



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

DOUGLAS BONFIM LIMA

PERFIL BIOQUÍMICO DO EXTRATO DE *Croton argyrophyllus* E
SEUS EFEITOS ANTIOXIDANTES EM RATAS SUBMETIDAS
AO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO DE ALTA INTENSIDADE

SÃO CRISTOVÃO - SE

2014

DOUGLAS BONFIM
LIMA

PERFIL BIOQUÍMICO DO EXTRATO DE *Croton argyrophyllus*
E SEUS EFEITOS ANTIOXIDANTES EM RATAS
SUBMETIDAS AO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO DE ALTA
INTENSIDADE

2014

DOUGLAS BONFIM LIMA

PERFIL BIOQUÍMICO DO EXTRATO DE *Croton argyrophyllus* E SEUS EFEITOS ANTIOXIDANTES EM RATAS SUBMETIDAS AO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO DE ALTA INTENSIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam

SÃO CRISTOVÃO - SE

2014

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

L732p	Lima, Douglas Bonfim Perfil bioquímico do extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> e seus efeitos antioxidantes em ratas submetidas ao exercício físico resistido de alta intensidade / Douglas Bonfim Lima ; orientador : Charles dos Santos Estevam – São Cristóvão, 2014. 43 f. : il.
	Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –Universidade Federal de Sergipe, 2014.
	1. <i>Croton argyrophyllus</i> . 2. Atividade antioxidante. 3. Estresse oxidativo. 4. Exercício físico. I. Estevam, Charles dos Santos, orient. II. Título.

DOUGLAS BONFIM LIMA

PERFIL BIOQUÍMICO DO EXTRATO DE *Croton argyrophyllus* E SEUS EFEITOS ANTIOXIDANTES EM RATAS SUBMETIDAS AO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO DE ALTA INTENSIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam

1^a Examinadora: Prof^a. Dr^a Sandra Lauton Santos

2^o Examinador: Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal

Agradecimentos

Ao professor Dr. Anderson Carlos Marçal, por ter me acolhido em seu laboratório desde a graduação, me ajudando e me orientado até a pós-graduação, com o qual aprendi muito.

Ao professor Dr. Charles dos Santos Estevam, por ter aceitado me orientar durante o mestrado, sem o qual eu não poderia estar finalizando este curso, o qual me enriqueceu de conhecimento.

Aos alunos do NUPESIN (Núcleo de Pesquisa em Sinalização Intracelular) e do LQPN (Laboratório de Química de Produtos Naturais), em especial a Jymmys, Silvan e Daniela, fundamentais para que eu concluisse o mestrado.

A todos os colegas que estudaram comigo durante o mestrado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, que contribuíram com a minha formação.

À família, pela estrutura que serviu de base para que eu chegasse aqui.

“O dia em que pararmos de nos preocupar com Consciência Negra, Amarela ou Branca e nos preocuparmos com Consciência Humana, o racismo desaparece”. ***Morgan Freeman***

RESUMO

PERFIL BIOQUÍMICO E EFEITOS DO EXTRATO DE *Croton argyrophyllus* CONTRA RADICAIS LIVRES *IN VITRO* E SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM RATAS SUBMETIDAS AO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO DE ALTA INTENSIDADE. Douglas Bonfim Lima. São Cristovão. 2014.

O exercício físico é uma importante ferramenta para manutenção da saúde e prevenção de diversas doenças como o diabetes, hipertensão arterial e obesidade. Tratamentos adicionais vêm sendo implementados para estes pacientes e o exercício físico se destaca neste contexto. Todavia, o exercício resistido agudo de alta intensidade favorece a produção de radicais livres, os quais podem gerar estresse oxidativo que resulta em lesões no organismo. Tem-se buscado diversas maneiras de reduzir esse processo, por exemplo, através da utilização de produtos naturais, como extratos de plantas para amenizar os efeitos dos radicais livres, devido à presença nos mesmos, de substâncias antioxidantes. Este estudo teve como objetivo investigar o perfil fitoquímico do extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus* e avaliar seu efeito antioxidantem *in vitro* e contra o estresse oxidativo induzido por exercício físico resistido agudo de alta intensidade em ratas. No presente estudo, o perfil fitoquímico do extrato hidroetanólico da entrecasca de *C. argyrophyllus* foi investigado através de reações colorimétricas ou de precipitação, enquanto o teor de fenóis totais foi quantificado usando o método de Folin-Ciocalteu. O extrato também foi testado *in vitro* no modelo radicalar de DPPH• e para estudar seu efeito sobre o estresse oxidativo, ratas Wistar (200-250 g) foram divididos em 4 grupos: 1) Grupo veículo sedentário (TW-EE, n = 7) – composto por animais sedentários tratados com veículo (Tween 80, via oral (vo); 2) Grupo veículo treinado (TW-EX, n = 6) - composto por animais tratados com veículo (Tween 80, vo) e submetidas a protocolo de treinamento resistido; 3) Grupo extrato sedentário (EHE-EE, n = 6) - composto por animais sedentários e tratados com extrato de *C. argyrophyllus* (200 mg/kg, vo); 4) Grupo extrato treinado (EHE-EX, n = 7) composto por animais treinados com exercício resistido e tratados com EHE de *C. argyrophyllus* a (200 mg/kg, vo). Os resultados foram representados como média ± erro padrão da média, utilizando p < 0,05. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Após avaliação da normalidade dos dados, através do teste Shapiro Wilk, os mesmos foram avaliados através do teste t de Student ou da análise de variância de uma via seguida de multiplo teste de Bonferroni. Foi utilizado o software Graph Pad Prism 5.0. Os animais receberam o extrato ou o veículo 1h antes de executarem o exercício, sendo eutanazidos 1h após o treinamento. As substâncias encontradas no extrato foram esteróides, flavanonas, flavananoís, flavonas, flavonoides, taninos, xantonas e terpenos. Devido ao baixo teor fenólico ($64,68 \pm 9,06$ mg de eq-AG/g) no extrato, foi constatado percentual de inibição do radical DPPH• próximo de 40% com baixo IAA (0,12). A administração aguda do extrato reduziu, no grupo treinado, as concentrações de CK no plasma (54,13%) e no músculo (46,35%); de LDH no plasma (30,53%); e de MDA muscular (65,51%) em comparação aos que receberam o veículo Tween 80. O extrato também reduziu no grupo sedentário, a LDH plasmática (47,14%) e muscular (65,43%). Desta forma, os resultados mostram que o extrato hidroetanólico da *C. argyrophyllus* possui vários compostos antioxidantes. Apesar de o mesmo não ter apresentado bom efeito no modelo sequestrador do radical DPPH•, foi verificada considerável proteção contra o estresse oxidativo *in vivo* baseado nos marcadores de lesão tecidual CK, LDH e MDA.

Descritores: *Croton argyrophyllus*; antioxidante; estresse oxidativo; exercício.

ABSTRACT

BIOCHEMICAL PROFILE AND EFFECTS OF EXTRACT OF *Croton argyrophyllus* AGAINST FREE RADICALS *IN VITRO* AND ON THE OXIDATIVE STRESS IN FEMALE RATS SUBMITTED TO HIGH INTENSITY WEATHERED PHYSICAL EXERCISE. Douglas Bonfim Lima. São Cristovão. 2014.

Exercise is an important tool for maintaining health and preventing several diseases like diabetes, hypertension and obesity. Additional treatments have been implemented for these patients and physical exercise stands out in this context. However, acute weathered exercise high intensity favors the production of free radicals, which can cause oxidative stress that leads to injury in the body. Have tried different ways to reduce this process, for example, through the use of natural products such as extracts of plants to alleviate the effects of free radicals due to the presence of antioxidants in that. This study aimed to investigate the phytochemical profile of the hydroethanolic extract of *C. argyrophyllus* and evaluate its effect on free radicals and in vitro against oxidative stress induced by acute weathered exercise high intensity in female rats. In the present study, the phytochemical profile of the hydroethanolic extract of stem bark of *C. argyrophyllus* was investigated by colorimetric reactions or precipitation, while the content of total phenols was quantified using the Folin-Ciocalteu method. The extract also was tested in vitro on the model radical DPPH• and to study its effect on oxidative stress, female Wistar rats (200-250 g) were divided into 4 groups: 1) Group sedentary vehicle (TW-EE, n = 7) - composed of sedentary animals treated with vehicle (Tween 80, orally), 2) Group trained vehicle (TW-EX n = 6) - consists of animals treated with vehicle (Tween 80) and subjected to protocol weathered training; 3) Group sedentary extract (EHE-EE, n = 6) - composed of sedentary animals treated with extract of *C. argyrophyllus* (200 mg/kg); 4) Group trained extract (EHE-EX, n = 7) composed of trained animals with weathered exercise and treated with EHE of the *C. argyrophyllus* (200 mg/kg). The results were presented as mean ± standard error of the mean, using p <0.05. All analyzes were performed in triplicate. After evaluating the normality of the data through the Shapiro-Wilk test, they were evaluated using the Student t test or one-way analysis of variance followed by post hoc Bonferroni. Graph Pad Prism 5.0 software was used. The animals received the extract or vehicle 1h before performing the exercise, being euthanized 1h after training. The substances found in the extract were steroids, flavanones, flavananoís, flavones, flavonoids, tannins, xanthones and terpenes. Due to the low phenolic content (64.68 ± 9.06 mg-eq AG/g) in the extract, was observed percentage inhibition of DPPH• next to 40% with low AAI (0.12). Acute administration of the extract reduced, the trained group, CK concentrations in plasma (54.13%) and muscle (46.35%); LDH in the plasma (30.53%); and MDA (65.51%) compared to those receiving the vehicle Tween 80. The extract also reduced in the sedentary group, plasma LDH (47.14%) and muscle (65.43%). Thus, the results show that the hydroethanolic extract of *C. argyrophyllus* has several antioxidant compounds. Although it has not shown good effect in the model of radical DPPH•, was observed significant protection against oxidative stress based on markers of tissue injury CK, LDH and MDA.

