

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

Lucio Marques Vieira Souza

Exercício resistido de alta intensidade e suplementação de produto natural atenuam
biomarcadores de estresse oxidativo e danos musculares

Juiz de Fora
2024

Lucio Marques Vieira Souza

Exercício resistido de alta intensidade e suplementação de produto natural atenuam biomarcadores de estresse oxidativo e danos musculares

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Educação Física. Área de concentração: Exercício e Esporte.

Orientador: Dr. Ciro José Brito

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica Elaborado através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Lucio Marques Vieira .

Exercício resistido de alta intensidade e suplementação de produto natural atenuam biomarcadores de estresse oxidativo edanos musculares / Lucio Marques Vieira Souza. -- 2024.

39 p. : il.

Orientador: Ciro José Brito

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Educação Física. Programa de Pós-Graduação em Educação Física, 2024.

1. treinamento físico. 2. suplementos à base de plantas medicinais. 3. Schinus terebentifolius. 4. Wistar. I. Brito, Ciro José, orient. II. Título.

Lucio Marques Vieira Souza

Exercício resistido de alta intensidade e suplementação de produto natural atenuam biomarcadores de estresse oxidativo e danos musculares

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Educação Física da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Educação Física. Área de concentração: Exercício e Esporte

Aprovada em 04 de abril de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ciro José Brito - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Jymmys Lopes dos Santos
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Samuel Bruno dos Santos
Instituto Federal de Sergipe

Prof^a. Dr^a. Andréia Cristiane Carrenho Queiroz
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Cristiano Diniz da Silva

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 11/03/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Ciro Jose Brito, Professor(a)**, em 05/04/2024, às 10:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jymmys Lopes dos Santos, Usuário Externo**, em 05/04/2024, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiano Diniz da Silva, Professor(a)**, em 05/04/2024, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andreia Cristiane Carrenho Queiroz, Professor(a)**, em 05/04/2024, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Samuel Bruno dos Santos, Usuário Externo**, em 05/04/2024, às 21:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1745994** e o código CRC **80EB7E80**.

Dedico este trabalho a minha família que me inspiram e me auxiliaram com todo suporte para mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar os meus passos.

Aos meus pais (Sr. Lucivaldo e D. Maria), que nunca mediram esforços para que eu tivesse a melhor formação educacional, por sempre apoiarem as minhas decisões independentemente se ficaria ainda mais distante. Enfim, amo vocês! Ao meu irmão (Lécio) por torcer por mim, meu obrigado.

À minha querida e amada esposa (Manuela) e aos meus filhos (Caio Lucca e Malu Marques), por entenderem a minha ausência por alguns momentos e estarem sempre com um sorriso lindo e um abraço forte carinhoso para me receberem, é por vocês todo o meu sacrifício e luta. Amo amar vocês!

Aos colegas de trabalho pelo apoio moral.

Ao meu orientador, professor Dr. Ciro José Brito, pela oportunidade, parceria e amizade. Grato aos professores Dr. Roberto Jerônimo e Dra. Lindsei Brabec pela indicação.

Aos professores Dr. Anderson Marçal e Dr. Charles Estevão, bem como os amigos Jymmys Lopes, Samuel Bruno, Rôas de Araújo, Clésio Lima e Silvan de Araújo da época do mestrado e do outro doutorado na UFS.

Aos colegas que fiz no doutorado, tanto da UFJF como da UFV, em especial aos professores Osvaldo Costa, Claudia Patrocínio e Andréia Queiroz. Bem como aos demais em Governador Valadares-MG e todos os professores que eu tive aula.

Agradeço a oportunidade de conclusão desta etapa. Outrossim, aos membros da banca, tanto da qualificação como da defesa.

Agradeço também a todos os amigos e familiares que sempre torceram por mim e acreditaram no meu potencial.

E por fim, aos meus colaboradores diretos e indiretos deixo aqui o meu muito obrigado!!!

RESUMO

Introdução: Os exercícios físicos de alta intensidade podem causar estresse oxidativo se não forem devidamente neutralizados por agentes antioxidantes endógenos e ou exógenos, da mesma forma os danos musculares se não tiverem uma recuperação adequada, podendo vir a lesionar os tecidos envolvidos na ação muscular. Diversas plantas medicinais vêm sendo utilizadas como antioxidantes e anti-inflamatórias. Objetivo: O presente estudo teve como objetivo avaliar o exercício físico resistido de alta intensidade (EFAI) associado ao extrato etanólico (EE) das folhas de *Schinus Terebenthifolius* nos parâmetros oxidativos e danos musculares em ratos Wistar. Metodologia: Os animais foram divididos em 04 grupos (n=10/grupo): 1. Controle (GC) - animais que não realizaram a sessão EFAI e tratados com veículo (água destilada via oral); 2. Exercício agudo (EA) - submetidos a sessão aguda de exercício; 3. Exercício + veículo (EV) - composto por animais que fizeram a sessão e tratados com veículo e 4. Exercício + extrato (EX) animais administrados com EE de *Schinus Terebenthifolius* (100mg/Kg, via oral) e que fizeram a sessão de exercício. O EE de *Schinus Terebenthifolius* demonstrou, *in vitro*, elevada atividade antioxidante ($13,88 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$). Antes do período experimental, foi mensurado o lactato nos momentos pré e pós dos grupos EA ($p < 0,0001$) e EX ($p < 0,0001$). Após a sessão aguda, foram avaliados: estresse oxidativo {malondialdeído (MDA), grupos sulfidríla (SH) e redução férrica antioxidante (FRAP)}, dano muscular (creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH)), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Resultados: Nas análises *in vivo* houveram diferenças significativas do grupo EX comparado aos EA e EV, respectivamente: hepático (MDA: $p < 0,0001$ e SH: $p = 0,0033$, em ambos; FRAP: $p = 0,0011$ e $p = 0,0047$), muscular (MDA, SH e FRAP: $p < 0,0001$, em ambos; CK: $p = 0,0001$ e $p < 0,0001$; LDH: $p < 0,0001$, em ambos), níveis séricos (MDA: $p = 0,0003$ e $p = 0,0012$; SH: $p = 0,0056$ e $p = 0,0200$; FRAP: $p = 0,0017$ e $p = 0,0165$). Não houve diferença significativa nos marcadores ALT e AST. Conclusão: Conclui-se que o EE de *Schinus Terebenthifolius* associado ao EFAI atenuou os danos oxidativos e musculares em ratos.

Palavras-chave: treinamento físico; suplementos à base de plantas medicinais; *Schinus terebenthifolius*; Wistar.

ABSTRACT

Introduction: High-intensity physical exercises can cause oxidative stress if they are not properly neutralized by endogenous and/or exogenous antioxidant agents, in the same way muscle damage if they do not have adequate recovery, which can injure the tissues involved in muscular action. Several medicinal plants have been used as antioxidants and anti-inflammatory drugs. Objective: The present study aimed to evaluate high-intensity resistance physical exercise (EFAI) associated with ethanolic extract (EE) of *Schinus Terebenthifolius* leaves on oxidative parameters and muscle damage in Wistar rats. Methodology: The animals were divided into 04 groups (n=10/group): 1. Control (CG) - animals that did not perform the EFAI session and were treated with vehicle (orally distilled water); 2. Acute exercise (AS) - subjected to an acute exercise session; 3. Exercise + vehicle (EV) - composed of animals that underwent the session and were treated with vehicle and 4. Exercise + extract (EX) animals administered with EE from *Schinus Terebenthifolius* (100mg/Kg, orally) and that underwent the treatment session exercise. EE from *Schinus Terebenthifolius* demonstrated, *in vitro*, high antioxidant activity ($13.88 \pm 0.36 \mu\text{g/mL}$). Before the experimental period, lactate was measured in the pre and post moments of the EA ($p < 0.0001$) and EX ($p < 0.0001$) groups. After the acute session, the following were evaluated: oxidative stress {malondialdehyde (MDA), sulfhydryl groups (SH) and ferric reduced antioxidant (FRAP)}, muscle damage (creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH)), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Results: In *in vivo* analyses, there were significant differences in the EX group compared to EA and EV, respectively: hepatic (MDA: $p < 0.0001$ and SH: $p = 0.0033$, in both; FRAP: $p = 0.0011$ and $p = 0.0047$), muscle (MDA, SH and FRAP: $p < 0.0001$, in both; CK: $p = 0.0001$ and $p < 0.0001$; LDH: $p < 0.0001$, in both), serum levels (MDA: $p = 0.0003$ and $p = 0.0012$; SH: $p = 0.0056$ and $p = 0.0200$; FRAP: $p = 0.0017$ and $p = 0.0165$). There was no significant difference in ALT and AST markers. *Conclusion:* It is concluded that the EE of *Schinus Terebenthifolius* associated with EFAI attenuated oxidative and muscle damage in rats.

