comparação entre grupos foi feita através do teste ANOVA one-way com pós-teste de Tukey. Sendo que o termo one-way significa que os dados comparados respeitam apenas um critério, neste caso a atividade enzimática.

O teste de ANOVA one-way testa a hipótese nula de que todas as populações tem médias idênticas contra a hipótese alternativa de que uma ou mais das médias da população difere das demais. Ela gera um valor p que responde à seguinte questão: se a hipótese nula é verdadeira, qual a probabilidade de que as médias das amostras selecionadas possa variar tanto ou mais quanto à variação encontrada?" (DORIA FILHO, 1999, p.115).

Para os dados não paramétricos (concentração de TBARs) foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's. O teste de Kruskal-Wallis é um teste análogo ao ANOVA, porém utilizado quando os dados não são paramétricos, esse teste atribui "postos" ao dados e em seguida analisa a distribuição dos "postos" entre os grupos (DORIA FILHO, 1999). Foram considerados significativos valores com $p < 0,05$.

4.4 Resultados: apresentação dos dados gerados.

A análise dos dados obtidos, verificando o comportamento apresentado por cada grupo e comparando-os é o que permitirá a visualização do fenômeno ocorrido e o confronto com a hipótese de trabalho proposta.

4.4.1 Desempenho dos animais ao longo do protocolo de treinamento.

A Figura 9 apresenta o desempenho dos animais dos diferentes grupos nos testes de performance realizados antes, após a quarta, oitava e nona semana de treinamento.

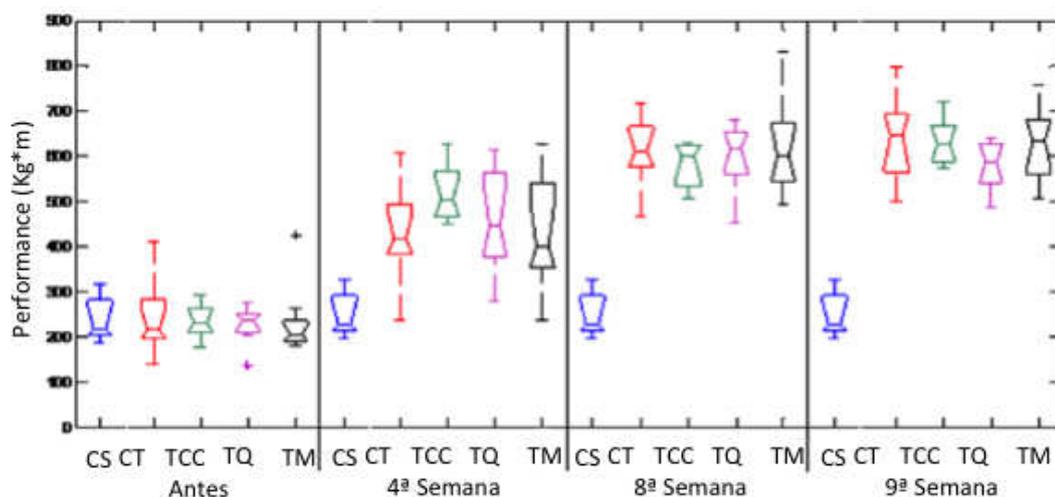


Figura 9. Desempenho ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}$) ao longo das 9 semanas de treino nos grupos Controle sedentário (CS), Controle Treinado (CT), Treinado suplementado com Quercetina (TQ), Treinado suplementado com Caldo de Cana (TCC) e Treinado suplementado com Maltodextrina (TM). Diferença significativa de todos os grupos em relação ao controle sedentário na quarta, oitava e nona semana ($p < 0,001$). Diferença significativa da oitava e nona semana em relação a quarta semana para os grupos CT, TCC, TQ e TM ($p < 0,05$). Diferença significativa da quarta, oitava e nona semana em relação ao início do treinamento para os grupos CT, TCC, TQ e TM ($p < 0,01$).

Podemos observar que antes do início do treino não havia diferença entre os grupos. Após quatro semanas de treino todos os grupos treinados apresentam valores de trabalho superior ao grupo controle. Após a oitava e nona semanas de treino todos os grupos apresentaram valores de performance significativamente maiores do que na quarta semana. Não foram observadas diferenças significativas no desempenho entre os grupos CT, TCC, TQ e TM em nenhum dos momentos analisados.

4.4.2 Atividade das Enzimas Antioxidantes

A Figura 10 apresenta a atividade da enzima catalase após nove semanas de treinamento de endurance nos diferentes grupos.