Keywords: *C. argyrophyllus*; antioxidant; oxidative stress; exercises.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1	Triagem fitoquímica do EHE de <i>Croton argyrophyllus</i>	21
Tabela 2	Atividade Antioxidante do EHE de <i>Croton argyrophyllus</i>	22
Figura 1	A- Avaliação da concentração de creatina quinase (CK) na fração plasmática após a administração do extrato hidroetanólico de <i>C. argyrophyllus</i> (EHE CA). B - Avaliação da concentração de creatina quinase (CK) muscular após a administração do extrato hidroetanólico de <i>C. argyrophyllus</i> (EHE CA).....	23
Figura 2	Avaliação da concentração de lactato desidrogenase (LDH) plasmática após a administração do extrato hidroetanólico de <i>C. argyrophyllus</i> (EHE CA). B - Avaliação da concentração de lactato desidrogenase (LDH) muscular após a administração do extrato hidroetanólico de <i>C. argyrophyllus</i> (EHE CA).....	24
Figura 3	A- Avaliação da concentração de malonaldeído (MDA) plasmática após a administração do extrato hidroetanólico de <i>C. argyrophyllus</i> (EHE CA). B- Avaliação da concentração de malonaldeído muscular após a administração do extrato hidroetanólico de <i>C. argyrophyllus</i> (EHE CA).....	25
Figura 4	Avaliação da concentração de sulfidrilas (tióis) muscular após a administração do extrato hidroetanólico de <i>C. argyrophyllus</i> (EHE CA).....	26

Lista de abreviaturas e siglas

AG: Ácido gálico

C. argyrophyllus: *Croton argyrophyllus*

CAT: Catalase

CK: Creatina quinase

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPPH•: 1,1-diphenil-2-picril-hidrazol

EHE CA: Extrato hidroetanólico de *Croton argyrophyllus*

EHE: Extrato hidroetanólico

EHE-EE: Extrato hidroetanólico sedentário

EHE-EX: Extrato hidroetanólico treinado

ER: Exercícios Resistidos

ERO: Espécies reativas de oxigênio

FT: Fenóis totais

GPx: glutationa peroxidase

GR: glutationa redutase

GSH: glutationa reduzida

GSSH glutationa oxidada

HPLC: *High-performance liquid chromatography*

IAA: Índice de atividade antioxidante

LDH: Lactato desidrogenase

MDA: Malonaldeído

RL: Radicais Livres

RM: Repetição máxima

SOD: superóxido dismutase

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TW-EE: Twin sedentário

TW-EX: Twin treinado

UFS: Universidade Federal de Sergipe

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Exercícios Físicos	2
2.2 Exercício Resistido.....	2
2.3 Radicais Livres	3
2.4 Antioxidantes.....	4
2.5 Exercício Resistido e Estresse Oxidativo	5
2.6 Suplementos Antioxidantes.....	6
2.7 Polifenóis	6
2.8 <i>Croton argyrophyllus</i> (<i>C. argyrophyllus</i>)	7
3 – OBJETIVOS	9
3.1 GERAL.....	9
3.2 ESPECÍFICOS	9
4 - METODOLOGIA	10
4.1 Ensaios Químicos e Fitoquímicos da <i>Croton argyrophyllus</i>	10
4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal	10
4.1.2 Preparo do extrato hidroetanólico	10
4.1.3 Prospecção fitoquímica	10
4.1.3.1 Teste para fenóis e taninos	10
4.1.3.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides	11
4.1.3.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.....	11
4.1.3.4 Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.....	12
4.1.3.5 Teste para confirmação de catequinas	12
4.1.3.6 Teste para confirmação de fenóis.....	12
4.1.3.7 Teste para esteróides e triterpenóides liebermann-buchard	13
4.1.3.8 Teste para saponinas	13
4.1.3.8.1 Teste confirmatório para saponinas.....	13
4.1.3.9 Teste para alcalóides.....	13
4.1.4 Avaliação da Atividade Antioxidante <i>In Vitro</i>	14
4.1.4.1 Atividade sequestradora do radical livre DPPH•	14
4.1.5 Quantificação do conteúdo de fenóis totais.....	15
4.1.6 Cromatografia líquida de alta eficiência	15
4.2 Ensaios Biológicos.....	16
4.2.1 Animais	16
4.2.2 Protocolo de Treinamento.....	16
4.2.3 Coleta e preparo do material biológico para análises	17
4.2.4 Determinação enzimática de lesão tecidual.....	18
4.2.4.1 Quantificação de CK total plasmática e muscular	18
4.2.4.2 Quantificação de LDH total plasmática e muscular	18
4.2.5 Determinação do Estresse Oxidativo <i>in vivo</i>	18
4.2.5.1 Determinação de lipoperoxidação	19
4.2.5.2 Determinação de sulfidrilas totais (tióis)	19
4.3 Análises estatísticas	20
5 - RESULTADOS.....	21
5.1 Determinação de fenóis totais no EHE de <i>C. argyrophyllus</i>.....	21
5.2 Prospecção fitoquímica	21
5.3 Atividade sequestradora do radial livre DPPH•.....	22
5.4 Avaliação da creatina quinase (CK) plasmática e muscular.....	22

5.5 Avaliação da LDH plasmática e muscular	23
5.6 Prevenção de lipoperoxidação.....	24
5.7 Determinação de sulfidrilas totais (tióis)	25
6 - DISCUSSÃO	27
7 - CONCLUSÃO	33
8 - REFERÊNCIAS	34

1 – INTRODUÇÃO

O exercício, quando orientado por educadores físicos, é importante para manutenção da saúde e prevenção de diversas doenças como o diabetes, hipertensão arterial e obesidade (CIOLAC; GUIMARAES, 2004). A ausência de atividade física regular, ou seja, o sedentarismo, pode gerar mau funcionamento dos sistemas fisiológicos, tendo como consequência o surgimento de doenças (MENDES et al., 2006). O exercício físico, mesmo quando praticado em intensidades entre leve e moderada, como uma simples caminhada, traz benefícios à saúde (ACSM, 1986). Apesar dos efeitos benéficos oriundos da atividade física, deve-se ter cautela em sua prática, pois os exercícios quando executados com alta intensidade nos trazem prejuízos. Os exercícios resistidos, componente dos exercícios anaeróbios, possuem a característica de serem praticados em intensidades máxima e supramáxima, o que acarreta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres (RL) devido à elevação da atividade metabólica e recrutamento de determinadas vias metabólicas, como a da xantina-oxidase (MIYAZAKI et al, 2001). Além desta evidência, outro fator que favorece o aumento da concentração de radicais livres no organismo é a reduzida ingestão de substâncias antioxidantes, o que pode contribuir para o aumento das chances de ocorrer estresse oxidativo e, consequentemente, lesões em teciduais (DROGE, 2002).

Um possível método de neutralizar os radicais livres seria o consumo de alimentos ricos em compostos antioxidantes, como as vitaminas E e C e os fitoquímicos polifenóis (MORAIS et al., 2009) Os compostos polifenólicos são bastante conhecidos quanto a sua eficácia em combater espécies reativas de oxigênio provenientes do exercício físico intenso (STOCLET et al., 2004). Os polifenóis fazem parte da composição de várias plantas, tendo destaque a espécie *Croton argyrophyllus*. Além desses compostos, a planta possui em sua composição os seguintes compostos: biciclogermacreno, espatuleno, (E)-cariofileno, β -elemeno, β -felandreno, micerno, óxido de cariofileno e terpenos, os quais possuem a capacidade de neutralizar radicais livres comprovada através de estudo (RAMOS, 2013). Dessa forma, este espécimen foi escolhido para a realização do estudo em questão, com o intuito de avaliar se o extrato hidroetanólico do vegetal seria capaz de amenizar os efeitos decorrentes do estresse oxidativo em ratas submetidas ao exercício resistido de alta intensidade.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Exercícios Físicos

Os benefícios dos exercícios físicos estão relacionados aos ajustes em vários sistemas corporais através de adaptações fisiológicas favoráveis, resultando em melhora da qualidade de vida de seus praticantes (CIOLAC; GUIMARÃES, 2004; BORGES; ARAÚJO; CUNHA, 2010). A atividade física não só previne o surgimento de enfermidades, mas também contribui para a reabilitação do indivíduo em relação a determinadas patologias adquiridas (TOSCANO; EGYPTO, 1998). Os exercícios físicos podem prevenir e tratar, por exemplo, hipertensão arterial, resistência à insulina, diabetes, dislipidemia e obesidade. Diante disso, não importa se a pessoa é saudável ou possui múltiplos fatores de risco, ela deve ser aconselhada a praticar atividade física, desde que seja capaz de participar de um programa de treinamento físico bem orientado (CILAC; GUIMARÃES, 2004). Entretanto, a intensidade do exercício pode trazer danos à saúde.

2.2 Exercício Resistido (ER)

O exercício físico pode ser classificado, em relação ao metabolismo, de duas maneiras. Os exercícios aeróbicos requerem elevado consumo de oxigênio enquanto os anaeróbicos necessitam de menor volume deste gás. Estes objetivam a hipertrofia muscular (músculo mais forte e resistente) e aumento da densidade mineral óssea. Aqueles ajudam a manter o peso corporal e o funcionamento do sistema cardiorrespiratório (PITANGA, 2002; CÂMARA et al., 2007, ADAM et al., 2013). Na categoria anaeróbia, se encontram os exercícios resistidos.