Keywords: physical training; supplements based on medicinal plants; *Schinus terebenthifolius*; Wistar.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio da citotoxicidade in vitro | 24 |
| Figura 2 - Efeito do exercício físico de alta intensidade associado (EFAI) ao Extrato Etanólico (EE) de <i>S. Terenbinthifolius</i> sobre biomarcador de estresse oxidativo a danos lipídicos no tecido hepático (A), músculo esquelético quadríceps (B) e sangue (C)..... | 25 |
| Figura 3 - Efeito do exercício físico de alta intensidade associado (EFAI) ao Extrato Etanólico (EE) de <i>S. Terenbinthifolius</i> nos grupamentos sulfidrilas no tecido hepático (A), musculo esquelético quadríceps (B) e sangue (C). | 26 |
| Figura 4 - Efeito do exercício físico de alta intensidade associado (EFAI) ao Extrato Etanólico (EE) de <i>S. Terenbinthifolius</i> na capacidade antioxidante FRAP no tecido hepático (A), musculo esquelético quadríceps (B) e sangue (C) de ratos Wistar | 28 |
| Figura 5 - Efeito do exercício físico de alta intensidade associado (EFAI) ao Extrato Etanólico (EE) de <i>S. Terenbinthifolius</i> nos marcadores de danos teciduais: CK (A), LDH (B), ALT (C) e AST (D)..... | 29 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Teste do Lactato Sanguíneo | 23 |
| Tabela 2 - Atividade antioxidante do extrato etanólico de <i>S. Terenbinthifolius</i> determinada pelo teste DPPH..... | 23 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| ALT | Alanina aminotransferase |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| CEUA | Comitê de Ética no Uso de Animais |
| CK | Creatina quinase |
| COBEA | Colégio Brasileiro de Experiências com Animais |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |
| EA | Grupo Exercício Agudo |
| EE | Extrato etanólico |
| EFAI | Exercícios físicos resistidos de alta intensidade |
| EO | Estresse oxidativo |
| EPM | Erro padrão da média |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| EV | Grupo Exercício + Veículo |
| EX | Grupo Exercício + Extrato |
| FeSO ₄ | Sulfato ferroso |
| FRAP | Ferric Reducing Ability of Plasma |
| GC | Grupo Controle |
| IAA. | Índice de atividade antioxidante |
| LDH | Lactatodesidrogenase |
| LQPNB | Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioquímica |
| NUPESIN | Núcleo de Pesquisa em Sinalização Intracelular |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SIGEN | Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TCM | Teste de carga máxima |
| tióis | Sulfrídilas totais |
| UFS | Universidade Federal de Sergipe |
| VO ₂ | Consumo de oxigênio |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 JUSTIFICATIVA | 14 |
| 1.2 HIPÓTESES | 14 |
| 1.3 OBJETIVOS | 15 |
| 1.3.1 Objetivo geral | 15 |
| 1.3.2 Objetivos específicos | 15 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 2.1 Coleta, Identificação e processamento do material vegetal | 16 |
| 2.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> | 16 |
| 2.3 Análise de Citotoxicidade <i>in vitro</i> | 17 |
| 2.4 Animais..... | 18 |
| 2.6 Protocolo do exercício físico resistido de alta intensidade | 19 |
| 2.7 Teste do lactato sanguíneo | 19 |
| 2.8 Eutanásia | 20 |
| 2.9 Determinação de MDA/TBARS <i>in vivo</i> | 20 |
| 2.10 Determinação de sulfridrilas totais (tióis) | 21 |
| 2.11 Determinação dos marcadores de danos teciduais | 21 |
| 2.12 Determinação da capacidade antioxidante | 21 |
| 2.13 Análise estatística..... | 22 |
| 3 RESULTADOS | 23 |
| 4 DISCUSSÃO | 31 |
| 5 CONCLUSÃO | 34 |
| REFERÊNCIAS | 35 |
| ANEXO A – Artigo publicado | 38 |

1 INTRODUÇÃO

Os exercícios físicos resistidos de alta intensidade (EFAI) demandam contrações musculares geralmente contra uma resistência externa, sendo considerado um método especializado de condicionamento para aumentar a força, resistência e potência muscular (Neves et al., 2019). E se executados de forma correta, respeitando alguns princípios do treinamento esportivo, como por exemplo a velocidade de execução, amplitude de movimento, volume e intensidade de maneira apropriada, deverão ocorrer alterações fisiológicas e metabólicas no organismo (Souza, R., et al., 2017).

Estudos relatam diversos benefícios com tal prática, desde a melhoria da força muscular (Padilha, 2017; Raymond et al, 2013), e perfil cardiovascular (De Souza Lino et al, 2018; Souza, R., et al, 2017; Speretta et al, 2016).

O EFAI pode desencadear um conjunto de eventos de isquemia e reperfusão devido ao aumento da atividade muscular e da demanda energética, e, como consequência, elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido à elevação substancial no consumo de oxigênio (VO_2) (De Araújo et al., 2019).

A produção fisiológica de EROs pode promover benefícios à saúde, por outro lado, a produção exarcebada (desequilíbrio fisiológico), ou seja, quando a capacidade intracelular de regulação não é capaz de normalizar a concentração de EROs próximo a valores fisiológicos aceitáveis, ocorre o fenômeno denominado de estresse oxidativo (EO) (Gutteridge & Halliwell, 2018).

Os efeitos advindos da prática de exercícios físicos sobre os indicadores de EO, em seus diversos mecanismos, assumem um papel importante nos processos de adaptação biológica, celular e tecidual, seja em condições patológicas ou fisiológicas (Hoshino et al., 2013), bem como nos marcadores de EO, os quais têm sido amplamente investigados no sentido de verificar as alterações entre as produções de EROs e a capacidade antioxidante de neutralização das mesmas (Parker et al., 2018). Porém, vários tipos de exercícios físicos e modelos (seres humanos e modelos animais) vêm sendo avaliados e aplicados com o intuito de esclarecer os impactos gerados tanto pelo exercício físico agudo quanto o crônico no que se refere aos diferentes marcadores bioquímicos de EO (Slusher et al., 2018).

Além disso, as EROs também estão associadas às respostas inflamatórias pós-exercício que podem promover danos musculares (Dos Santos, J.L., et al., 2014).

Entretanto, tais danos musculares e a inflamação são proporcionais ao tipo de exercício bem como à sua intensidade (Souza, L., et al., 2020).

Nesse sentido, a associação de plantas medicinais ao exercício físico vem sendo utilizada para diversas finalidades, tais como atenuação de danos musculares, oxidativos e como hiperglicemiantes (De Araújo et al., 2019; Dos Santos, J.L., et al., 2014; Dos Santos, J.D., et al., 2022; Santos et al., 2020). Dentre os diversos mecanismos relatados para elucidar, pelo menos em parte, os efeitos fisiológicos advindos das plantas medicinais, a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é a que possui maior destaque (Dos Santos, J.D., et al., 2022).

Diante disso, verifica-se uma planta popular do nordeste brasileiro pertencente a família Anacardiaceae, a qual tem como características compostos antioxidantes, como por exemplo os flavonóides, e sendo a espécie *Schinus Terebinthifolius Raddi* conhecida como “Aroeira”, como seu principal expoente (Oliveira, M., et al., 2020). Além disso, apresenta propriedades antiinflamatórias, antitumoral, cicatrizante, antipiréticas e analgésicas (De Lima Glória et al., 2017).

1.1 JUSTIFICATIVA

Portanto, por ser uma espécie que a população tem acesso com certa facilidade e o seu uso popular já é relatado, além do fato de sua associação ao exercício físico ser algo inovador. Neste sentido, a presente tese se justifica pelo fato das plantas da farmacopeia brasileira fazerem parte do imaginário popular no trato dos males à saúde, e para otimizar a recuperação fisiológica após o dano causado pelo exercício físico é fundamental assegurar algumas estratégias, entre elas a nutricional e o treinamento periodizado com o intuito de melhorar o desempenho e a performance.

1.2 HIPÓTESES

As hipóteses são que devido às suas características antioxidantes, a referida planta exerça um papel redox nos marcadores de danos. Bem como tenha atividade antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. Além disso que tenha baixa citotoxicidade. Também que tenha atenuação nos biomarcadores de estresse oxidativo e nos marcadores de danos teciduais. E por fim que haverá uma alta capacidade

antioxidante.

1.3 OBJETIVOS

A seguir serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos deste estudo.

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do exercício físico resistido de alta intensidade associado ao extrato etanólico das folhas de *Schinus Terebentifolius* sobre parâmetros oxidativos e de danos musculares em ratos *Wistar*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antioxidante in vitro e in vivo.
- Analisar a citocidade da planta medicinal.
- Analisar os biomarcadores de estresse oxidativo.
- Analisar os marcadores de danos teciduais.
- Avaliar a capacidade antioxidante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas da *S. terebinthifolius* foram coletadas no município de São Cristóvão, Sergipe, Brasil nas coordenadas (10° 55' 14.8" S, 37° 06' 11.9" O) com cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SIGEN) de nº A6AC079. Um espécime foi coletado, depositado, identificado e registrado no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (UFS) localizado no Departamento de Biologia com o voucher ASE 39748. Logo após, foram transportadas ao Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioquímica (LQPNB) no Departamento de Fisiologia da UFS, onde foram colocadas em estufa (modelo MA-037) a 37°C, com renovação e circulação de ar por 48h até completa desidratação.