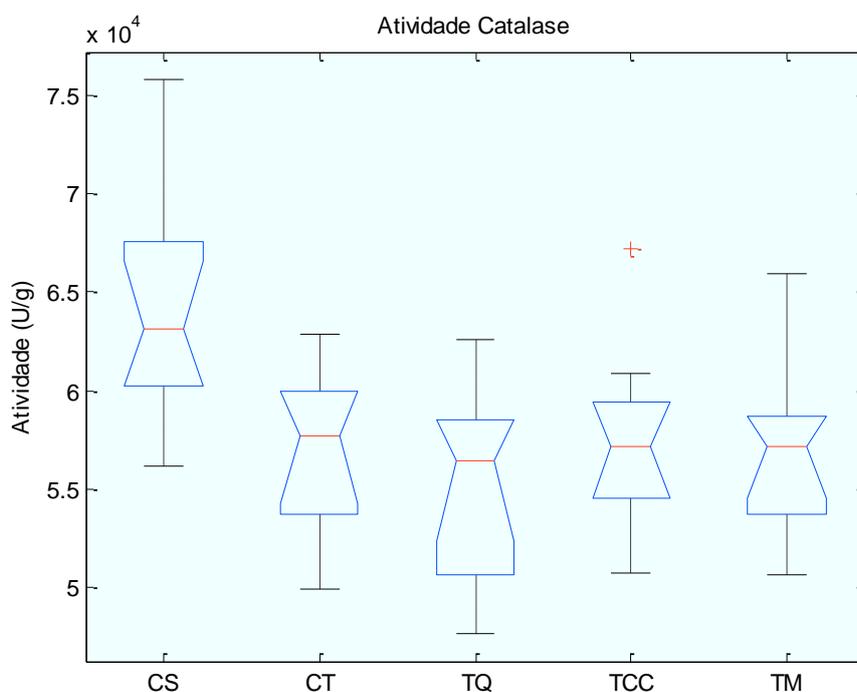


Figura 10. Atividade da enzima catalase após nove semanas de treinamento nos diferentes grupos: Controle sedentário (CS), Controle Treinado (CT), Treinado suplementado com Quercetina (TQ), Treinado suplementado com Caldo de Cana (TCC) e Treinado suplementado com Maltodextrina (TM). Todos os grupos apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Podemos observar que houve uma diminuição significativa da atividade da enzima catalase nos grupos treinados e suplementados em relação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas entre a atividade desta enzima nos grupos suplementados em relação ao grupo controle treinado.

A figura 11 apresenta a atividade da enzima glutathiona redutase após nove semanas de treinamento de endurance nos diferentes grupos.

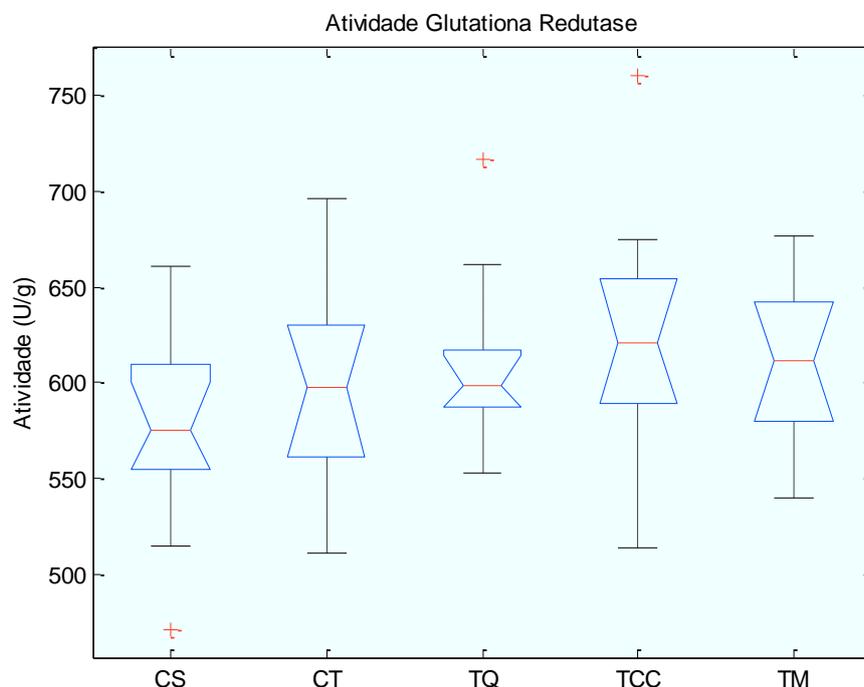


Figura 11. Atividade da enzima glutathiona redutase após nove semanas de treinamento nos diferentes grupos: Controle sedentário (CS), Controle Treinado (CT), Treinado suplementado com Quercetina (TQ), Treinado suplementado com Caldo de Cana (TCC) e Treinado suplementado com Maltodextrina (TM).

Podemos observar que não houve diferença significativa na atividade da enzima glutathiona redutase nos grupos treinados e suplementados em relação ao grupo controle. Também não foram observadas diferenças significativas entre a atividade desta enzima nos grupos suplementados em relação ao grupo controle treinado.

4.4.3 Peroxidação Lipídica

A figura 12 apresenta a concentração de TBARs após nove semanas de treinamento de endurance nos diferentes grupos.