O exercício resistido é realizado no momento em que o músculo estriado esquelético contrai em oposição a uma força antagônica ao movimento (FORJAZ et al., 2003; BORGES; ARAÚJO; CUNHA, 2010). É importante ressaltar que tanto os exercícios aeróbios quanto os anaeróbios (resistidos) proporcionam benefícios à saúde (PERSGHIN et al., 1996; CIOLAC; GUIMARÃES, 2002). A prática de exercícios resistidos é recomendada até para pessoas que sofrem de hipertensão, pois pesquisas comprovaram que programas de treinamento resistido não causam prejuízo à pressão arterial de repouso. Logo, a recomendação desta atividade de modo orientado por educadores físicos, especialmente as pessoas acima de sessenta anos

podem obter melhor qualidade de vida (POLLOCK et al., 2000; CIOLAC; GUIMARÃES, 2002). É notável que idosos de ambos os sexos praticantes de exercício resistido em longo prazo apresentaram não apenas melhora da qualidade de vida, mas também resultou em ajustes metabólicos como a diminuição da glicemia, aumento da concentração de glicogênio muscular, redução da pressão sistólica e gordura do tronco, aumento da massa muscular e do nível de atividade física (devido a melhorias na marcha e no equilíbrio), inclusive houve redução do uso de medicamentos, o que não ocorreu no grupo controle (CASTANEDA et al., 2002; KENNETH; BEHM, 2005).

Devido aos benefícios advindos da prática de exercícios físicos anaeróbios, eles têm sido utilizados para atenuação de várias doenças por proporcionar ajustes nas funções cardiovasculares, no metabolismo, na diminuição dos fatores de risco coronarianos e assim, contribuir para bem-estar psicossocial. Além disso, as atividades cotidianas também se tornam mais fáceis de serem executadas devido a melhora da coordenação motora, força e resistência de fibras musculares (KELLEY; KELLEY, 2000; GRAVES; FRANKLIN, 2006; JORGE et al., 2009).

As principais fibras musculares ativas durante o ER são as do tipo IIa e IIb, cujo metabolismo conspícuo é anaeróbio (FAIAL, et al., 2007; MINAMOTO 2005). Durante a produção energética necessária para a contração dessas fibras, ocorre produção de ácido láctico, o que evidencia a reduzida eficiência energética das mesmas (KIM et al., 2014; FOSS; KETEYIAN, 1998). É importante destacar que tal produto oriundo do metabolismo anaeróbio está fortemente relacionado a produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, como o superóxido e a hidroxila (GARCÍA e DAOUD, 2002).

2.3 Radicais livres

O gás oxigênio é muito importante na geração de energia suficiente para manter a vida, principalmente dos seres mais complexos, como os multicelulares. Entretanto, as reações químicas envolvidas em seu metabolismo geram moléculas conhecidas como radicais livres (RL) (YU; CHUNG, 2006; RODRIGUES, 2005).

Os radicais livres são moléculas químicas que possuem elétrons desemparelhados na última camada, o que as torna bastante instáveis. A maneira pela qual tais substâncias buscam estabilidade é através de reações com os demais compostos celulares, cedendo elétron (radical

redutor) ou captando-o (radical oxidante) (BARREIROS, 2006; AYRES, CHAVES, 2009; BACURAU, ROSA, 2004; SEN, 2001; VANCINI et al., 2005).

De acordo com o tipo de átomo que se encontra na região instável da substância, os radicais livres são chamados de espécies reativas de nitrogênio ou espécies reativas de oxigênio. Algumas ERO não são consideradas como radicais livres, mas participam da produção dos mesmos, como por exemplo H_2O_2 , O_2 , entre outras (BARREIROS, 2006; CARPES, 2008).

Os radicais livres são necessários à vida, pois, em quantidades pequenas são responsáveis pelos seguintes eventos: aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} e da força de contração muscular, regulação da expressão gênica, do metabolismo e do fluxo sanguíneo, fagocitose e mecanismos de defesa celulares, inflamação e eliminação de substâncias tóxicas (SILVEIRA, 2004).

Entretanto, os RL, em concentrações suprafisiológicas, causam prejuízo às biomoléculas ao interagir com carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos. Tais interações podem resultar em peroxidação lipídica, oxidação proteica e envelhecimento (CHOW, 1979; FERREIRA, MATSUBARA, 1997, HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; LEITE, SARNI, 2003; SILVEIRA, 2004). No entanto, existem compostos que combatem os efeitos danosos dos radicais livres.

2.4 Antioxidantes

Antioxidantes são moléculas capazes de estabilizar os radicais livres, inibindo e/ou reduzindo as lesões ocasionadas pela ação radicalar. São classificados como endógenos enzimáticos: as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e a glutationa reduzida (GSH); endógenos não-enzimáticos são conhecidos: bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, entre outros; e exógenos: adquiridos a partir da dieta ou suplementação alimentar como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A) e grupos fenólicos de plantas como flavonóides (BIANCHI, ANTUNES, 1999; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2000; BARREIROS, 2006; CERQUEIRA et al., 2007; VALKO et al., 2007).

Os compostos antioxidantes podem desencadear ações benéficas de duas maneiras principais: a ação primária ocorre quando o antioxidante age diretamente no radical livre,

impedindo que o dano oxidativo aconteça. Já a ação secundária é verificada pela interação entre antioxidantes e produtos de reação oxidativa, como os peróxidos e hidroperóxidos, os quais são inativados (BRAVO, 1998).

Os efeitos antioxidantes se devem, em parte, a sua atividade envolvida na estabilização de proteínas responsáveis pela manutenção da estrutura intracelular e organelas como a mitocôndria (GUTIÉRREZ, 2002; ZIMMERMANN, KIRSTEN, 2008). Em resposta à geração dos radicais livres, os quais podem ser provenientes da prática de exercício físico extenuante, pode haver aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHI e ANTUNES, 1999, COSTA et al. 2013).

2.5 Exercício Resistido e Estresse Oxidativo

Os seres vivos possuem sistemas de defesa naturais contra os problemas advindos do excesso de radicais livres. Entretanto, quando as células não conseguem produzir antioxidantes em quantidade suficiente, se estabelece uma situação conhecida como estresse oxidativo (ARCEGO et al., 2014).

As causas da produção exacerbada de radicais livres podem ser, por exemplo, radiação ionizante e/ou ultravioleta, fumo, poluição atmosférica, inflamação, estresse, mutações nas enzimas antioxidantas, redução na ingestão de alimentos antioxidantes ou pró-antioxidantes e até mesmo elevação do próprio metabolismo mitocondrial (CARPES, 2008; MORAIS et al., 2009).

O exercício físico intenso favorece o estresse oxidativo, em parte, pelo maior consumo de oxigênio. Mas também, devido a ativação de determinadas vias metabólicas (ROWLANDS et al., 2004; CRUZAT et al., 2007).

Entre os mecanismos de formação de RL decorrentes do exercício físico, podemos citar o da enzima xantina oxidase, que usa oxigênio como receptor de elétrons, formando o radical superóxido. Ela é ativada quando as bombas de ATP dependentes de cálcio são interrompidas temporariamente, elevando a concentração de cálcio intracelular (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Durante a hipóxia que ocorre no momento da contração muscular, a xantina oxidase produz o radical superóxido e peróxido de hidrogênio. Já durante o relaxamento da musculatura, as reações de redução formam radicais hidroxila e superóxido (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; FINAUD, LAC, FILAIRE. 2006; PETRY et al., 2010)

O estresse oxidativo gerado pode resultar em lesões que afetam o sistema contrátil celular, já que existe risco de se manifestarem entre diferentes extratos celulares (matriz situada fora da célula, na lâmina basal e na camada fina de tecido conjuntivo que envolve a fibra muscular) (FOSCHINI, PRESTES, CHARRO, 2007; VIERCK, 2000; STUPKA., 2000; DIAS et al., 2008). Baseado nisso, é necessário o consumo de compostos antioxidantes para reduzir ou prevenir lesões decorrentes do estresse oxidativo.

2.6 Suplementos antioxidantes

Moléculas antioxidantes podem retardar ou inibir a ação de radicais livres (BIANCHI; ANTUNES, 1999), as quais podem ser obtidas diretamente dos alimentos ou através de suplementos. É comum a utilização de suplementos ricos em compostos antioxidantes, como as vitaminas E (α -tocoferol), C (ácido ascórbico) e polifenóis para prevenir danos à saúde dos praticantes de atividade física (SENTURK et al., 2005; BLOOMER, GOLDFARB, MCKENZIE, 2006).

De acordo com a natureza química do composto, o mesmo pode ter efeitos diferentes em determinadas regiões celulares. A vitamina E, solúvel em lipídeos, está entre os mais importantes inibidores de reações de peroxidação lipídica das membranas em animais. Enquanto a vitamina C, hidrossolúvel, interage com radicais livres do fluido citoplasmático, além de ser capaz de regenerar a vitamina E que foi oxidada por radicais de membranas, através de doação de elétrons. Já que diferentes antioxidantes agem de maneiras diversas, deve-se combinar mais de um para ter efeito mais eficaz (RINNE et al., 2000; HALLIWELL, 1996; MICHAEL et al., 2010; SANTOS, 2006). Além das vitaminas mencionadas, outro composto bastante conhecido entre os antioxidantes, são os polifenóis.

2.7 Polifenóis

São constituídos de estruturas químicas que vão de relativamente simples à moléculas complexas que fazem parte da composição de inúmeras espécies vegetais (RESENDE, 2006). Eles têm como funções proteger as plantas contra os predadores (insetos, pássaros e mamíferos), prevenir contra danos físicos e agentes antimicrobianos, além de serem precursores da produção de lignina e pigmentos verdes (CLIFFORD, 1985).