Após o processo de secagem, as folhas foram reduzidas a pó utilizando-se um moinho de facas com tamis de malha fina (Tipo Willey MA430). Posteriormente, foram submetidas à extração em etanol 95% durante 5 dias na temperatura ambiente e em recipiente fechado. Em seguida, o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório (Logen Scientific®, Lagos, Nigéria), sob pressão de 50° C, para eliminação do solvente e obtenção do extrato etanólico (EE).

2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

O protocolo utilizado neste ensaio foi adaptado de Cheng, Moore, Yu (2006). Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) 0,208 mM, em metanol. Em seguida, foi preparada uma solução estoque do EE na concentração de 1 mg/mL, e, a partir desta, foram preparadas concentrações diferentes da amostra (25 - 60 µg/mL).

Posteriormente, foi calculada uma curva do ácido gálico com concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL. E, para fim de comparação com a amostra, foi utilizada a solução de concentração de 5 µg/mL do ácido gálico como controle positivo. Foram distribuídos nos poços da placa do Elisa (em triplicata) 100 µL do controle negativo (metanol); 100 µL do controle positivo (ácido gálico); e 100 µL da amostra; e em seguida, sob abrigo de luz, foram adicionados 100 µL da solução de DPPH. Para o branco, foram feitas amostras utilizando o 100 µL de cada concentração, mais 100 µL

de metanol. Ao final, o material foi incubado durante 60 minutos. Após este tempo, foi feita a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro de microplacas (UV/vis a 515 nm).

A concentração efetiva de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do radical DPPH em 50% (CE50) foi calculada usando a %DPPHREM no tempo de 60 minutos, em oposição às concentrações da amostra. Os resultados foram expressos como erro padrão da média (EPM). A atividade antioxidante também foi expressa pelo índice de atividade antioxidante (IAA), calculado de acordo com base na equação: $IAA = \text{DPPH estoque } (\mu\text{g/mL}) / \text{CE50 } (\mu\text{g/mL})$. Esta atividade antioxidante é considerada fraca quando o valor da IAA é inferior a 0,5, moderada quando o IAA é entre 0,5 e 1,0, forte quando o IAA é entre 1,0 e 2,0 e muito forte quando o valor da IAA é superior a 2,0 (Scherer & Godoy, 2009).

2.3 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

Os fibroblastos (L929) foram distribuídos em placas de 96 poços (2 x 10⁴ células / poço) e incubados por 24h em atmosfera de CO₂ a 5% a 37°C. Após esse período, o meio foi removido e as células aderidas foram tratadas com extrato de *S. terebinthefolius* nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ por 24h, nas mesmas condições de incubação. As células não tratadas foram usadas como controle e consideradas com 100% de viabilidade celular. Após o período de tratamento, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, conforme descrito na ISO 10993-5 (ISO, 2009), com modificações. Para isso, a monocamada celular foi lavada duas vezes com PBS (pH 7,4) e, em seguida, 200 μl de MTT (0,5 mg mL⁻¹ em PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados a cada poço. As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições acima, por um período de três horas. Após o tempo de incubação, o MTT foi aspirado e os cristais de formazan solubilizados em 200,0 μL dimetilsulfóxido - DMSO (Vetec por Sigma-Aldrich, EUA). Após 10 minutos, a densidade óptica foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade} = \frac{\text{absorbância (célula tratada)} \times 100}{\text{absorbância (célula de controle)}}$$

Cada experimento foi conduzido em quadruplicado e repetido pelo menos duas vezes. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (\pm DP).

2.4 ANIMAIS

Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com idade inicial de 60 dias e pesando entre 220-250g, os quais foram obtidos a partir do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa em Sinalização Intracelular (NUPESIN) da UFS. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (4/gaiola) e sob condições ambientais de temperatura de 21° a 24 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas com acesso livre a água filtrada e alimentação específica para roedores (Nuvilab®). Os procedimentos utilizados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFS (CEUA/UFS) sob o protocolo n. 2969150819 (2019), e estavam de acordo com as Diretrizes do Colégio Brasileiro de Experiências com Animais (COBEA).

2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos em 04 grupos de forma aleatória e marcados com traços nas caudas com cores diferentes (n=10):

1. Grupo Controle (GC): animais que não realizaram a sessão aguda de exercício e foram tratados com veículo (água destilada via oral) e incluídos no experimento apenas para avaliação dos níveis basais quanto aos parâmetros bioquímicos. Cor na cauda preta;
2. Grupo Exercício Agudo (EA): animais submetidos a sessão aguda de exercício. Cor na cauda azul;
3. Grupo Exercício + Veículo (EV): composto por animais que foram submetidos à sessão aguda de exercício e tratados com veículo. Cor vermelha na cauda;
4. Grupo Exercício + Extrato (EX): animais que receberam a dose do EE de *Schinus Terebenthifolius* (100 mg/Kg, via oral) e que foram submetidos à sessão aguda de exercício físico resistido de alta intensidade. Cor verde na cauda.

2.6 Protocolo do exercício físico resistido de alta intensidade

O protocolo utilizado foi adaptado de Hornberger & Farrar (2004), o qual consiste em os animais escalarem uma escada vertical medindo 1,1m x 0,18m, degrau de 2cm e com uma inclinação de 80° com implemento de carga acoplado à base da cauda. As intervenções ocorreram no período vespertino (1p.m – 5p.m).

Anteriormente, um protocolo de adaptação de subidas na escada foi aplicado a todos os grupos (2 semanas, durante 5 dias ininterruptos), sendo que na primeira semana os animais realizaram 04 séries de 06 a 10 escaladas consecutivas sem carga e com estímulo manual, com intervalo de um minuto entre as séries. Na segunda semana, os animais realizaram o mesmo protocolo, porém com sobrecarga (tubos Falcon) acoplada à porção proximal da cauda.

Quarenta e oito horas após o fim do período de adaptação, os animais pertencentes aos grupos EA, EV e EX foram submetidos a um teste de carga máxima (TCM), o qual consistiu em uma escalada com carga inicial de 75% do peso corporal, e uma carga adicional de 30g em cada escalada com um minuto de descanso entre cada subida; esse procedimento repetiu-se até que o animal completasse a oitava subida, e era finalizado quando não conseguisse efetuar uma escalada de forma completa e sem estímulo manual conforme protocolo adaptado de Raizel et al. (2016).

Após quarenta e oito horas da realização do TCM, os animais, a partir de 50% do peso corporal da última carga realizada no teste, foram submetidos a uma sessão aguda de exercício com o aumento progressivo da carga em 25% e descanso de 01 minuto entre as séries compostas de 04 a 08 escaladas até que os mesmos não conseguissem completar uma subida completa na quantidade mínima (adaptado de Raizel et al. 2016).

2.7 TESTE DO LACTATO SANGUÍNEO

Antes e após o TCM, foram coletados aproximadamente 25µl de amostras sanguíneas por meio de punção da extremidade caudal de cada animal e colocadas em tiras-teste para a quantificação da concentração de lactato (BM-Lactate®). Em seguida, estas tiras-teste contendo as amostras foram introduzidas imediatamente no analisador portátil Accutrend® Lactate para determinação das concentrações de lactato. Foram analisados somente os grupos EA e EX para efeito de demonstração

da intensidade da sessão de exercício.

2.8 EUTANÁSIA

Quarenta e oito horas após a sessão aguda de exercício físico resistido de alta intensidade, todos os grupos foram anestesiados com cetamina/xilazina (75mg/kg + 10mg/kg i.p); em seguida, efetuou-se a laparotomia para visualização da região torácica e realizada a coleta de sangue (± 5 mL) por meio de punção cardíaca; feito isso, logo em seguida, os animais foram eutanasiados por dessangramento. O sangue, após a coleta, foi imediatamente centrifugado a 4000 x g por 15 min a $\pm 4^\circ\text{C}$ e o sobrenadante armazenado a $\pm -80^\circ\text{C}$. Simultaneamente, os tecidos (músculo, fígado) foram removidos e, em seguida, lavados 3 vezes com solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%, secos e pesados. Logo após, foram homogeneizados e cada grama de tecido foi misturada com 5 mL de KCl + 10 μL de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF –100 mmol. L-1) + 15 μL de solução Triton a 10% e centrifugada a 3000 x g por 10 min a $\pm -80^\circ\text{C}$ para análises posteriores dos marcadores de estresse oxidativo.

2.9 DETERMINAÇÃO DE MDA/TBARS *IN VIVO*

Seguindo o método descrito por Lapenna et al (2001), a oxidação de lipídios foi determinada pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Alíquotas de 200 μL das amostras (sangue e tecidos) foram adicionadas a uma mistura de 400 μL formada por partes iguais de ácido tricloroacético (TCA) 15%, HCl 0,25 N e TBA 0,375%, mais 2,5 mM de butilato de hidroxitolueno (BHT) e 40 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, sendo aquecida por 30 min a 95°C em estufa. O pH da mistura foi ajustado para 0,9 com HCl concentrado. BHT foi usado para prevenir a peroxidação lipídica durante o aquecimento. Após resfriamento à temperatura ambiente e adição de 4 mL de butanol, o material foi centrifugado a 800 xg por 15 min a $\pm 4^\circ\text{C}$ e a absorbância do sobrenadante foi medida em 532 nm. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $1,54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e o resultado de TBARS expresso em nmol Eq MDA/mL para as amostras de plasma e tecidos.