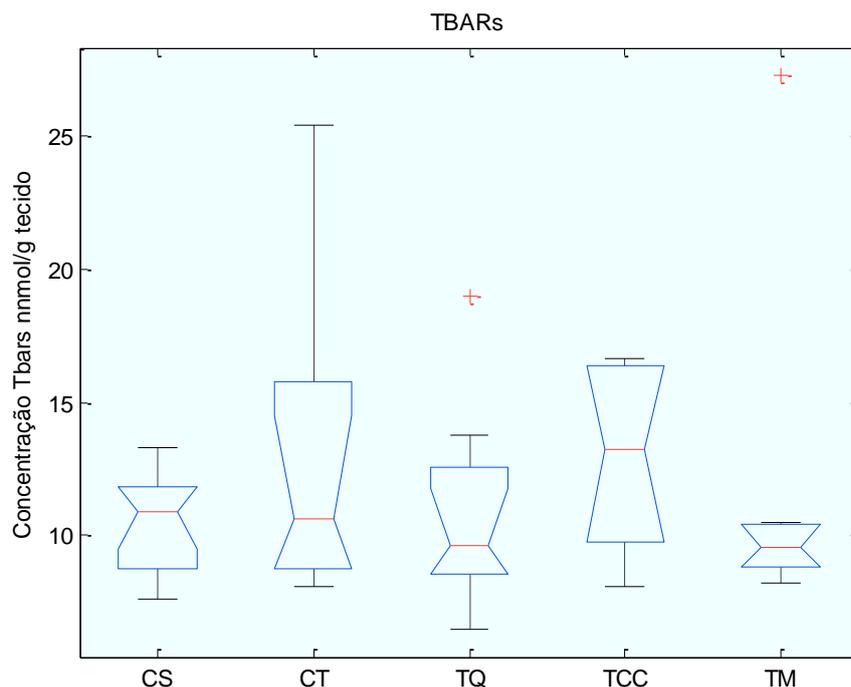


Figura 12. Concentração de TBARs após nove semanas de treinamento nos diferentes grupos: Controle sedentário (CS), Controle Treinado (CT), Treinado suplementado com Quercetina (TQ), Treinado suplementado com Caldo de Cana (TCC) e Treinado suplementado com Maltodextrina (TM).

Podemos observar que não houve diferença significativa no nível de peroxidação lipídica nos grupos treinados e suplementados em relação ao grupo controle. Também não foram observadas diferenças significativas na concentração de TBARs nos grupos suplementados em relação ao grupo controle treinado.

4.5 Discussão: Confronto dos resultados com a previsão do modelo

Neste estudo buscamos investigar os efeitos da suplementação com caldo de cana em parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratos submetidos a nove semanas de treinamento de endurance. Importante ressaltar que são poucos os estudos na literatura se preocuparam em analisar o estresse oxidativo em fígado de ratos submetidos ao exercício. Mais escasso ainda são os estudos que nestas condições tenham se preocupado em analisar os efeitos de suplementações como as utilizadas no presente trabalho.

Quando analisamos o desempenho dos animais no decorrer do treinamento, observamos que os grupos treinados e suplementados apresentaram aumento no seu desempenho indicando uma adaptação ao estímulo ao qual foram submetidos. Ao mesmo tempo não foram observadas diferenças entre a performance dos grupos que ingeriram caldo

de cana (TCC), maltodextrina (TM) e quercetina (TQ) pós treino em relação ao grupo controle treinado (CT) que ingeriu apenas água. Este fato nos indica que as suplementações não tiveram nenhuma influência sobre o desempenho. Sendo esta a primeira informação que retiramos através da análise dos dados de desempenho.

Em relação à atividade das enzimas antioxidantes, encontramos uma diminuição significativa na atividade da catalase nos grupos CT, TCC, TM e TQ em relação ao controle sedentário (CS). Porém não houve diferença entre a atividade dos grupos suplementados em relação ao grupo controle treinado. No caso da atividade da enzima glutatona redutase, não foram encontradas diferenças significativas entre nenhum grupo. Esses resultados geram uma informação contrária à previsão do nosso modelo, ou seja tanto a atividade das enzimas quanto o desempenho dos animais não sofreram influência das suplementações. Neste momento é necessário buscar informação na literatura para ajudar no entendimento das informações geradas.

Nesse sentido ao contrário do que observamos, Taysi e colaboradores (2008) encontraram um aumento na defesa antioxidante em fígado de ratos submetidos a um protocolo de exercício. Já Soung et. al (1996) encontram uma maior atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase(SOD) em fígado de ratos submetidos a um protocolo de endurance.

Huang et al. (2010) submeteram ratos a um treinamento de endurance considerado exaustivo e encontraram níveis aumentados dos aminoácidos cisteína e glicina no fígado, que são precursores para a síntese de glutatona (GSH). O aumento da produção de GSH no fígado demonstrado por estes autores pode ser em virtude de um aumento da defesa antioxidante ocasionado pela alta produção de EROs no exercício. Neste contexto, Sun e colaboradores (2010) mostraram que o treinamento de endurance pode causar estresse oxidativo no fígado de ratos.