Os polifenóis apresentam atividade antioxidante sob duas diferentes maneiras: através da doação de hidrogênio ou ao ceder elétrons combinados com prótons (ZHANG et al., 1999). Os compostos fenólicos possuem anéis aromáticos ligados a uma ou mais hidroxilas, além dos elétrons π . Tais partículas subatômicas favorecem a estabilização do radical que é formado pela oxidação do fenol, ao perder um átomo de hidrogênio, o que explica a significativa ação antioxidante destes compostos (SANTOS, 2006).

Existe grande interesse no estudo dos polifenóis porque eles podem prevenir o estresse oxidativo, tendo como consequência, atenuação de possíveis lesões teciduais decorrentes da prática de exercício físico intenso (LUKASKI, 2004), além dos efeitos mencionados acima, também existe na literatura possível ação vasodilatadora, anticarcinogênica, analgésica, antitrombótica e anti-inflamatória (WOLLGAST, ANKLAN, 2000; EFRAIM, ALVES, JARDIM, 2011;).

É importante ressaltar que já é comprovado cientificamente que o consumo, de forma aguda ou regular, de polifenóis, reduz os danos oxidativos que poderiam ser gerados após o exercício resistido (McANULTY et al., 2004; MORILLAS-RUIZ et al., 2005). Compostos dessa natureza fazem parte da composição de várias espécies vegetais, inclusive da *Croton argyrophyllus*, utilizada em nosso estudo.

2.8 *Croton argyrophyllus* (*C. argyrophyllus*)

A família Euphorbiaceae é uma das mais diversificadas e complexas das Angiospermas devido a grande variação morfológica dos gêneros e espécies, à distribuição cosmopolita, faltando apenas na Antártica, com grande diversidade nos trópicos e ocupação de diferentes ambientes, além da conhecida importância econômica de algumas espécies (GOVAERTS et al., 2000; HEYWOOD et al., 2007; TORRES, 2009), possuindo cerca de 300 gêneros e aproximadamente 8.000 espécies (RAMOS, 2013).

O gênero *Croton* destaca-se por seu expressivo número de espécies, já que é o segundo da família Euphorbiaceae que possui maior número (aproximadamente 1200) (GOVAERTS et al., 2000). Tal gênero se distribui principalmente em regiões tropicais, sendo mais diversificado em Madagascar, Antilhas, México e Brasil (BURGER & HUFT, 1995; BERRY et al., 2005). No Brasil, são conhecidas cerca de 300 espécies, incluindo ervas, subarbustos e árvores, podendo ser vistas em vegetações abertas, florestas secas ou úmidas (TORRES, 2009).

Nos últimos anos várias espécies vegetais desse gênero estão sendo estudadas para comprovação do seu uso terapêutico na medicina popular, inclusive quanto as suas atividades antioxidante, antinflamatória, antinociceptiva e analgésica (SILVA et al., 2010; MOLLICK et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2012; MONTOPOLI et al., 2012; ZHAO et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013;), como também para o tratamento de diabetes, úlceras, problemas digestivos, hipercolesterolemia, malária e câncer (SALATINO; SALATINO, 2007).

A espécie *Croton argyrophyllus* Kunth ocorre em florestas decíduas da Venezuela, Paraguai, Bolívia e Brasil. Neste, o vegetal se encontra em solo arenoso e argiloso de caatingas arbustivas, mais especificamente nos estados da região Norte (Roraima e Rondônia) e amplamente distribuída pelo Nordeste brasileiro nos seguintes estados: Piauí, Ceará, Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Sergipe e Bahia (TORRES, 2009).

C. argyrophyllus, conhecida popularmente marmelengo ou sacatinga, possui arbusto ereto, variando entre 1 e 4 metros de altura, ramos verde-prateados, folhas simples, simétricas, de coloração prateada a prateado-amaralada, flores amarelo-prateadas, ovais a oval-triangulares, fruto amarelo-prateado, semente lisa, elipsóides e amarronzadas (SILVA; SALES; TORRES, 2009)

Esta espécie tem sido bastante estudada nos últimos anos com o intuito de conhecer mais a respeito de suas ações farmacoterapêuticas e de validar seu uso na medicina popular. Na entrecasca do vegetal foram detectados compostos com ação antioxidante como α -pineno, E-cariofileno e 1, 8-cineol (MORAIS et al., 2006; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; COSTA et al., 2008; VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2008).

Logo, este estudo tem como finalidade testar a hipótese de que o extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus* pode prevenir os efeitos do estresse oxidativo em ratas submetidas agudamente a exercício resistido de alta intensidade.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Investigar o perfil fitoquímico do extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus* e avaliar seu efeito sobre a eliminação de radicais livres *in vitro* e contra o estresse oxidativo induzido por exercício físico resistido agudo de alta intensidade em ratas.

3.2 ESPECÍFICOS

- Investigar o perfil fitoquímico cromatográfico do EHE da *C. argyrophyllus*;
- Determinar o conteúdo fenólico de *C. argyrophyllus*;
- Avaliar a capacidade antioxidante do EHE da *C. argyrophyllus* *in vitro*;
- Verificar a capacidade do EHE da *C. argyrophyllus* em prevenir lesão muscular;
- Quantificar os marcadores de lesão tecidual (CK e LDH);
- Quantificar os subprodutos da peróxidação lipídica (MDA) e oxidação de proteína plasmática e tecidual (Sulfidrilas);

4 - METODOLOGIA

4.1 Ensaios Químicos e Fitoquímicos da *Croton argyrophyllus*

4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

As entrecascas de *Croton argyrophyllus* foram coletadas em outubro de 2010, Povoado Curituba, Município de Canindé do São Francisco - SE ($9^{\circ} 39'39.8"S$, $37^{\circ}55'55.8"E$). A exsicata desta espécie foi depositada no herbário da Universidade Federal de Sergipe (UFS) sob o registro ASE 20.584.

4.1.2 Preparo do extrato hidroetanólico

As entrecascas de *Croton argyrophyllus* foram secas à temperatura ambiente e reduzidas a pó utilizando moinho de facas e, em seguida, submetidas à maceração com etanol a 90%, durante 5 dias. Após este período, o material foi filtrado e concentrado em rotaevaporador (LS LOGEN) sob pressão reduzida a 45°C , obtendo-se o extrato hidroetanólico (EHE).

4.1.3 Prospecção fitoquímica

Para a determinação dos grupos marcadores foram aplicados métodos e reações químicas clássicas que resultaram no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico. Para algumas reações, o extrato pode ser empregado diretamente, enquanto que, em outras, o solvente foi previamente eliminado. Usualmente estas reações são realizadas em tubo de ensaio ou placa de toque, podendo também ser utilizada cromatografia com reagentes específicos. Foi determinada a presença de vários compostos biológicos de acordo com Matos (1994) e Matos (1997).

4.1.3.1 Teste para fenóis e taninos

Nos tubos de ensaio de número 1, foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 1 mol. L^{-1} . Agitou-se bem e observou-se qualquer variação de cor e/ou formação de

precipitado escuro abundante. O resultado foi comparado com um teste em branco, usando-se água e FeCl_3 .

A coloração variando entre azul e vermelho é indicativo de fenóis. A formação de um precipitado azul escuro indica à presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de cor verde a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

A solução de cloreto férrico (FeCl_3) foi preparada adicionando-se 9g deste reagente em 50 mL de água destilada contendo 2 mL de ácido clorídrico 3 mol.L^{-1} . Em seguida completou-se o volume para 100 mL com etanol em um balão volumétrico. A solução de HCl 3 mol.L^{-1} foi obtida através da adição de 33,3 mL do ácido concentrado em água destilada suficiente para 100 mL de solução, em um balão volumétrico.

4.1.3.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Tomaram-se três tubos. Um tubo foi acidulado a pH 3 com HCl 3 mol.L^{-1} e os outros foram alcalinizados a pH 8,5 e 11 com NaOH 1 mol.L^{-1} . A observação de qualquer mudança da coloração da solução foi interpretada como mostrado a seguir:

Constituintes	<i>COR</i>		
	Ácido pH=3	Alcalino pH=8,5	Alcalino pH=11
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho Púrpuro
Flavanonóis	-	-	Vermelho Laranja

Fonte: Matos, 1994; Matos, 1997.

Para se obter a solução de NaOH 1 mol.L^{-1} dissolveu-se 4g deste reagente em água destilada para 100 mL de solução em balão volumétrico.

4.1.3.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

Acidulou-se um tubo por adição de HCl 3 mol.L^{-1} até pH 1-3 e alcalinizou-se outro com NaOH 1 mol.L^{-1} até pH 11. Os tubos foram aquecidos cuidadosamente.

Foi observada modificação na coloração, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior. A interpretação dos resultados foi feita como mostrado a seguir:

Constituintes	<i>COR</i>	
	Meio Ácido	Meio Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (Taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	Vermelho Laranja

Fonte: Matos, 1994; Matos, 1997

4.1.3.4 Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Em novo tubo, foram adicionados alguns miligramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. O término da reação foi indicado pelo fim da efervescência. Foi observada por comparação a mudança na cor da mistura da reação em tubos anteriores. O aparecimento ou intensificação da cor vermelha foi indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídios.

4.1.3.5 Teste para confirmação de catequinas

Foi umedecida a madeira de um palito de fósforo no extrato hidroalcoólico. Fez-se evaporar o solvente e reumedeceu-se uma face do palito com HCL concentrado, com auxílio de um bastão de vidro. Foi aquecido o palito por 2-3 minutos ao calor de uma chama de álcool, evitando que ele ficasse tostado. Observou-se se houve aparecimento de coloração no lado acidulado do palito.

- Cor vermelha ou pardo-avermelhada confirma a presença de catequinas.