2.10 DETERMINAÇÃO DE SULFRIDRILAS TOTAIS (TIÓIS)

A quantificação do nível antioxidante do plasma e tecidos foi mensurada por meio da determinação dos grupos sulfidrilas, realizada conforme a metodologia descrita por Faure e Lafond (1995) em que alíquotas de 50 µL de amostras (sangue e órgãos) foram misturados em 1 mL de tampão tris-EDTA, pH 8,2. Em seguida, foi realizada a primeira leitura (A) no espectrofotômetro em 412 nm. Após a leitura, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio e misturadas a 20 µL de DTNB 10 mM diluído em metanol (4 mg/mL), ficando em repouso no escuro. Ao final de 15 min, a segunda leitura de absorbância (A2) foi realizada. A concentração de SH foi calculada conforme equação: $(A2-A1) - B \times 1,57 \text{ mM} \times 1000$ sendo o resultado expresso em nmol.mg⁻¹ tecido.

2.11 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS TECIDUAIS

A quantificação do dano tecidual foi avaliada pela mensuração de marcadores enzimáticos nos tecidos como a creatina quinase (CK), a lactatodesidrogenase (LDH), a alanina aminotransferase (ALT) e o aspartato aminotransferase (AST). Foram utilizados kits da Labtest® (Santa Lagoa, Minas Gerais, Brasil). Amostras de soro (20 µL) de cada animal foram homogeneizadas em reagentes específicos a $37 \pm 0,2^\circ \text{C}$, e as leituras foram realizadas usando um espectrofotômetro (Biospectro Modelo SP-22 UV / Visible, Minas Gerais, Brasil) a um comprimento de onda de 340 nm.

2.12 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Por meio da técnica Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP), uma alíquota de 9 µL do plasma bem como dos tecidos musculares e hepático foi pipetada em microplaca, onde foram acrescentados 27µL de água destilada e 270µL do reagente FRAP. A placa foi incubada a 37°C durante 30 minutos e a leitura realizada a 595nm. O sulfato ferroso (FeSO_4) foi utilizado como padrão e os resultados foram expressos em µM de equivalentes de sulfato ferroso produzido (Singhal, Paul & Singh et al., 2014).

2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificação da normalidade das variáveis utilizou-se o teste de Shapiro Wilk. A comparação entre os grupos foi feita por meio do teste ANOVA (One Way), com *post hoc* de Bonferroni. No caso do lactato sanguíneo, foi utilizado o teste *t* de Student entre os momentos dos grupos avaliados. O tratamento estatístico foi realizado por meio do programa estatístico GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A). Os níveis de significância adotados foram de $p < 0,05$ e $p < 0,0001$.

3 RESULTADOS

As concentrações de lactato sanguíneo obtidas após o TCM denotam que o protocolo de exercício utilizado é de alta intensidade, uma vez que valores acima de 4mmol/L são considerados de alta intensidade (Tabela 1).

Tabela 1 - Teste do Lactato Sanguíneo

| Grupos | PRÉ | PÓS | p |
|--------|-------------|---------------|----------|
| EA | 2.17 ± 0,65 | 5.8 ± 0,65*** | p<0,0001 |
| EX | 1.71 ± 0,65 | 4.8 ± 0,65*** | p<0,0001 |

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: Momentos pré e pós teste de carga máxima (TCM). Grupos: Exercício Resistido (EA) submetidos a sessão aguda, e Exercício Extrato (EX) dos animais suplementados com EE de *Schinus Terebinthifolius* (100 mg/Kg, via oral) e que fizeram a sessão, (n=10/grupo). Valores apresentados como média ± erro padrão da média. Test *t* de Student. ***Diferença estatística significativa entre os grupos.

O extrato etanólico da *S. terebinthifolius* apresentou capacidade antioxidante muito forte, representada pelo IAA, o qual foi capaz de inibir 50% do radical livre sintético DPPH em baixa concentração de CE50; ainda, o potencial inibitório (PI) foi menor que o ácido gálico (controle positivo), cujos valores foram muito próximos ao controle antioxidante, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade antioxidante do extrato etanólico de *S. Terenbinthifolius* determinada pelo teste DPPH

| AMOSTRA | PI% | CE ₅₀ | IAA |
|--------------------|--------------|------------------|--------------|
| EE (µg/mL) | 80,06 ± 0,65 | 2,88 ± 0,07 | 13,88 ± 0,36 |
| AC. GÁLICO (µg/mL) | 83,00 ± 0,10 | 2,00 ± 0,01 | 19,98 ± 0,10 |

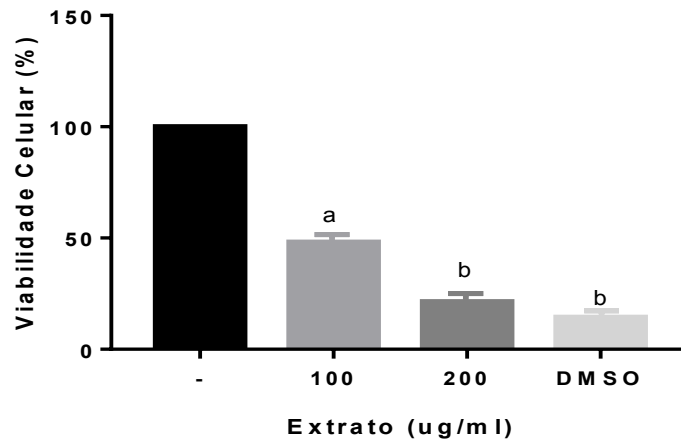
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: EE: extrato etanólico, PI%: potencial inibitório, IAA: índice de atividade antioxidante e CE50: concentração efetiva. O PI% e CE50 da amostra foram calculados no seu respectivo tempo de 60 min. O AAI classifica a amostra como fraca quando IAA <0,5, moderada quando 0,5 <IAA <1, forte quando 1 > IAA <2 e muito forte quando IAA > 2.

No que se refere à avaliação da citotoxicidade (viabilidade celular) *in vitro*, a concentração de 100ug/ml (49,02 ± 2,33 µg/mL) mostrou-se significativamente menos

tóxica se comparada à concentração de 200ug/ml ($21,41 \pm 1,97 \mu\text{g/mL}$) (Figura 1).

Figura 1 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio da citotoxicidade *in vitro*

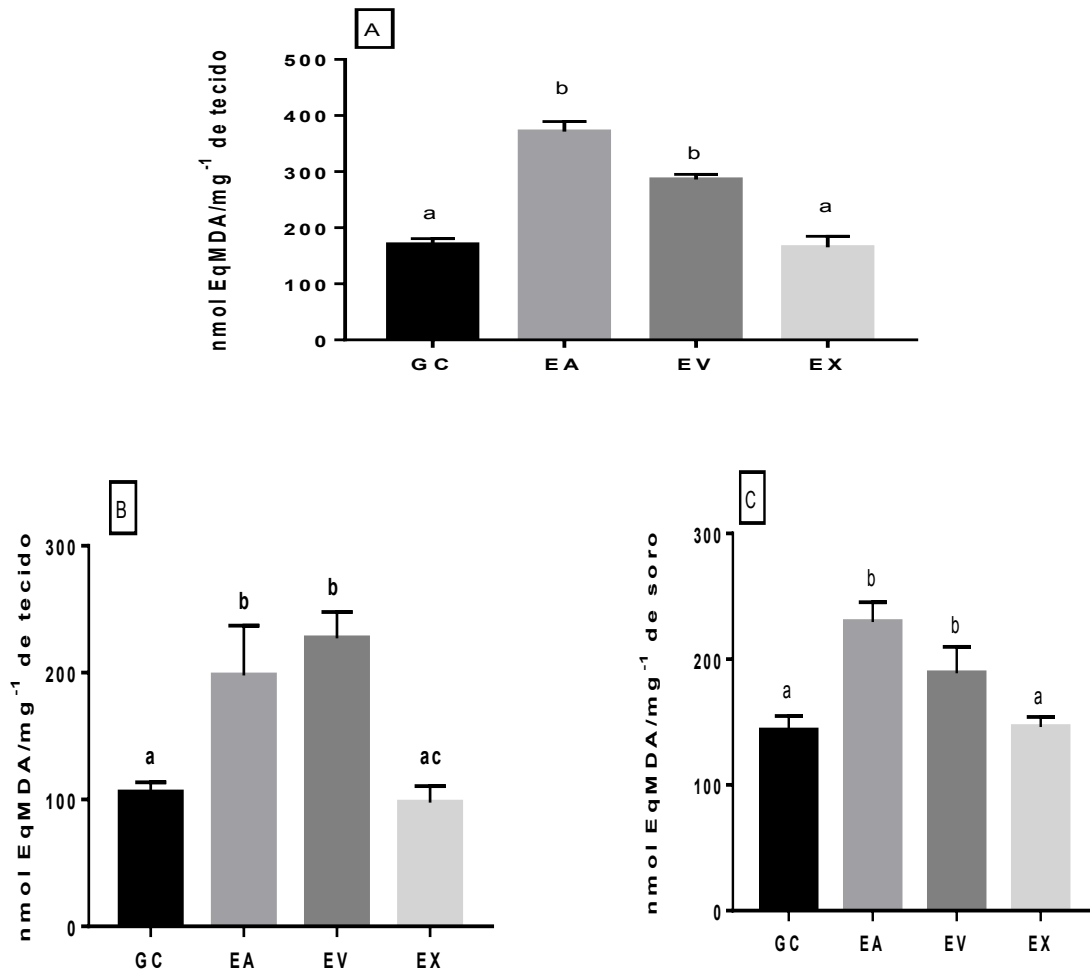


Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: Concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ -1 e dimetilsulfóxido (DMSO). Letras diferentes na figura representam diferença estatística significativa para $p < 0,05$ entre os grupos ($n=10$ /amostra).