Ao analisar a atividade das enzimas antioxidantes, e comparar com os dados da literatura, nossos dados sugerem que não houve a instalação de um quadro de estresse oxidativo no fígado destes animais uma vez que os níveis de peroxidação lipídica avaliados pela concentração de TBARs não apresentaram diferenças entre os grupos. Níveis baixos de peroxidação lipídica justificam a resposta das atividades das enzimas CAT e GR encontradas nos grupos treinados e suplementados. Os dados em conjunto sugerem que os animais estavam em condições favoráveis para se adaptar ao estímulo do treino proposto.

Estes resultados também podem indicar que outros componentes do sistema de defesa antioxidante podem ter respondido ao estímulo do treino impedindo a instalação de

um quadro de estresse oxidativo. Dados recentes do nosso laboratório mostram que em músculo de ratos submetidos a este mesmo protocolo de treinamento a enzima superóxido dismutase (SOD) apresenta um aumento na sua atividade enquanto que o comportamento da CAT e GR foram parecidos com os encontrados no fígado (FERRARESSO, 2010). Isto nos sugere que a SOD parecer ser mais sensível que as demais enzimas na resposta ao treino.

As respostas enzimáticas observadas nos grupos suplementados indicam que as soluções ingeridas pós-treino não tiveram influencia sobre a atividade das enzimas CAT e GR. O comportamento observado representa apenas a resposta adaptativa ao treino uma vez que os valores se encontram próximos aos encontrados no grupo CT. 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.

Importante ressaltar que as suplementações realizadas neste estudo não influenciaram a resposta adaptativa ao treino proposto uma vez que não foram observadas diferenças entre os grupos suplementados e o grupo controle treinado. Alguns autores propõem que a ação antioxidante da suplementação pode estar inibindo as vias de sinalização sensíveis ao estado redox da célula, responsáveis pelas adaptações contra futuros danos oxidativos (Radack et al, 2005; Padilha et al. 2007).

Cabrera e colaboradores (2005) demonstraram que ao inibir a via da xantina oxidase (geradora de EROs durante o exercício) com suplementação de Allopurinol em ratos, não era estimulado vias de sinalização importantes para a resposta adaptativa como o complexo proteico NF-KB (Factor nuclear Kappa B) que promove a transcrição de genes que expressam proteínas constituintes das enzimas antioxidantes.

Corroborando com nossos dados, Yafant et al. (2009) demonstraram que a suplementação com antioxidantes não alteram as adaptações ao treinamento de endurance em homens jovens treinados. Assim como Wadley & Mconell (2010) demonstraram que altas doses de vitamina C não impedem a biogênese mitocondrial em músculo esquelético de ratos submetidos a um treinamento de endurance.

Entretanto é importante ressaltar que para que as respostas sejam positivas a ingestão de antioxidantes é preciso conhecer a quantidade adequada a ser ingerida. Doses excessivas destes compostos podem ter efeito inverso. Ao invés de atuar como antioxidante os mesmos agem como pró-oxidante provocando efeitos deletérios no organismo. Neste sentido, Knez e colaboradores (2007) num estudo realizado com atletas de Ironman que foram

suplementados com vitamina E os autores encontraram um maior estresse oxidativo no grupo suplementado comparado ao não-suplementado.

O grande problema das suplementações com antioxidantes é que para a maioria dos compostos esta quantidade ótima para o efeito positivo não é conhecida. Sendo assim necessária grande cautela na utilização dos mesmos como suplementos.

4.6 Conclusão: Gerando a nova informação

Visto que as EROs podem agir de maneiras antagônicas podendo causar dano oxidativo as células ou regular a expressão de enzimas do sistema de defesa antioxidante, há na literatura uma discussão a respeito da utilização ou não de antioxidantes como suplemento para pessoas fisicamente ativas. Nosso estudo apesar de analisar apenas alguns parâmetros do estresse oxidativo no fígado de ratos suplementados aponta para uma não ocorrência do efeito ergogênico da suplementação, assim como não mostrou nenhum prejuízo nas adaptações induzidas pelo exercício.

Em nosso estudo, não observamos efeitos deletérios da suplementação com os antioxidantes do caldo de cana e da quercetina. Os dados indicam que possivelmente todos os animais se adaptaram ao treinamento ao qual foram submetidos. Como aparentemente o treino não levou a instalação de um quadro de estresse oxidativo as suplementações não apresentaram efeito adicional. Esses resultados reforçam que uma vez que as cargas de treino estejam bem planejadas, o tempo de recuperação e alimentação adequados, a suplementação com antioxidantes não é necessária.

Além disto, os dados mostram com clareza que a quantidade de antioxidantes presentes no caldo de cana não leva a nenhum prejuízo nas vias intracelulares que sinalizam a adaptação ao treino. Neste contexto, este alimento pode ser uma alternativa prática e barata para ser utilizada por atletas como bebida pós-treino auxiliando na hidratação e como fonte de carboidrato para recuperação do glicogênio tanto muscular como hepático.