4.1.3.6 Teste para confirmação de fenóis.

Em novo tubo adicionou-se 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibídico) ao extrato e após um minuto usou-se 0,5 mL de carbonato de sódio

(Na_2CO_3) e verificou-se se apareceria uma cor entre o verde e o violeta, que é indicativo de fenóis.

4.1.3.7 Teste para esteróides e triterpenóides liebermann-buchard

Adicionou-se 10 mL de uma solução hidroetanólica do extrato em bêqueres e deixou-se secar em banho-maria. Extraiu-se o resíduo seco de cada bêquer três vezes com porções de 1-2 mL de CHCl_3 . Separaram-se os extratos em tubos diferentes e colocaram-se algumas gotas de CHCl_3 . Filtrou-se a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta com miligramas de Na_2SO_4 anidro, para um tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Adicionaram-se cuidadosamente três gotas de H_2SO_4 concentrado. Agitou-se suavemente para observar o desenvolvimento de cores. A coloração azul seguida da verde permanente é um indicativo da presença de esteróides livres. Coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

4.1.3.8 Teste para saponinas

Tomaram-se os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, solubilizou-se em água destilada e filtrou-se a solução para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução, por dois a três minutos e observou-se se ocorreria formação da espuma persistente e abundante, o que indica a presença de saponinas.

4.1.3.8.1 Teste confirmatório para saponinas

Adicionou-se 2 ml de HCl concentrado ao conteúdo do tubo preparado no teste anterior e deixou-se durante pelo menos uma hora imerso em banho-maria. Esperou-o esfriar, neutralizou-o e agitou-o novamente. A presença de precipitado e a não-formação de espuma confirmam a presença de saponinas.

4.1.3.9 Teste para alcalóides

Preparou-se uma solução em 20 mL de álcool com o extrato, adicionou-se NH₄OH até pH 11 e foram extraídas as bases orgânicas com três porções de 30, 20 e 10 ml de mistura éter-clorofórmio, em funil de separação. Retirou-se a solução éter-clorofórmio, a qual foi tratada com Na₂SO₄ anidro para eliminar o excesso de água. Separou-se o filtrado e reextraiu-se as bases orgânicas com pequenas porções de HCl diluído. Rejeitou-se a solução éter-clorofórmio e repartiu-se a solução aquosa ácida obtida em três tubos de ensaio. Adicionou-se a cada tudo, respectivamente, três gotas dos reagentes de precipitação de alcalóides: “Hager”, “Mayer” e “Dragendorf”. Observou-se se aconteceria a formação de precipitado característico. Precipitado floculoso, pesado em pelo menos 2 tubos é indicativo de alcalóides.

4.1.4 Avaliação da Atividade Antioxidante *In Vitro*

4.1.4.1 Atividade sequestradora do radical livre DPPH•

A amostra do EHE da *C. argyrophyllus* foi solubilizada em metanol para obtenção de uma solução estoque de 0,5 mg.mL⁻¹ de onde alíquotas foram removidas e adicionadas a uma solução de DPPH• 40 µg.mL⁻¹ para se obter concentrações finais de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg.mL⁻¹ em um volume final de reação de 3 mL. O branco era composto de uma mistura entre a amostra analisada e metanol, sendo o ácido gálico utilizado como controle positivo.

Com o valor de absorbância, no tempo de 60 minutos foi determinada a porcentagem de DPPH• remanescente (%DPPHREM), calculado de acordo com Brand-Williams et al. (1995) a partir da equação:

$$\% \text{DPPHREM} = [\text{DPPH}\cdot]T / [\text{DPPH}\cdot]T_0 \times 100,$$

Onde [DPPH•]T é a concentração do radical no meio reacional após a reação com a amostra e [DPPH•]T₀ a concentração inicial de DPPH•.

A concentração efetiva de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do radical DPPH• em 50% (CE₅₀) foi calculada usando a % de DPPHREM no tempo de 60 minutos, em oposição às concentrações das amostras. Os resultados foram expressos em µg.mL⁻¹ ± erro padrão da média.

A absorbância medida na concentração de 25 µg.mL⁻¹ e no tempo de 60 minutos foi transformada em percentual de inibição (PI). A atividade antioxidante foi expressa também

pelo índice de atividade antioxidante (IAA), calculado de acordo com Scherer e Godoy (2009) com base na equação:

$$\text{IAA} = \text{DPPH} \cdot \text{estoque } (\mu\text{g.mL}^{-1}) / \text{CE}_{50} \text{ } (\mu\text{g.mL}^{-1})$$

Sendo a atividade antioxidante considerada fraca quando o valor da IAA é inferior a 0,5, moderada quando o IAA é maior que 0,5 e menor que 1,0. Sendo considerado forte quando o IAA estiver entre 1,0 e 2,0 e, muito forte quando o valor da IAA é superior a 2,0.

4.1.5 Quantificação do conteúdo de fenóis totais

O teor de fenóis totais do EHE da *Croton argyrophyllus* foi realizado segundo a metodologia de Sousa et al. (2007) modificada. O EHE (10 mg) foi dissolvido em 10 mL de metanol e uma alíquota (100 µL) da solução resultante foi transferida para um tubo falcon juntamente com 6 mL de água destilada e 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu 1 N, sendo agitada por 1 minuto. Depois da adição de 2 mL de Na₂CO₃ 15%, a mistura foi agitada por 30 segundos. A solução foi então diluída com água destilada para um volume final de 10 mL, incubada por 120 minutos a 23°C e a absorbância da amostra lida em espectrofotômetro UV-VIS, modelo SP22, a 750 nm. O teor de FT foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração utilizando-se como padrão ácido gálico (AG). O resultado foi expresso em mg de ácido gálico (AG) por grama de extrato. As análises foram realizadas em triplicata.

4.1.5 Cromatografia líquida de alta eficiência

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregado consistiu de um cromatógrafo líquido Shimadzu serie Prominence, com coluna analítica C18 (25,0 x 0,46 cm, partículas de 5 µm) e detector de arranjo de fotodiodos (DAD). Para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software LC Solution.

O EHE foi analisado por meio da CLAE através de um gradiente exploratório água:metanol (5-100%) durante 60 minutos para investigação do perfil fitoquímico cromatográfico. Para tanto, 2 mg da amostra do extrato EHE da *C. argyrophyllus* foi dissolvido em metanol obtendo concentração final de 1 mg.mL⁻¹, a qual foi filtrada usando membranas de nylon de 2,5 cm d.i e 0,45 µm de tamanho de poro. Em seguida, a mesma foi

injetada no CLAE analítico, com fluxo de 1 mL·min⁻¹. A identificação da amostra foi realizada a 280 nm.

4.2 Ensaios Biológicos

4.2.1 Animais

Foram utilizadas 26 ratas da linhagem Wistar com 3 meses de idade (200-250 g) obtidos do biotério do Núcleo de Pesquisa em Sinalização Intracelular, situado no Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe. As mesmas foram aleatoriamente alojadas em gaiolas apropriadas sob temperatura controlada (22°C) com ciclo claro escuro de 12 horas (luzes acesas, 06h00 – 18h00), com livre acesso à alimentação específica para roedores (Labina ®) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos descritos neste trabalho seguem as regras do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS (protocolo 26/2014).

Os animais foram divididos em 4 grupos: 1) Grupo veículo sedentário (TW-EE, n = 7) – composto por animais sedentários tratados com veículo (Tween 80, via oral (vo); 2) Grupo veículo treinado (TW-EX, n = 6) - composto por animais tratados com veículo (Tween 80, vo) e submetidos a protocolo de treinamento resistido; 3) Grupo extrato sedentário (EHE-EE, n = 6) - composto por animais sedentários e tratados com extrato EHE de *C. argyrophyllus* (200 mg·kg⁻¹, vo); 4) Grupo extrato treinado (EHE-EX, n = 7) composto por animais treinados com exercício resistido e tratados com EHE de *C. argyrophyllus* a (200 mg·kg⁻¹, vo).

4.2.2 Protocolo de Treinamento

O ER foi realizado no aparelho de agachamento segundo modelo de Tamaki et al. (1992). Os animais dos grupos TW-EX, EHE-EX passaram por 2 dias de habituação, onde os animais foram apenas manipulados e colocados no aparelho de agachamento na posição inicial do exercício por 5 min/dia, para minimizar o estresse causado pela exposição dos animais ao exercício (ROSA et al., 2004). A determinação da carga máxima foi realizada através do teste de uma repetição máxima (1RM), onde os animais foram estimulados eletricamente a tentar executar 1RM do exercício proposto (ACSM, 2006). Dois dias após a

determinação de 1RM, os animais foram exercitados através de 5 séries de 10 repetições, com intervalos de repouso de 60 s, e intensidade de 75% da carga estabelecida através do teste de uma repetição máxima (1RM), em um único dia (DEMINICE et al, 2010).

Dois dias após a determinação do valor 1RM correspondente a cada animal, foi administrado o veículo Tween 80 ou o extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus* de acordo com os grupos mencionados. Tendo se passado uma hora depois da realização da gavagem, as ratas executaram o protocolo de exercício resistido de alta intensidade ou apenas receberam a eletroestimulação e tendo se passado 1 hora, foram eutanaziadas para retirada de tecidos.

A estimulação elétrica foi realizada utilizando eletrodos auto-adesivos da marca ValuTrode, modelo CF3200, tamanho 3,2 centímetro (cm), colocado na cauda e conectado a um eletroestimulador (BIOSET, Physiotonus four, Modelo 3050, Rio Claro, São Paulo). “Os parâmetros utilizados foram: 20 V, 0.3” de duração e 3 segundos de intervalo, e a intensidade de corrente foi ajustada de maneira a qual o animal execute o movimento, variando de 4 a 15 mA (BARAUNA et al., 2005; BARAUNA et al., 2007; BARAUNA et al., 2008; PINTER et al., 2008). Esses parâmetros foram adotados porque não se associam a mudanças nas concentrações das catecolaminas, da atividade simpática e na hipertrofia adrenal (BARAUNA et al., 2005).