A Figura 2 demonstra os efeitos do exercício físico resistido de alta intensidade associado ao EE de *S. Terenbinthifolius* sobre os níveis de TBARS teciduais e séricos. No tecido hepático, não houve diferença estatística entre os grupos GC ($498 \pm 52,1$ nmol EqMDA-1/mg) e EX ($525,6 \pm 50,05$ nmol EqMDA-1/mg), no entanto, este último foi diferente significativamente quando comparado aos grupos EA ($671,6 \pm 66,05$ nmol EqMDA-1/mg, $p=0,0008$) e EV ($668,1 \pm 52,05$ nmol EqMDA-1/mg, $p=0,0008$), respectivamente (figura 2A). No que se refere ao músculo quadríceps, a concentração de TBARS no grupo EX ($97,61 \pm 13,01$ nmol EqMDA-1/mg) foi menor se comparada aos grupos EA ($197,9 \pm 39,02$ nmol EqMDA/mg, $p < 0,0001$) e EV ($227,2 \pm 20,75$ nmol EqMDA-1/mg, $p < 0,0001$), respectivamente (figura 2B). Os níveis séricos de MDA (EX: $74,03 \pm 9,54$ nmol EqMDA-1/mg; EA: $105,70 \pm 6,73$ nmol EqMDA-1/mg, $p=0,0003$) e EV: $104 \pm 17,34$ nmol EqMDA-1/mg, $p=0,0012$) (figura 2C).

Figura 2 - Efeito do exercício físico de alta intensidade associado (EFAI) ao Extrato Etanólico (EE) de *S. Terenbinthifolius* sobre biomarcador de estresse oxidativo a danos lipídicos no tecido hepático (A), músculo esquelético quadríceps (B) e sangue (C).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

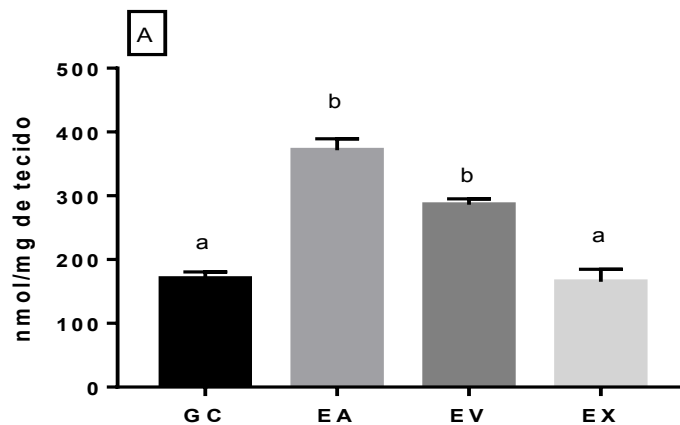
Nota: Grupo Controle (GC): animais que não realizaram a sessão aguda de exercício e que receberam água destilada via oral; Exercício Resistido (EA), submetidos a sessão aguda de exercício; Exercício + Veículo (EV), composto por animais que foram submetidos a sessão aguda de exercício e que receberam água destilada via oral; e Exercício Extrato (EX), animais suplementados com extrato etanólico de *Schinus Terebenthifolius* (100 mg/Kg, via oral) e que realizaram a sessão aguda de exercício (n=10/grupo). Valores apresentados como média \pm erro padrão da média e expressos nmol MDA/mg tecido no caso para músculo e fígado e nmol MDA/mg soro para o sangue. ANOVA de uma via foi seguida pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$) e ($p < 0,0001$). Letras diferentes na figura representam diferença estatística significativa entre os grupos.

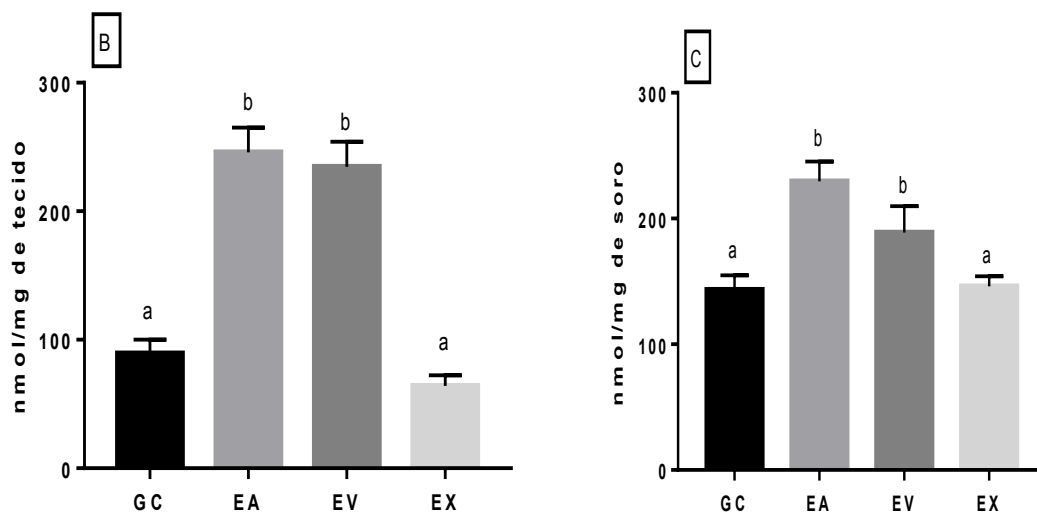
A figura 3 mostra as concentrações dos grupamentos sulfidrilas no tecido hepático, músculo quadríceps e no sangue. No tecido hepático (figura 3A), não houve

diferenças significativas entre os grupos GC ($170,20 \pm 20,71$ nmol/mg) vs EX ($165,40 \pm 33,76$ nmol/mg), no entanto, este último apresentou uma atenuação significativa quando comparado aos grupos EA ($371,60 \pm 43,65$ nmol/mg) e EV ($286,20 \pm 20,38$ nmol/mg). Além disso, houve diferença significativa ($p=0,0033$) entre os EA e EV.

No músculo quadríceps (figura 3B), a concentração de sulfidrilas foi semelhante entre GC ($89,25 \pm 10,78$ nmol/mg) e EX ($64,15 \pm 8,18$ nmol/mg); por outro lado, ambos apresentaram valores inferiores ($p<0,0001$) se comparados a EA ($245,80 \pm 19,39$ nmol/mg) e EV ($234,60 \pm 19,53$ nmol/mg). Nos níveis séricos (figura 3C), não houve diferença entre GC ($143,50 \pm 25,33$ nmol/mg) e EX ($146 \pm 16,27$ nmol/mg); no entanto, ambos mostraram-se menores se comparados a EA ($229,70 \pm 38,44$ nmol/mg; $p=0,0056$) e EV ($188,90 \pm 51,10$ nmol/mg; $p=0,0200$).

Figura 3 - Efeito do exercício físico de alta intensidade associado (EFAI) ao Extrato Etanólico (EE) de *S. Terenbinthifolius* nos grupamentos sulfidrilas no tecido hepático (A), musculo esquelético quadríceps (B) e sangue (C).