No entanto mais estudos precisam ser realizados para se verificar a quantidade ótima de antioxidante que devem ser ingerida para que possamos investigar um possível efeito positivo destes compostos, principalmente de flavonóides 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.

Futuras investigações também se fazem necessária para analisar outros

parâmetros de estresse oxidativo que possam ser mais sensíveis tanto na resposta ao treino quanto a da própria suplementação e desta forma compor um quadro mais geral das respostas desencadeadas neste contexto.

5 CONCLUSÃO DO TRABALHO

O objetivo deste trabalho de final de curso foi mostrar a aplicabilidade do método científico na pesquisa na área de educação física através de um estudo experimental em laboratório.

Notamos na discussão do estudo experimental que a previsão do modelo proposto quando confrontada com os dados obtidos empiricamente não foi confirmada. Os dados indicaram que o quadro de estresse oxidativo não ocorreu e ficou evidente que as respostas encontradas eram decorrentes do processo de adaptação ao treinamento.

Como discutido anteriormente não é demérito do pesquisador que a hipótese não seja comprovada, desde que este entenda o fenômeno ocorrido e busque informações que auxiliem a explicá-lo. Embora todas as variáveis tenham sido cuidadosamente controladas, o fenômeno não se expressou levando assim a outras conclusões e levantando outras possibilidades de estudo.

Isto só foi possível devido a compreensão e planejamento minucioso de cada etapa. A informação gerada com o estudo permite que os profissionais da área utilizem o caldo de cana, conforme as recomendações nutricionais para atletas e praticantes de atividade física, sabendo que nestas quantidades o processo adaptativo não está sendo prejudicado.

Além desta afirmação, levantamos outras hipóteses para serem investigadas como por exemplo, a possibilidade da enzima SOD, primeira enzima do sistema de defesa antioxidante, ser mais sensível a alteração no estado redox gerada neste tipo de treino. Além disto, podemos pensar que esta suplementação seja interessante para o combate de radicais livres em uma condição na qual o organismo não esteja se adaptando ao treino devido a um excesso de estímulo e pouca recuperação. Nesta condição, denominada na literatura como overtraining, a produção de EROs pode ser exacerbada de modo que o aumento na disponibilidade de antioxidantes seja favorável para evitar os possíveis efeitos deletérios.

Fica evidente a contribuição do método científico para o desenvolvimento do trabalho permitindo que uma nova informação fosse gerada, mesmo que não confirmando a hipótese de trabalho, atingindo o objetivo da ciência de gerar conhecimento bem como perspectivas para futuras investigações.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No título deste trabalho a referência “Introdução ao método Científico[...]” é proposital visto a infinidade de conhecimento que o método científico abrange o qual este trabalho não daria conta de discutir. A idéia foi chamar a atenção dos profissionais da área da educação física para a existência do mesmo.

O profissional de educação física é antes de tudo um educador como o próprio nome curso já diz. Contudo, não é um educador apenas de um corpo saudável como visto pela ótica higienista decorrente do período militar em nosso país (CASTTELANI FILHO, 1988). O profissional é também um agente social e portanto deve estar preocupado com a formação de cidadãos críticos. Este papel deve ser exercido tanto na escola quanto na academia, no clube, com atletas ou alunos de personal trainer.

Para que isto ocorra, em primeiro lugar o profissional precisa ser crítico, compreender o que aplica, por que faz, as consequências do que planejou, se os objetivos foram atingidos etc. Para isto, o método científico pode se uma ferramenta interessante para ser aplicado no dia-a-dia viabilizando o aprendizado e fazendo com que o profissional cresça de modo consciente. Com isto ressaltamos que a aplicação do método científico vale para qualquer área do conhecimento que envolve a educação física não sendo exclusivo da área de biológicas.

Ao pensar em um planejamento semestral de educação física na escola consideramos que um profissional diferenciado vai seguir um conjunto de regras e idéias, baseados em princípios da pedagogia, para elaborar o programa que será aplicado com os alunos ao longo do semestre. Neste sentido, buscará informações a respeito da sociedade e contexto cultural que os alunos estão envolvidos elaborando práticas e conteúdos que sejam de interesse dos mesmo buscando integrar o ambiente sociocultural no qual estão envolvidos na tentativa de formar alunos críticos e conscientes. Ao final de cada semestre o professor avalia o conhecimento gerado, confronta com o modelo proposto no início do semestre com o intuito de conhecer as metodologias que deram certo ou errado. O conhecimento gerado e as prática adotadas servem como exemplo para outros profissionais da área fazendo com que o conhecimento na educação física escolar cresça.