4.2.3 Coleta e preparo do material biológico para análises

Os procedimentos de coleta e preparo dos materiais biológicos para análises dos marcadores de lesão tecidual, bem como também para avaliar alguns dos marcadores determinantes do estresse oxidativo foram realizados conforme metodologia descrita por Sant’Anna (2005) e Lima (2011). Ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40mg/kg, i.p), o sangue foi coletado por punção cardíaca e os animais foram eutanaziados. Sangue foi imediatamente centrifugado a $800 \times g$ por 15 minutos a 4° C, com o sobrenadante armazenado a -70° C para posteriores análises. Paralelamente, o músculo gastrocnêmio direito foi retirado e lavado por 3x em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%, secos e pesados. Em seguida, homogeneizados onde cada grama de tecido foi misturado com 5 mL de KCl + 10 µL de Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF - 100 m.mol⁻¹) + 15 µL de solução Triton a 10%, centrifugada 3000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante armazenando a -70° C para posteriores análises.

4.2.4 Determinação enzimática de lesão tecidual

A quantificação da lesão tecidual provocada pelo treinamento resistido de alta intensidade foi avaliada através da mensuração dos marcadores enzimáticos de lesão tecidual como creatina-quinase (CK) e Lactato desidrogenase (LDH), utilizando kit específico laboratorial de acordo com as normas do fabricante kit comercial (Labtest®).

4.2.4.1 Quantificação de CK total plasmático e muscular

A creatina quinase é uma importante enzima reguladora da produção e utilização de fosfato de alta energia nos tecidos contráteis. Ela é encontrada estritamente dentro da musculatura esquelética, cardíaca e cérebro. Sua presença no sangue é utilizada como um marcador de lesão muscular.

Para sua quantificação, foram utilizadas as recomendações do fabricante do kit comercial (Labtest ®), onde 20 µL do plasma e do músculo de cada animal foram homogeneizados em reagentes específicos a 37 °C e realizada leitura em espectrofotômetro UV/VIS a 340 nm.

4.2.4.2 Quantificação de LDH total plasmático e muscular

O Lactato desidrogenase (LDH), está presente em praticamente todos os órgãos e tecidos do organismo e sua atividade catalítica no soro é devido à presença de várias isoenzimas, que podem formar padrões diferentes, dependendo da origem da LDH presente no soro. Nas condições (prescritas pelo fabricante do teste), a LDH catalisa a conversão do piruvato para lactato, enquanto o NADH é oxidado para NAD⁺. A atividade catalítica é determinada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH. Para quantificação foram utilizadas as recomendações do fabricante que constavam no Kit comercial (Labtest ®), onde 20 µL do plasma e do músculo de cada animal foram homogeneizados em reagentes específicos a 37 ± 0,2 °C e realizada a leitura em espectrofotômetro UV/VIS a 340 nm.

4.2.5 Determinação do Estresse Oxidativo *in vivo*

A determinação do estresse oxidativo tecidual provocado pelo treinamento resistido de alta intensidade foi realizada através da quantificação de lipoperoxidativos pelo teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e oxidativos de proteínas (proteínas sulfidrilas).

4.2.5.1 Determinação de lipoperoxidação

A oxidação de lipídios foi determinada pela medida de TBARS de acordo com método descrito por Lapenna et al (2001). Alíquotas de 200 µL das amostras de músculo gastrocnêmio foram adicionadas a uma mistura formada por partes iguais de ácido tricloroacético (TCA) 15%, HCl 0,25 N e TBA 0,375%, mais 2,5 mM de hidroxitolueno butilado (BHT), e 40 µL de dodecil de sódio (SDS) a 8,1%, sendo aquecida por 30 min à 95°C em banho-maria. O pH da mistura foi ajustado para 0,9 com HCl. O BHT foi usado para prevenir a peroxidação lipídica durante o aquecimento. Em seguida, após resfriamento à temperatura ambiente e adição de 4 mL de n-butanol, o material foi centrifugado a 800 x g por 15 minutos a 4° C e a absorbância do sobrenadante foi medida a 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⁻¹ de plasma para as amostras de sangue e nmol Eq MDA.g⁻¹ de tecido.

4.2.5.2 Determinação de sulfidrilas totais (tióis)

Os grupos sulfidrilas (SH) são estruturas associadas a proteínas e, portanto, susceptíveis a danos oxidativos. Sua quantificação revela o nível antioxidante do tecido. A determinação dos grupos sulfidrilas conforme metodologia descrita por Faure & Lafond (1995). Alíquotas de 200 µL das amostras (sangue e músculo gastrocnêmio) foram misturadas a 800 µL de tampão Tris-EDTA, pH 8,2. Em seguida, foi realizada a primeira leitura (A) no espectrofotômetro a 412 nm. Após a leitura, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio e misturadas a 20 µL de DNTB 10 mM diluído em metanol (4 mg.mL^{-1}), ficando em repouso no escuro. Após 15 minutos, a segunda leitura de absorbância (A2) foi realizada. A concentração de SH foi calculada conforme equação: $(A2 - A1) - B \times 1,57 \text{ mM} \times 1000$. O resultado foi expresso em nmol.mL⁻¹ de tecido.

4.3 Análises estatísticas

Os resultados estão representados como média \pm erro padrão da média (SEM). Foi adotada diferença estatística significativa entre as amostras para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Após avaliação da normalidade dos dados, através do teste Shapiro Wilk, os mesmos foram avaliados estatisticamente entre os grupos através do teste t de Student ou da análise de variância de uma via (*Anova one way*) seguida de pós-teste de Bonferroni. Para tanto, foi utilizado o software estatístico Graph Pad Prism versão 5.0.

5 - RESULTADOS

5.1 Determinação de fenóis totais no extrato de *C. argyrophyllus*

O teor de fenóis totais do EHE de *C. argyrophyllus* foi de $64,68 \pm 9,06$ (mg de eq-AG/g - miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de extrato). Logo, cada grama do extrato possui 64,68 mg de fenóis, compostos de reconhecida atividade antioxidante.

5.2 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica teve como objetivo conhecer os constituintes e/ou avaliar sua presença no extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus*. Esta metodologia é importante porque, além de permitir o conhecimento preliminar do comportamento químico dos extratos e facilitar a escolha do material a ser estudado, possibilita ao pesquisador adaptar as técnicas de fracionamento de extratos, isolamento e caracterização de substâncias puras, de acordo com o isolamento e purificação dos constituintes mais interessantes (MATOS, 1997).

A análise fitoquímica indicou a presença de grupos de metabólitos secundários relevantes, tais como: esteroides, flavanonas, flavananoís, flavonas, flavonoides, taninos e xantonas (Tabela 1).

Tabela 1: Triagem fitoquímica do EHE de *Croton argyrophyllus*

Componentes	Resultados	
	EHE	
Catequinas	-	
Esteroides	+	
Flavanonas	+	
Flavananoís	+	
Flavonas	+	
Flavonoides	+	
Leucoantocianidinas	-	
Saponinas	-	
Taninos	+	
Triterpenóides	-	
Xantonas	+	

Os compostos detectados no extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus*: esteroides, flavanonas, flavananoís, flavonas, flavonoides, taninos e xantonas. (+): presença da substância e (-): ausência do composto.

5.3 Atividade sequestradora do radical livre DPPH•

Tabela 2: Atividade Antioxidante do Extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus*

Amostras	PI (%)	CE ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{SE}$)	IAA
EHE	39,8	$243,8 \pm 0,25^{\text{b}}$	0,12
Ácido Gálico	92,06	$1,21 \pm 1,06^{\text{a}}$	20,66

A tabela 2, ilustra a percentagem de inibição (PI) da atividade sequestradora de radicais livres das amostras ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a concentração eficaz 50% (CE₅₀; foi calculada no tempo de 60 minutos). O índice de atividade antioxidante (IAA) foi calculado dividindo o valor da CE₅₀ pela concentração final da amostra no tempo de 60 min e classificados como fracos quando IAA $<0,5$, moderada quando $0,5 < \text{IAA} < 1$, forte, quando $1 > \text{IAA} < 2$ e muito forte quando IAA > 2 . Diferenças estatísticas foram determinadas pelo Teste t de Student's ($p < 0,05$), e os valores com letras diferentes indicam médias significativamente diferentes. O EHE de *C. argyrophyllus* apresenta uma baixa atividade antioxidante, em relação à atividade sequestradora do radical DPPH•.

5.4 Avaliação de creatina quinase plasmático e muscular

A figura 1 ilustra a quantificação da creatina quinase na fração plasmática (Figura 1A) e na musculatura esquelética (Figura 1B). A concentração plasmática de CK não apresentou diferença significativa entre o grupo sedentário que ingeriu veículo (Tween 80) do grupo sedentário que ingeriu EHE de *Croton* (Figura 1A). Todavia, a concentração plasmática de CK no grupo treinado que ingeriu EHE de *Croton* apresentou uma redução de 54,13% quando comparado ao grupo exercitado que ingeriu apenas o veículo (Figura 1A). A concentração CK no músculo gastrocnêmio não apresentou diferença significativa entre o grupo sedentário que ingeriu veículo (Tween 80) do grupo sedentário que ingeriu EHE de *Croton* (Figura 1B). Todavia, a concentração CK no tecido muscular no grupo treinado que ingeriu EHE de *Croton* apresentou uma redução de 46,35% quando comparado ao grupo exercitado que ingeriu apenas o veículo (Figura 1A).