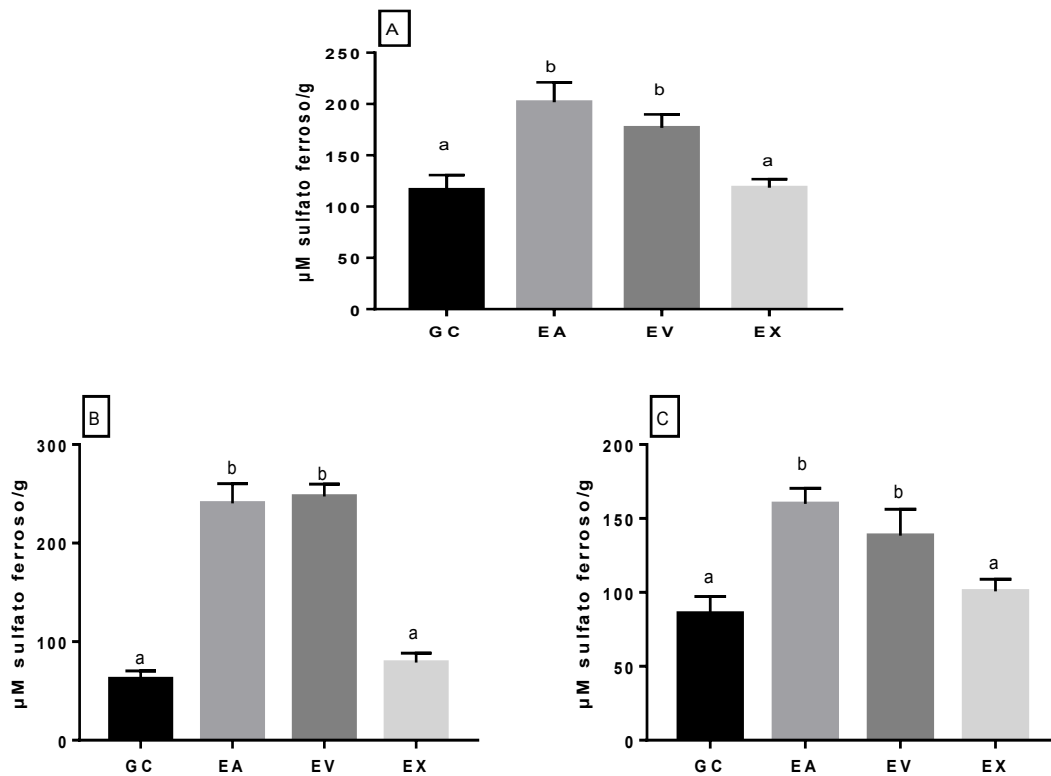


Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: Grupo Controle (GC): animais que não realizaram a sessão aguda de exercício e que receberam água destilada via oral; Exercício Resistido (EA), submetidos a sessão aguda de exercício; Exercício + Veículo (EV), composto por animais que foram submetidos a sessão aguda de exercício e que receberam água destilada via oral; e Exercício Extrato (EX), animais suplementados com extrato etanólico de *Schinus Terebenthifolius* (100 mg/Kg, via oral) e que realizaram a sessão aguda de exercício (n=10/grupo). Valores apresentados como média \pm erro padrão da média e expressos nmol MDA/mg tecido no caso para músculo e fígado e nmol MDA/mg soro para o sangue. ANOVA de uma via foi seguida pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$) e ($p < 0,0001$). Letras diferentes na figura representam diferença estatística significativa entre os grupos.

A Figura 4 mostra os dados de avaliação da capacidade antioxidante, denotada pelo método do FRAP. No tecido hepático, não houve diferença estatística entre GC ($116,30 \pm 14,47 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g) e EX ($118,30 \pm 8,50 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g); porém, o último apresentou valores diferentes significativamente comparado a EA ($201,70 \pm 19,42 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g; $p=0,0011$) e EV ($176,9 \pm 12,99 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g; $p=0,0047$) (figura 4A). Em relação ao quadríceps, o grupo EX ($78,83 \pm 9,55 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo GC ($62,01 \pm 8,48 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g), no entanto EX apresentou valores significativos ($p < 0,0001$) quando comparado com os grupos EA ($240,40 \pm 20,07 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g) e EV ($247,30 \pm 12,58 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g), respectivamente (figura 4B). A concentração sérica de sulfato ferroso foi avaliada e não houve diferença entre EX ($100,70 \pm 8,32 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g) e GC ($85,67 \pm 11,5 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g). No entanto, houve diferença estatística entre EX quando comparado a EA ($159,90 \pm 10,53 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g; $p=0,0017$) e EV ($138,50 \pm 17,83 \mu\text{M}$ sulfato ferroso/g; $p=0,0165$), respectivamente (figura 4C).

Figura 4 - Efeito do exercício físico de alta intensidade associado (EFAI) ao Extrato Etanólico (EE) de *S. Terebinthifolius* na capacidade antioxidante FRAP no tecido hepático (A), músculo esquelético quadríceps (B) e sangue (C) de ratos Wistar.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

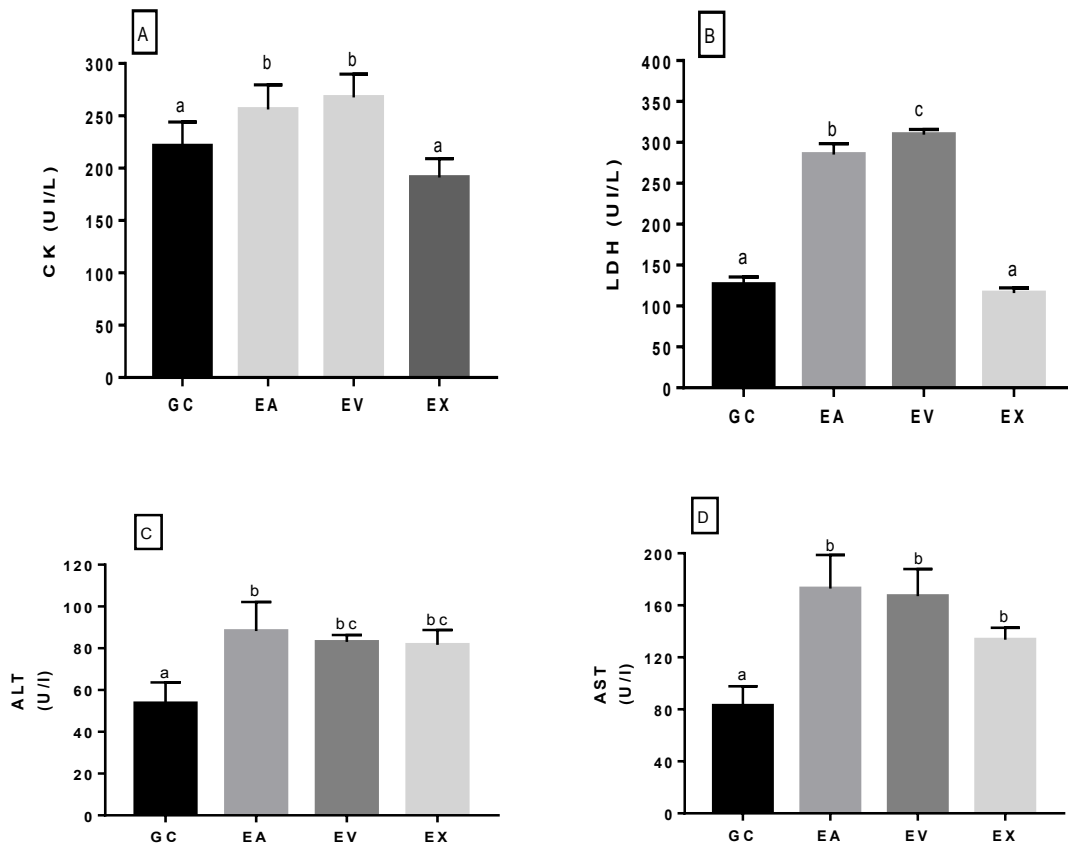
Nota: Grupo Controle (GC): animais que não realizaram a sessão aguda de exercício e que receberam água destilada via oral; Exercício Resistido (EA), submetidos a sessão aguda de exercício; Exercício + Veículo (EV), composto por animais que foram submetidos a sessão aguda de exercício e que receberam água destilada via oral; e Exercício Extrato (EX), animais suplementados com extrato etanólico de *Schinus Terebinthifolius* (100 mg/Kg, via oral) e que realizaram a sessão aguda de exercício (n=10/grupo). Valores apresentados como média \pm erro padrão da média. ANOVA de uma via foi seguida pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$) e ($p < 0,0001$). Letras diferentes na figura representam diferença estatística significativa entre os grupos.

A Figura 5 mostra os dados referentes aos marcadores de danos teciduais musculares e hepáticos. Não houve diferença estatística na concentração sérica de CK entre os grupos GC ($221,1 \pm 22,91$ ui/l) e EX ($191 \pm 18,21$ ui/l); entretanto, este último apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado a EA ($256,10 \pm 23,48$ ui/l; $p = 0,0001$) e EV ($267,5 \pm 22,37$ ui/l; $p < 0,0001$), respectivamente (figura 5A). Para a concentração sérica de LDH, houve diferenças significativas quando o grupo EX ($115,90 \pm 6,31$ ui/l) ($p < 0,0001$) foi comparado aos grupos EA ($285,20 \pm 13,31$ ui/l) e EV ($309,60 \pm 6,39$ ui/l), respectivamente (figura 5B).

No que se refere à concentração de ALT, o grupo EX ($81,67 \pm 7,09$ ui/l) apresentou valores significativamente maiores em relação ao GC ($53,67 \pm 10,02$ ui/l; $p=0,0271$), mas sem diferença se comparado a EA ($88,20 \pm 13,91$ ui/l) e EV ($83,03 \pm 3,27$ ui/l). Vale destacar que houve diferenças entre os grupos GC vs EA ($p=0,0087$) e GC vs EV ($p=0,0213$) (figura 5C).