Da mesma forma, o treinador quando elabora uma periodização para um atleta, também pode se pautar no método científico. Em uma periodização o treinador segue um conjunto de regras e metodologias baseadas em princípios do treinamento, fisiológicos e bioquímicos para manipular as cargas de treino de acordo com os objetivos que se pretende

alcançar em determinado período. Pensando em como as variáveis (volume, carga, frequência, intensidade) serão manipuladas, quais serão as formas de controle da eficiência do treinamento (avaliação), ao final será possível verificar os treinos que deram certo, que foram mais eficientes e visualizar os erros frente ao modelo inicial proposto. Desta forma, este profissional também estará contribuindo para o conhecimento na área de treinamento esportivo.

Notamos em ambos exemplos que podemos qualificar situações das vertentes analíticas e empíricas, bem como a etapa de confronto do modelo proposto com os resultados obtidos. No entanto muitos profissionais realizam estas atividades sem possuírem o entendimento ou existência do método científico. Isto não significa que realizam sua prática de maneira errada ou ruim. Contudo, o entendimento do método científico auxiliaria a elaborar melhor as etapas, visualizar e ajustar erros que muitas vezes não são percebido devido a falta de “pensar” no planejamento e de se estabelecer onde se quer chegar com o aluno/atleta.

Para Alves (2008) existe na sociedade um estereótipo de que cientista são pessoas dotadas do conhecimento absoluto, ou seja, da verdade absoluta. Quando na verdade a própria investigação científica é um processo de erros e correções que geram o conhecimento. Isto gera uma separação do que é cientificamente aceito e aquilo que pertence ao senso comum. O próprio senso comum só existe em conjunto com a ciência e a própria ciência se utiliza de conceitos do senso comum para gerar seu conhecimento científico. Nesse sentido o método científico é caminho a ser seguido para tentar transformar as interpretações a respeito do universo o mais confiável possível. Diversas analogias de aplicações do método científico no senso comum podem ser feitas, como um mecânico que procura um problema no motor de um carro, ou uma cozinheira que separa e testa ingredientes no preparo de um bolo, ou uma mãe que leva seu filho ao médico pois elaborou uma hipótese que seu filho possa estar doente através de informações obtidas como, temperatura, vômitos e fraqueza do corpo de seu filho.

O fato dos cientistas buscarem o conhecimento de maneira mais sistematizada não os torna donos da verdade absoluta, mas apenas pessoas mais críticas e rigorosas quanto as questões que permeiam o universo na tentativa de interpreta-las. No entanto a mãe quando leva seu filho ao médico não pergunta o porque que ele deve tomar tal remédio, apenas cumpre as ordens do médico. O mecânico está preocupado se o motor vai funcionar ou não, mas não entende o fenômeno físico envolvido na combustão da gasolina que gera uma energia para o movimento dos pistões. Assim como a cozinheira não se

pergunta sobre o que acontece na reação química que faz seu bolo crescer (ALVES, 2008).

A intenção da discussão neste trabalho foi chamar a atenção para a utilização mais rigorosa e crítica do conhecimento no ambiente da educação física para que o profissional não seja mero reprodutor de “receitas” pré-estabelecidas. Mas sim se empenhe em interpretar e buscar novas informações sobre seu campo de atuação, enxergando sua prática dentro de um sistema experimental, onde existem diversas variáveis que interferem no desenvolvimento da atividade e que um novo conhecimento pode ser extraído da sua prática. Desta forma o educador físico contribui para a formação de cidadãos mais críticos e conscientes, cumprindo seu papel de agente social para uma sociedade um pouco mais esclarecida.

O intuito não é esgotar esta discussão mas sim demonstrar o quão vasto pode ser o campo de atuação e investigação, desde que exista a curiosidade, interesse na descoberta e um método a seguir.

Por se tratar de um trabalho de conclusão de curso, acreditamos que ele deve conter as experiências vividas pelo autor durante o período de graduação e estar relacionado com suas perspectivas futuras podendo assim servir de base para algum outro aluno que percorra este mesmo caminho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in Enzymology**, v. 105, p.121-126, 1984.
- ALESSIO, H. M. Exercise-induced oxidative stress. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 25, p.218-224, 1993.
- ALVES, R. **Filosofia da Ciência: Introdução ao jogo e a suas regras**. São Paulo: Loyola, 2008.
- BEHLING, E.B.; et al. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- Bloomer R.J. Effect of exercise on oxidative stress biomarkers. **Adv Clin Chem.** v.46, p.1–50, 2008.
- BOMPA, T.O. **Periodização: teoria e metodologia do treinamento**. São Paulo, Phorte Editora, 2001.
- BRACHT, Adelar; ISHII-IWAMOTO, Emy Luiza. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. Barueri: Manole, 2003.
- BRENZIKOFER, R. Introdução as ciências experimentais e ao método científico.
BRENZIKOFER, R.; RIBEIRO, C.A. **F-129: Física experimental**. Campinas: IFGW, 1998. Apostila de disciplina.
- BRENZIKOFER, R. O método científico: um desafio permanente. **Anais do IV Congresso nacional de biomecânica**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- BRUIN, G.; KUIPERS, H.; KEIZER, H.A.; VANDER YUSSE, G.J. Adaptation and overtraining in horses subjected to increasing training loads. **J. Appl. Physiol.** v.76, p.5, p.1908-1913. 1994.
- CARNETHON, M.R.; et al. Cardiorespiratory fitness in young adulthood and the development of cardiovascular disease risk factors. **JAMA**, v. 290, p. 3092-3100. 2003.
- CASTELLANI FILHO, Lino. **Educação Física no Brasil:a história que não se conta**. Campinas: Papirus, 1988.
- CERQUEIRA, F.M.; et al. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.
- DAOLIO, Jocimar. **Cultura, Educação Física e Futebol**. 3. ed. Campinas: Unicamp, 2006.
- DARDEN, Lindley. **The Nature of Scientific Inquiry**. Disponível em: <<http://www.philosophy.umd.edu/Faculty/LDarden/sciinq/>>. Acesso em: 30 ago. 2011.
- DA SILVA L. A.; et al.Effect of different models of physical exercise on oxidative stress markers in mouse liver. **Appl. Physiol. Nutr. Metab**, v. 34, p. 60–65, 2009.