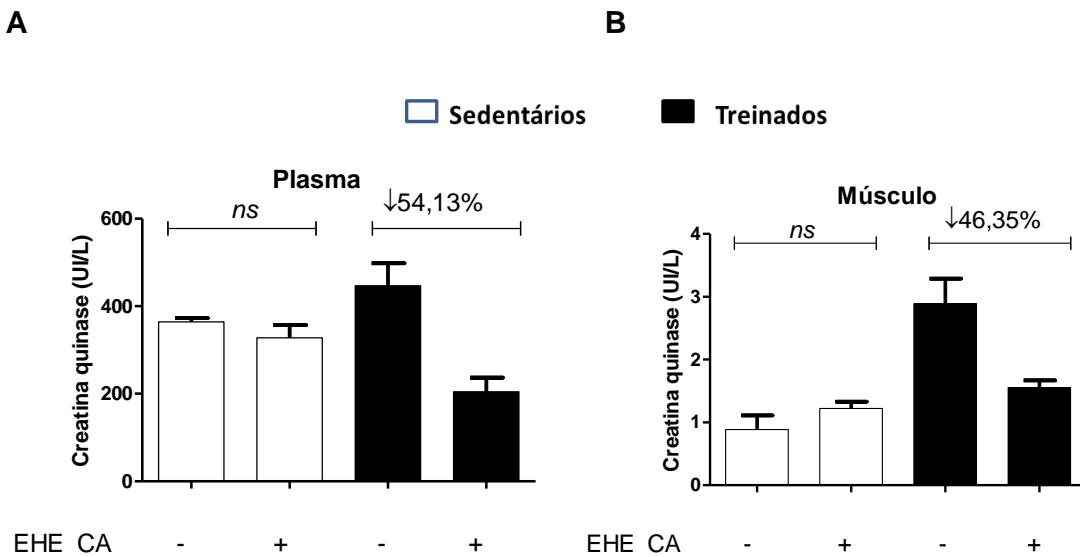


Figura 1: **A** – Avaliação da concentração de creatina quinase (CK) na fração plasmática após a administração do extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus* (EHE CA). (-) = grupo que ingeriu o veículo Tween 80; (+) = grupo que ingeriu EHE CA). **B** - Avaliação da concentração de creatina quinase (CK) muscular após a administração do extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus* (EHE CA). (-) = grupo que ingeriu o veículo Tween 80; (+) = grupo que ingeriu EHE CA). Os resultados foram representados em média \pm SEM e avaliados pela análise de variância de uma via (Anova one way) seguida de multiplo teste de Bonferroni $P<0,05$, ($n=6$ animais por grupo). Os animais sedentários são representados pelas barras abertas e os treinados, pelas barras preenchidas.

5.5 Avaliação de LDH plasmática e muscular

A concentração plasmática da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi avaliada nas frações plasmática e muscular e evidenciada na figura 2. Constatamos que concentração plasmática de LDH foi reduzida no grupo sedentário que ingeriu o EHE de *Croton* quando comparado ao grupo sedentário que ingeriu o veículo em 47,14% (Figura 2A). Além disso, a concentração plasmática de LDH no grupo treinado que ingeriu EHE de *Croton* também apresentou uma redução de 30,53% quando comparado ao grupo exercitado que ingeriu apenas o veículo (Figura 2A).

A fração muscular de LDH foi reduzida em 65,43% no grupo sedentário que ingeriu o EHE de *Croton* quando comparado ao grupo sedentário que ingeriu o veículo (Figura 2B). Já o grupo submetido ao exercício físico que recebeu a gavagem com EHE de *Croton* não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo exercitado que ingeriu o veículo Tween 80 (Figura 2B).

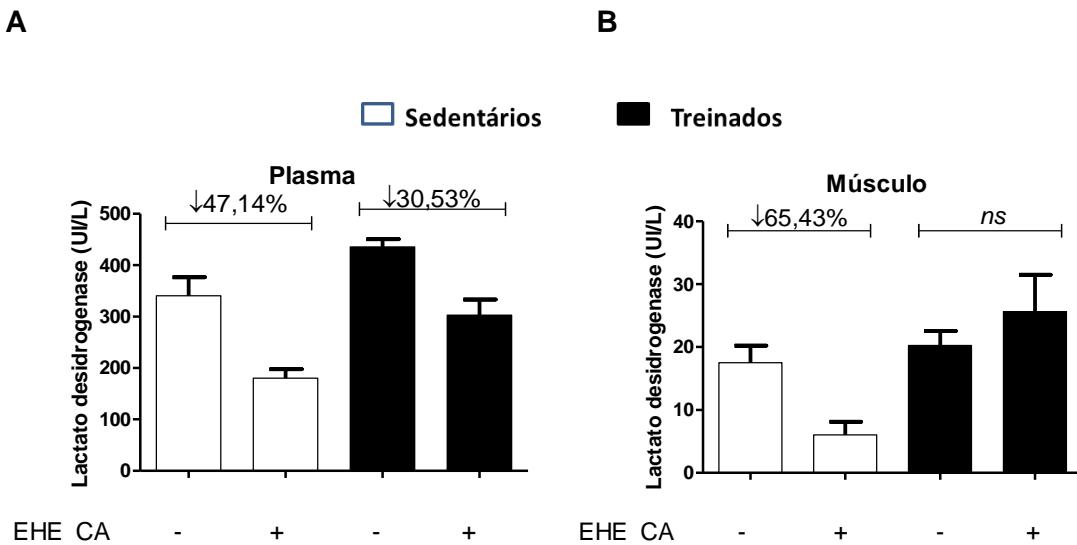


Figura 2: **A** – Avaliação da concentração de lactato desidrogenase (LDH) plasmática após a administração do extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus* (EHE CA). (-) = grupo que ingeriu o veículo Tween 80; (+) = grupo que ingeriu EHE CA. **B** - Avaliação da concentração de lactato desidrogenase (LDH) muscular após a administração do extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus* (EHE CA). (-) = grupo que ingeriu o veículo Tween 80; (+) = grupo que ingeriu EHE CA. Os resultados foram representados em média \pm SEM e avaliados pela análise de variância de uma via (Anova one way) seguida de multiplo teste de Bonferroni $P<0,05$, ($n=6$ animais por grupo). ($n=6-7$ animais por grupo). Os animais sedentários são representados pelas barras abertas e os treinados, pelas barras preenchidas.

5.6 Prevenção de lipoperoxidação

A lipoperoxidação das frações plasmática e muscular foram avaliadas e ilustradas Figura 3 pela quantificação dos produtos da lipoperoxidação de lipídios (malonaldeído). Constatamos que na fração plasmática a concentração de MDA foi semelhante no grupo sedentário que ingeriu o EHE de *Croton* quando comparado ao grupo sedentário que ingeriu o veículo (Figura 3A). Na fração plasmática do grupo treinado que ingeriu EHE de *Croton* também foi semelhante ao grupo exercitado que ingeriu apenas o veículo (Figura 3A). A concentração de MDA muscular no grupo sedentário que ingeriu o EHE de *Croton* foi semelhante ao grupo sedentário que ingeriu o veículo (Figura 2A). Já no grupo submetido ao exercício físico que recebeu a gavagem com EHE de *Croton*, a concentração de MDA na fração muscular foi reduzida em 65,51% quando comparado ao grupo exercitado que ingeriu apenas o veículo (Figura 3B).

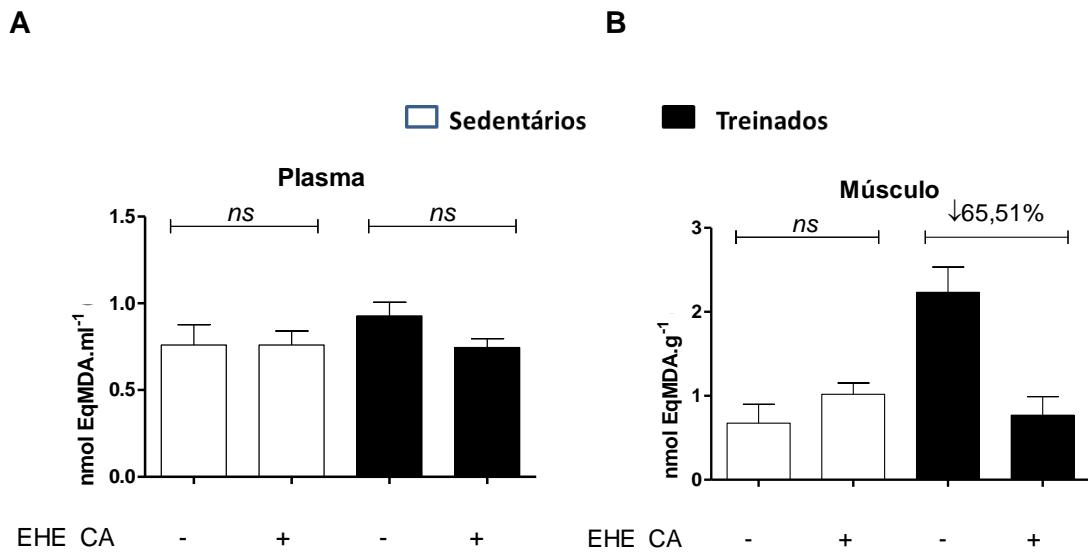


Figura 3: **A** – Avaliação da concentração de malonaldeído plasmático após a administração do extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus* (EHE CA); (-) = grupo que ingeriu o veículo Tween 80; (+) = grupo que ingeriu EHE CA). **B** - Avaliação da concentração de malonaldeído muscular. (-) = grupo que ingeriu o veículo Tween 80; (+) = grupo que ingeriu EHE CA). Os resultados foram representados em média \pm SEM e avaliados pela análise de variância de uma via (Anova one way) seguida de multiplor teste de Bonferroni P<0,05, (n=6 animais por grupo). P<0,05, (n=6-7 animais por grupo). Os animais sedentários são representados pelas barras abertas e os treinados, pelas barras preenchidas.