Em relação aos níveis séricos de AST, EX ($133,05 \pm 9,19$ ui/l) apresentou valores significativamente maiores se comparado a GC ($82,07 \pm 15,13$ ui/l) ($p=0,0158$). Por outro lado, não houve diferença quando EX foi comparado aos grupos EA ($172,90 \pm 25,90$ ui/l) e EV ($167 \pm 20,88$ ui/l). Houve diferenças significativas entre GC vs EA ($p=0,0117$) e GC vs EV ($p=0,0161$) (figura 5D).

Figura 5 - Efeito do exercício físico de alta intensidade associado (EFAI) ao Extrato Etanólico (EE) de *S. Terenbinthifolius* nos marcadores de danos teciduais creatina kinase - CK (A), lactatodesidrogenase - LDH (B), alanina aminotransferase - ALT (C) e aspartato aminotransferase - AST (D) em ratos Wistar.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: Grupo Controle (GC): animais que não realizaram a sessão aguda de exercício e que receberam água destilada via oral; Exercício Resistido (EA), submetidos a sessão aguda de

exercício; Exercício + Veículo (EV), composto por animais que foram submetidos a sessão aguda de exercício e que receberam água destilada via oral; e Exercício Extrato (EX), animais suplementados com extrato etanólico de *Schinus Terebenthifolius* (100 mg/Kg, via oral) e que realizaram a sessão aguda de exercício (n=10/grupo). Valores apresentados como média \pm erro padrão da média. ANOVA de uma via foi seguida pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$) e ($p < 0,0001$). Letras diferentes na figura representam diferença estatística significativa entre os grupos.

4 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi de avaliar os efeitos do exercício físico resistido de alta intensidade associado ao extrato etanólico das folhas de *Schinus Terebinthifolius* sobre parâmetros oxidativos e de danos musculares em ratos Wistar. Diante disso, os principais resultados são apresentados que o EE da *Schinus Terebinthifolius* reduziu os marcadores de danos oxidativos e musculares em tecidos de ratos submetidos a uma sessão de exercício físico resistido de alta intensidade. Até o presente momento esse é o primeiro estudo a investigar tais efeitos.

O interesse da comunidade científica por exercícios de alta intensidade tem aumentando significativamente nos últimos anos, e com isto, possíveis formas de diminuição dos efeitos deletérios que possam ser gerados durante o período de recuperação pós-exercício (De Araujo et al., 2019).

No presente estudo, na avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo na associação entre a administração do EE das folhas de *S. terebinthifolius* e exercício físico resistido de alta intensidade promoveu atenuação da peroxidação lipídica (tecidos hepáticos e muscular) e nos grupamentos sulfidrilas (tecidos hepático, muscular e sangue); tais achados corroboram os resultados obtidos por outros autores que submeteram ratos ao treinamento resistido de alta intensidade utilizando EE de outra planta com alta capacidade antioxidante (Dos Santos, J.L., et al., 2014).

Do mesmo modo, estudos anteriores (Delwing-de Lima et al., 2018; Souza, L., et al., 2020) que também utilizaram protocolos de exercícios de alta intensidade em animais e identificaram que esse induziu o estresse oxidativo, indo de encontro aos resultados apresentados no presente estudo.

Em relação da avaliação da citocidade da planta medicinal o teste de citotoxicidade é utilizado para verificar a dose mais segura na aplicação nos animais (Skenderi et al., 2008), entretanto, não houve diferenças significativas entre os grupos EX vs EA e EX vs EV no que se refere às concentrações e ALT e AST, em níveis séricos.

No presente estudo houve diferença significativa em ALT e AST na relação entre os grupos EX e GC, apresentando resultados semelhantes ao estudo de Dos-Santos et al. (2022) após a sessão de exercício. Da mesma forma, corroborando com os estudos de Ramos et al. (2013) e Suarsana, Utama e Kardena (2020). Ou seja, foi evidenciado através dos dados que a suplementação de *Schinus Terebinthifolius*,

associada ao exercício físico de alta intensidade, promoveu redução nesses marcadores indicando uma provável proteção frente aos danos teciduais hepáticos.

A membrana celular e outras organelas são protegidas por diversas moléculas antioxidantes com atividade enzimática e não enzimática que podem atenuar os danos oxidativos e musculares (Gutteridge & Halliwell, 2014). O aumento das concentrações de CK e LDH no sangue tem sido relacionado com microlesões musculares, bem como os ajustes promovidos pelo exercício nas concentrações de MDA, CK e LDH (Santos et al. 2020).

Na análise dos biomarcadores de estresse de danos teciduais, estudos anteriores (De Araujo et al., 2019; Santos et al. 2020; Silvestre et al. 2017) relatam que o treinamento de alta intensidade pode elevar os valores séricos de CK e LDH e são utilizados como parâmetro para avaliar a intensidade do esforço físico e lesões musculares.

Em outros estudos mais antigos (Cipryan; Tschakert; Hofmann, 2017; Clarkson et al, 2006; Dos Santos, J.L., et al, 2014; Wiewelhove et al, 2016) também são explanados aumentos significativos nas enzimas CK e LDH após exercícios físicos extenuantes, tanto em ratos como em humanos, evidenciando um possível dano muscular após o exercício de alta intensidade.

No que se refere às concentrações de lactato sanguíneo, foram encontradas diferenças significativas entre os momentos pré e pós TCM dos grupos EX ($p < 0,0001$) e EA ($p < 0,0001$), dados que estão similares ao estudo de Silvestre et al. (2017), o qual também realizou uma sessão aguda de exercício físico com modelo escada e aumento gradual de carga, foram obtidos resultados semelhantes em relação a esse metabólito.

Na avaliação da capacidade antioxidante, o FRAP é um parâmetro de atividade antioxidante no plasma e o seu aumento após exercícios intensos pode sugerir que ocorreu uma elevação da capacidade de defesa antioxidante (Chatzinikolaou et al., 2010) e no presente estudo o grupo EX foi capaz de exercer uma função protetora em relação aos grupos EA e EV.

Um estudo de revisão sistemática com metanálise realizado por De Sousa et al. (2017) relata que o treinamento físico, independentemente do tipo, intensidade e volume, pode promover o equilíbrio redox. No estudo de Oliveira, E., et al. (2020) também é evidenciado o aumento no status redox em ratos treinados.

O presente estudo evidenciou que a administração de EE das folhas de

Schinus Terebinthifolius atenuou a concentração desses marcadores de danos teciduais, porém para estudos futuros sugere-se avaliar outras frações de extratos e possíveis efeitos (benéficos ou não) sobre o organismo animal e ou humano. Como possíveis limitações podem ser destacadas a necessidade de uma avaliação com uma intervenção de forma crônica, ou seja, um protocolo de treinamento com pelo menos quatro semanas de duração e frequência mínima de três vezes por semana. Além disso, outros biomarcadores de estresse oxidativo poderiam ter sido analisados. Como aplicabilidade prática, espera-se que este estudo possa ser um referencial para uma possibilidade futura da transacionalidade do uso da suplementação de plantas medicinais associado ao exercício/treinamento físico em humanos.

5 CONCLUSÃO

O EE da *Schinus terebinthifolius* reduziu os marcadores de danos oxidativos e musculares em tecidos de ratos submetidos a uma sessão de exercício físico resistido de alta intensidade. Portanto, sugere-se como uma possível estratégia no papel atenuador na redução do estresse oxidativo e danos musculares quando na associação entre planta medicinal e exercício físico de forma aguda, principalmente de alta intensidade que podem promover uma elevação nestes marcadores.

REFERÊNCIAS

- CIPRYAN, Lukas; TSCHAKERT, Gerhard; HOFMANN, Peter. Acute and post-exercise physiological responses to high-intensity interval training in endurance and sprint athletes. **Journal of sports science & medicine**, v. 16, n. 2, p. 219, 2017.
- CLARKSON, Priscilla M. et al. Serum creatine kinase levels and renal function measures in exertional muscle damage. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 38, n. 4, p. 623-627, 2006.
- CHATZINIKOLAOU, Athanasios et al. Time course of changes in performance and inflammatory responses after acute plyometric exercise. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 24, n. 5, p. 1389-1398, 2010.
- CHENG, Zhihong; MOORE, Jeffrey; YU, Liangli. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7429-7436, 2006.
- DE SOUZA LINO, Anderson Diogo et al. Resistance Training Decreases Lipid Content of Different Fat Deposits in Ovariectomized Rats. **Asian Journal of Sports Medicine**, v. 9, n. 1, 2018.
- DE ARAÚJO, Silvan Silva et al. Does Croton argyrophyllus extract has an effect on muscle damage and lipid peroxidation in rats submitted to high intensity strength exercise?. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 21, p. 4237, 2019.
- DE LWING-DE LIMA, Daniela et al. Effects of two aerobic exercise training protocols on parameters of oxidative stress in the blood and liver of obese rats. **The journal of physiological sciences**, v. 68, p. 699-706, 2018.
- DE SOUSA, Caio Victor et al. The antioxidant effect of exercise: a systematic review and meta-analysis. **Sports medicine**, v. 47, p. 277-293, 2017.
- DOS SANTOS, Jymmys Lopes et al. Protective effect of a hydroethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* on muscular damage and oxidative stress caused by strenuous resistance training in rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 58, 2014.
- DOS SANTOS, Jessica Denielle Matos et al. Effects of HIIT associated with *Coutoubea spicata* supplementation on tissue and oxidative damage biomarkers in Wistar rats. **Int. j. morphol**, v. 40, n. 1, p. 204-9, 2022.
- FAURE, P.; LAFOND, J.-L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: **Analysis of free radicals in biological systems**. Basel: Birkhäuser Basel, 1995. p. 237-248.
- DE LIMA GLÓRIA, Lorena et al. Phenolic compounds present *Schinus terebinthifolius* Raddi influence the lowering of blood pressure in rats. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1792, 2017.