DAVIES, K.J.A.; et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v.107, n.4, p.1198-1205, 1982.

DEPRÁ, Pedro Paulo. **Desenvolvimento de um laboratório básico de biomecânica**. 1998. 171 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

DORIA FILHO U. Introdução à bioestatística: Para simples mortais. **Ed. Elsevier**. São Paulo, 1999.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; et al. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods Hum Nutr**, v.,61, p.187-92, 2006.

DUNCAN, K.; et al. Running exercise may reduce risk for lung and liver cancer by inducing activity of antioxidant and phase II enzymes. **Cancer Lett**, v. 116,p. 151-158. 1997.

FERRARESSO, R. Estudo da relação entre ataque oxidativo, sistema de defesa antioxidante e atividade mitocondrial em ratos submetidos a um protocolo de indução ao overtraining em esteira. **Dissertação de mestrado, Instituto de Biologia – UNICAMP**. 2010.

FERREIRA, A.L.A.; et al. Radicais Livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n.1, p.61-8, 1997.

FRY, R. W.; MORTON, A. R.; KEAST, D. Periodisation of training stress - a review. **Can. J. Sports Sci**, v. 17, n.3, p.234-240, 1992.

GEWANDSZNAJDER, Fernando. **O que é o método científico**. São Paulo: Pioneira, 1989.

GIBSON, Michael. **Deuses e Heróis da Grécia Antiga**. Lisboa/são Paulo: Editorial Verbo, 1978.

GOMEZ-CABRERA, M.; et al..Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. **J. Physiol**, v.567, p.113-120, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HAMILTON, K.L.; et al. Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. **Free Radic Biol Med**, v. 34, p. 800–809, 2003.

HAWKINS, S.A.; et al. Exercise and the master athlete—a model of successful aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v. 58, p. 1009–1011, 2003.

HEGENBERG, Leônidas. **Etapas da Investigação Científica: Leis, Teorias, Método**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária, 1976.

HOENE, M.; et al. Activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathway in the liver of mice is related to plasma glucose levels after acute exercise. **Diabetologia**, v.53, p. 1131-1141, 2010.

HOHL, R.; et al. Development and Characterization of an Overtraining Animal Model. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 41, n.5, p. 1115-1163, 2009.

HOOD, D.A. Plasticity in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle Invited Review: Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **J Appl Physiol**. v. 90, p. 1137–1157, 2001.

HOPKINS W.G. Measures of reliability in sports medicine and science. **Sports Med**, v. 30,n.1, p. 1-15, 2000.

HUANG, C.C.; et al. Metabolomics investigation of exercise-modulated changes in metabolism in rat liver after exhaustive and endurance exercises. **Eur J Appl Physiol**, v. 108, p.557–566, 2010.

JENTJENS, R.; JEUKENDRUP, A.E. Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. **Sports Med**, v.33, n.2, p. 117-144, 2003.

JI, L.L. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. **Ann NY Acad Sci**, v. 959, p. 82–92. 2002.

JI, L.L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Med. Sci. Sports Exerc**, v.25, n.2, p. 225-231.1993.

KNEZ, W. L.; et al. Oxidative stress in half and full ironman triathletes. **Med. Sci. Sports Exerc**, v.39, p. 283-288, 2007.

KOCHE, José Carlos. **Fundamentos da metodologia científica. Teoria da ciência e prática da pesquisa**. 14. ed. Petrópolis: Vozes, 1997.

LEEUWENBURGH, C.; JI, L.L. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. **Arch Biochem Biophys**, v. 316, p. 941–949. 1995.

LIU, J.; YEO, H.C.; et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **Journal of Applied Physiology**, v.89, p. 21–28, 2000.

MACHADO, E.F.A.; et al. Effects of different general anesthetics on serum hemolysis and hepatic and muscular glycogenolysis in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.42, 2009.

MCARDLE, A.; et al. Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. **FASEB J**, v.18, p. 355–357, 2004.