GOBATTO, Claudio Alexandre et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 130, n. 1, p. 21-27, 2001.

GUTTERIDGE, John MC; HALLIWELL, Barry. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success?. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 502, n. 2, p. 183-186, 2018.

HORNBERGER JR, Troy A.; FARRAR, Roger P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Canadian journal of applied physiology**, v. 29, n. 1, p. 16-31, 2004.

HOSHINO, Daisuke et al. High-intensity interval training increases intrinsic rates of mitochondrial fatty acid oxidation in rat red and white skeletal muscle. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, v. 38, n. 3, p. 326-333, 2013.

LAPENNA, Domenico et al. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 3, p. 331-335, 2001.

NEVES, Rodrigo Vanerson Passos et al. Dynamic, not isometric resistance training improves muscle inflammation, oxidative stress and hypertrophy in rats. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 4, 2019.

OLIVEIRA, Emerson et al. Exercise reduced plasmatic oxidative stress and protected the muscle of malnourished-recovering trained rats. **Journal of Exercise Physiology Online**, v. 23, n. 3, 2020.

OLIVEIRA, Monika BS et al. Schinus terebenthifolius Raddi extracts: From sunscreen activity toward protection of the placenta to Zika virus infection, new uses for a well-known medicinal plant. **Industrial crops and products**, v. 152, p. 112503, 2020.

RAMOS, Dionizio et al. Biomarkers of oxidative stress and tissue damage released by muscle and liver after a single bout of swimming exercise. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 38, n. 5, p. 507-511, 2013.

PADILHA, Camila Souza et al. Resistance exercise attenuates skeletal muscle oxidative stress, systemic pro-inflammatory state, and cachexia in Walker-256 tumor-bearing rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 42, n. 9, p. 916-923, 2017.

PARKER, Lewan et al. Exercise-intensity dependent alterations in plasma redox status do not reflect skeletal muscle redox-sensitive protein signaling. **Journal of science and medicine in sport**, v. 21, n. 4, p. 416-421, 2018.

RAIZEL, Raquel et al. Determination of the anti-inflammatory and cytoprotective effects of l-glutamine and l-alanine, or dipeptide, supplementation in rats submitted to resistance exercise. **British journal of nutrition**, v. 116, n. 3, p. 470-479, 2016.

RAYMOND, Melissa J. et al. Systematic review of high-intensity progressive resistance strength training of the lower limb compared with other intensities of strength training in older adults. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 94, n. 8, p. 1458-1472, 2013.

SANTOS, Jymmys Lopes dos et al. Ethanolic extract and ethyl acetate fraction of *Coutoubea spicata* attenuate hyperglycemia, oxidative stress, and muscle damage in alloxan-induced diabetic rats subjected to resistance exercise training program. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 45, n. 4, p. 401-410, 2020.

SCHERER, Rodrigo; GODOY, Helena Teixeira. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.

SILVESTRE, João Guilherme Oliveira et al. Acute effects of resistance exercise performed on ladder on energy metabolism, stress, and muscle damage in rats. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 23, 2017.

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H. P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives, *J. Saudi Chem. Soc.*, 18, 121-127. 2014.

SKENDERI, K. P. et al. Changes in free radical generation and antioxidant capacity during ultramarathon foot race. **European journal of clinical investigation**, v. 38, n. 3, p. 159-165, 2008.

SLUSHER, Aaron L. et al. Impact of high intensity interval exercise on executive function and brain derived neurotrophic factor in healthy college aged males. **Physiology & behavior**, v. 191, p. 116-122, 2018.

SOUZA, Lúcio Marques Vieira et al. Analysis of oxidative stress in Wistar rats submitted to high-intensity interval training. **Motricidade**, v. 16, n. 3, p. 174-81, 2020.

SOUZA, Romeu R. et al. Resistance training improves aortic structure in Wistar rats. **Brazilian journal of physical therapy**, v. 21, n. 4, p. 244-250, 2017.

SPERETTA, Guilherme F. et al. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. **Life sciences**, v. 146, p. 154-162, 2016.

STANDARD, I. Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **Geneve, Switzerland: International Organization for Standardization**, 2009.

SUARSANA, I. Nyoman; UTAMA, Iwan Harjono; KARDENA, I. Made. Tempe extract reduces cell damage in the liver and kidneys after intensive physical exercise in rats. **Veterinary World**, v. 13, n. 8, p. 1510, 2020.

WIEWELHOVE, Thimo et al. Acute responses and muscle damage in different high-intensity interval running protocols. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, 2015.

ANEXO A - Artigo publicado da tese: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-95022022000300781&script=sci_abstract&lng=en

Int. J. Morphol.,
40(3):781-788, 2022.

High-Intensity Resistance Exercise and *Schinus terebinthifolius* Supplementation Attenuate Oxidative Stress and Muscle Damage Biomarkers

El Ejercicio de Resistencia de Alta Intensidad y la Suplementación con *Schinus terebinthifolius* Atenuan los Biomarcadores del Estrés Oxidativo y Daño Muscular

Lucio Marques Vieira-Souza^{1,2}; Anderson Carlos Marçal³; Jymmys Lopes dos Santos³; Felipe José Aidar³; Samuel Bruno dos Santos⁴; André Luiz de Santana Silva⁵; Gracielle Costa Reis⁵; George Franklin Santana de Carvalho⁶; Raphael Fabrício de Souza¹; Darlan Tavares dos Santos⁶; Dany Alexis Sorbazo Soto^{1,7} & Ciro José Brito¹

VIEIRA-SOUZA, L. M.; MARÇAL, A. C.; DOS SANTOS, J. L.; AIDAR F. J.; DOS SANTOS, S. B.; SILVA, A. L. S.; REIS, G. C.; CARVALHO, G. F. S.; SOUZA, R. F.; SANTOS, D. T.; SOTO, D. A. S. & BRITO, C. J. High-intensity resistance exercise and *Schinus terebinthifolius* supplementation attenuate oxidative stress and muscle damage biomarkers. *Int. J. Morphol.*, 40(3):781-788, 2022.

SUMMARY: High-intensity physical exercises can cause oxidative stress and muscle damage. Several medicinal plants have been used as antioxidant and anti-inflammatory agents. The present study evaluated high-intensity resistance exercise (HIRE) associated with *Schinus Terebinthifolius* ethanolic extract (EE) on oxidative parameters and muscle damage in Wistar rats. Animals were divided into 04 groups (n=10/group): 1. Control (CG) - animals that did not undergo HIRE and were treated with vehicle (distilled water, orally); 2. Acute exercise (AE) – animals submitted to acute exercise session; 3. Exercise + vehicle (EV) - animals that underwent HIRE and were treated with vehicle and 4. Exercise + extract (EX) animals administered with *Schinus terebinthifolius* EE (100mg/Kg, orally) and submitted to the exercise session. *Schinus terebinthifolius* EE showed high *in vitro* antioxidant activity (13.88 ± 0.36 mg/mL). Before the experimental period, lactate was measured at pre and post moments of AE (p<0.0001) and EX (p<0.0001) groups. After the acute session, the following were evaluated: oxidative stress {malondialdehyde (MDA), sulfhydryl groups (SH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP)}, muscle damage (creatinase kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH)), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). In the *in vivo* analyses of the EX group compared to AE and EV groups, respectively: hepatic (MDA: p<0.0001 and SH: p=0.0033, in both; FRAP: p=0.0011 and p=0.0047), muscle (MDA, SH and FRAP: p<0.0001, in both; CK: p=0.0001 and p<0.0001; LDH: p<0.0001, in both), serum levels (MDA: p=0.0003, p=0.0012, SH: p=0.0056, p=0.0200, FRAP: p=0.0017 and p=0.0165) were significant. There was no significant difference in ALT and AST markers. It could be concluded that *Schinus terebinthifolius* EE associated with HIRE attenuated oxidative stress and muscle damage in rats.

KEY WORDS: Physical Training; Supplements based on Medicinal Plants; Natural Product; Oxidative Lesion; Damage Reduction.