MEIS, Leopoldo; RANGEL, Diucêncio. **O método científico: como o saber mudou a vida do homem**. Rio de Janeiro: Vieralent, 2005.

MEYDANI, M. E.; EVANS, W.J. Free radicals, exercise, and aging. In: Yu BP, Ed. **Free Radicals in Aging**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 183–204, 1993.

OHARA, A. Radicais livres: bons, maus e naturais. **Ed. Oficina de Textos**. São Paulo, 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. ASSAY FOR LIPID PEROXIDES IN ANIMAL TISSUES BY THIOBARBITURIC ACID REACTION. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OTTONI, HOMERO. **KARL POPPER E A FILOSOFIA DA CIÊNCIA**. DISPONÍVEL EM: <[HTTP://BULEVOADOR.HAAAN.COM/2010/03/8937/](http://BULEVOADOR.HAAAN.COM/2010/03/8937/)>. ACESSO EM: 04 OUT. 2011.

PADILLA, J.; MICKLEBOROUGH, T.D. Does Antioxidant Supplementation Prevent Favorable Adaptations to Exercise Training? **Med Sci Sports Exercise**, v.39, n.10, 2007.

POWERS, S.K.; JACKSON, M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev**, v. 88, p.1243–1276, 2008.

POWERS, S.K.; JI, L.L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Med Sci Sports Exerc**, v.31, n.7, p.987-997, 1999.

RADAK, Z.; CHUNG, H.Y.; GOTO, S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging **Biogerontology**, v. 6, p. 71–75, 2005.

RADAK, Z.; TAYLOR, A.W.; OHNO, H.; GOTO, S. Adaptation to exercise induced oxidative stress: From muscle to brain. **Exerc Immunol Rev**, v.7, p. 90-107, 2001.

RADAK, Z.; et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radic Biol Med**, v.27, p. 69–74, 1999.

SANG-HOON, SUH.; IL-YOUNG PAIK, KEVIN A. J. Regulation of Blood Glucose Homeostasis during Prolonged Exercise. **Mol. Cells**, v. 23, n. 3, p. 272-279, 2007.

SJÖDIN, B; HELLSTEN-WESTING, Y; APPLE FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Med**, v.10, n.4, p. 236-54, 1990.

SONG, Y. J.; IGAWA, S.; HORII, A. Antioxidants enzymes response to endurance exercise training and dietary proteins in rat skeletal muscle and liver. **Applied Human Science**, v.15, n.5, p. 219-225, 1996.

SMITH, L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Med. Sci. Sports Exerc.** v.32, n.2, p. 317-331, 2000.

SMITH, I.K. ; VIERHELLER T.L. ; THORNE, C.A. Assay of Glutathione Reductase in Crude Tissue Homogenates using 5, 5-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid). **Anal Bioch**, v.175, p. 408-413, 1988.

SUN, L.; SHEN, W.; ZHONGBO, L.; GUAN, S.; LIU, J.; DING, S. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. **Life Sciences**, v.86, p.39–44, 2010.

SUPINSKI, G. Free radical induced respiratory muscle dysfunction. **Mol Cell Biochem.** v. 179, n.1-2, p. 99-110, 1998.

TAYSI, S.; et al. Endurance training attenuates the oxidative stress due to acute exhaustive exercise in rat liver. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 95, n.4, p. 337–347, 2008.

TIIDUS, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v.76, p. 553-538, 1998.

TORRES, Bayardo B.; MARZZOCO, Anita. **Bioquímica Básica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

TURRENS, J.F.; et al. Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. **Free Radical Res Commum**, v.2, p. 681-689, 1991

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of Malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Bioch**, v.86, p. 271-278, 1978.

VOLLAARD, N.B.; SHEARMAN, J.P.; COOPER, C.E. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. **SportsMed**, v.35, p.1045–1062, 2005.

WADLEY, G.D.; MCCONELL, G.K. 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**, v.108, p.1719-1726, 2010.

WANNAMETHEE, S.G.; SHAPERAG; WALKER, M. Changes in physical activity, mortality, and incidence of coronary heart disease in older men. **Lancet**, v. 351, p. 1603–1608, 1998.

WEINECK, J. **Treinamento ideal : instruções técnicas sobre o desempenho fisiológico, incluindo considerações específicas de treinamento infantil e juvenil.** 9ª Edição, Editora Manole, São Paulo, 2003.

YAGI. K.A. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochemistry and Medicine**, v.50, p. 1075-1083, 1976.

YFANTI, C.; et al. Antioxidant Supplementation Does Not Alter Endurance Training Adaptation. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. 1388 – 4207. 2010.

ZAIDI, S.M.K.R.; AL-QIRIM, T.M.; BANU, N. Effects of Antioxidant Vitamins on Glutathione Depletion and Lipid Peroxidation Induced by Restraint Stress in the Rat Liver. **Drugs R D**, v.6, n.3, p. 157-165, 2005.