5.7 Determinação de sulfidrilas totais (tióis)

Foi determinada a concentração de sulfidrilas totais (tióis) na fração muscular nos grupos sedentário e submetidos ao exercício resistido que ingeriram o EHE de *Croton* (Figura 4). O conteúdo de tióis totais foi semelhante entre o grupo sedentário que ingeriu o EHE de *Croton* quando comparado ao grupo sedentário tratado com veículo (Figura 4). No grupo submetido ao exercício físico que recebeu a gavagem com EHE de *Croton*, a concentração de tióis na fração muscular também foi semelhante quando comparado ao grupo exercitado que ingeriu apenas o veículo (Figura 4).

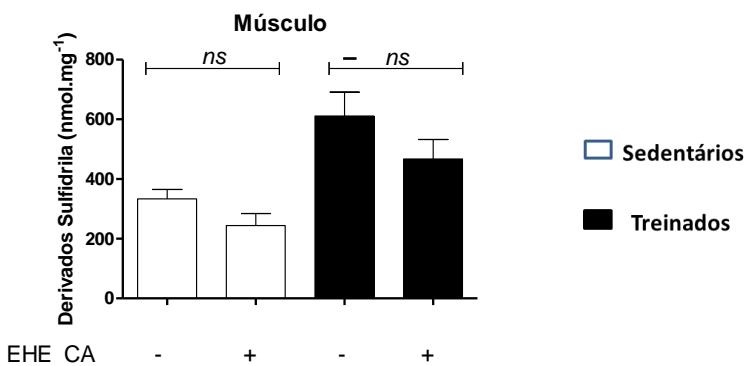


Figura 4: Avaliação da concentração de sulfidrilas (tióis) muscular após a administração do extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus* (EHE CA). Os animais sedentários são representados pelas barras abertas e os treinados, pelas barras preenchidas; (-) = tratado com o veículo Tween 80; (+) = tratado com o EHE CA). Os resultados foram representados em média \pm SEM e avaliados pela análise de variância de uma via (Anova one way) seguida de multiplo teste de Bonferroni P<0,05, (n=6 animais por grupo), (n=6-7 animais por grupo).

6- DISCUSSÃO

A concentração de compostos antioxidantes presentes em vegetais, pode favorecer a atividade biológica como agente antioxidante (SOUZA et al, 2007) Baseado nisso, foi avaliado o teor de fenóis totais no extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus*, o qual apresentou quantidade considerável destas substâncias ($64,68 \pm 9,06$ mg de eq-AG/g).

Não somente a concentração, mas também a diversidade de substâncias antioxidantes pode influenciar a capacidade antioxidant da planta (SCOTTI et al., 2007). Dessa forma, o EHE de *C. argyrophyllus*, após triagem fitoquímica, demonstrou conter considerável diversidade de compostos fenólicos, representados por flavanonas, flavananois, flavonas, flavonoides e taninos (Tabela 1). Além disso, Ramos (2013) descreve a elucidação de quarenta e dois compostos com reconhecida atividade antioxidante, antinociceptiva e analgésica na espécie utilizada neste trabalho. A composição revelada sugere que tais moléculas foram responsáveis por prevenir estresse oxidativo detectado após a realização do exercício físico resistido.

Estudos relatam que diversas substâncias fenólicas são importantes antioxidantes, uma vez que possuem esqueletos carbônicos, propício para a estabilização de radicais livres. Alguns autores relataram que a composição e o grau de hidroxilação são fatores importantes para a atividade antioxidante dos flavonoides (LARRAURI, 1996).

Os compostos fenólicos, especialmente o tanino, têm por característica apresentar grupamentos de hidroxila reativos que, por sua vez, podem reagir com a extremidade carboxílica das proteínas (SCHOFIELD et al., 2001). Segundo Artz et al. (1987), a formação de complexos tanino-proteína ocorrem principalmente através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

Na indústria alimentícia, a oxidação lipídica pode ser inibida por compostos sintéticos como o butil-hidroxi-tolueno (BHT). Todavia, esta substância pode apresentar alguns efeitos tóxicos como a formação de ERO, podendo posteriormente atacar alvos biológicos (SOARES, 2002; SOUZA et al., 2007). Desta forma, algumas pesquisas têm dado maior atenção aos compostos antioxidantes naturais que podem até mesmo substituir os antioxidantes industrializados (SOUZA et al., 2007).

De acordo com os resultados obtidos através da cromatografia líquida de alta eficiência através da análise dos tempos de retenção, deslocamento no ultravioleta e

comparação com os dados da literatura foi possível inferir a presença de compostos bioativos terpenos e compostos fenólicos no extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus*.

O método de inibição de radicais DPPH• baseia-se na transferência de elétrons de compostos antioxidantes, no caso, o extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus*, parece apresentar um baixo índice de atividade antioxidante na presença do DPPH•.

O percentual de inibição do extrato foi de 39,8%, o que significa que o mesmo foi capaz de neutralizar essa quantidade do radical DPPH• no tempo de 60 minutos. A concentração efetiva capaz de reduzir o DPPH• à metade da concentração inicial (CE_{50}) obtida pelo extrato da planta foi $243,8 \pm 0,25^b$ ($\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{SE}$), em uma hora. Atribui-se este alto valor à concentração de fenóis totais no extrato não ser elevada 64,68 mg de fenóis por grama de extrato. Sendo assim, o extrato hidroetanólico apresentou IAA considerado baixo (0,12), por ser menor que 0,5. Apesar disso, o EHE foi capaz de conferir proteção contra estresse oxidativo plasmático e muscular decorrentes do exercício físico resistido.

Este estudo objetivou avaliar a capacidade do extrato hidroetanólico de *Croton argyrophyllus* em prevenir estresse oxidativo lesão muscular e de ratas quando submetidas a um protocolo de exercício físico resistido agudo de alta intensidade, o qual exibiu um bom potencial para reduzir o estresse oxidativo em componentes lipídicos celulares.

O extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus* se mostrou capaz de atenuar significativamente o surgimento de possíveis lesões musculares, fato que ficou evidente devido ao baixo conteúdo de CK plasmático nos dois grupos submetidos à gavagem com o extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus*, a qual seria proveniente do tecido muscular lesionado. Todavia, para corroborar esta hipótese será necessária a realização de cortes histológicos para análise da morfologia tecidual.

A quantificação de CK plasmática é tida como um dos melhores biomarcadores de lesão muscular, pois ela se encontra quase exclusivamente em tecido muscular esquelético e cardíaco. Segundo alguns autores, a concentração de CK plasmática elevada é um bom preditor de dano muscular (BROWN et al., 1997).

O exercício resistido agudo de alta intensidade elevou a concentração de CK no músculo esquelético do grupo treinado que recebeu o veículo Tween. Isso se deve em parte pela grande necessidade energética imposta pelo exercício físico intenso. Tal atividade metabólica elevada pode favorecer a produção de ERO, podendo produzir radicais livres que

desencadearão lesão tecidual (YU & CHUNG, 2006). Entretanto, naqueles que ingeriram o extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus* foi possível verificar redução considerável no teor de CK muscular no grupo treinado. Provavelmente algum(ns) do(s) composto(s) do extrato de *Croton* pode(m) ter sido capaz(es) de interagir com componentes da(s) via(s) de sinalização responsáveis pela produção ou recrutamento da enzima creatina quinase. Ainda, especula-se que polifenóis possam atuar como moduladores na sinalização da expressão gênica de diversas enzimas antioxidantes (MIDDLETON a al. 2000), o que sugere que esta via poderia estar envolvida na manutenção da homeostase tecidual contra os danos musculares decorrentes da prática do exercício resistido (RODRIGUES, 2005).

O dano muscular está associado com aumentos das concentrações plasmáticas de LDH. O aumento dessa enzima vem sendo utilizado como indicador do aumento da permeabilidade celular resultante do dano muscular (CORDOVA; NAVAS, 2000).

Verificou-se redução significativa no conteúdo de LDH plasmática dos animais sedentários tratados com EHE, em relação aos sedentários que receberam o veículo Tween 80. Efeito semelhante foi obtido no plasma do grupo treinado que recebeu o mesmo extrato. Segundo a literatura, a enzima lactato desidrogenase não é capaz de atravessar a membrana plasmática, sendo assim, em nossos estudos não se descarta que ocorreu uma possível alteração da permeabilidade do sarcolema, a qual permitiu o extravasamento da enzima para o músculo, em grande quantidade. No músculo, apenas o grupo sedentário que recebeu extrato de *Croton* reduziu seu teor de LDH em 65,43%, em relação ao grupo sedentário tratado com Tween 80. No entanto, não foram observadas alterações na concentração de LDH de animais tratados com o extrato submetidos ao exercício físico, em comparação aos que receberam apenas o veículo. Logo, o extrato hidroetanólico do vegetal conferiu efeito protetor no plasma e no músculo de animais sedentários, reduzindo a concentração de LDH e possíveis lesões decorrentes de seu excesso. Já no grupo treinado, observou-se efeito protetor apenas na fração plasmática.

A isoenzima LDH₅ (MMMM) do músculo esquelético está adaptada para converter altas concentrações de piruvato a lactato (CARVALHO et al., 1998), o que pode acarretar baixo pH resultante de sua acidez, durante o exercício (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Além disso, o aumento da síntese de ácido lático, após exercícios anaeróbios com intensidades supra-máximas também contribuem significativamente para a produção de ERO (BLOOMER; GOLDFARB, 2004).

As reações de óxido-redução têm como participantes muito ativos, por exemplo, os íons ferro e cobre. Esses minerais participam da reação de Fenton, a qual libera o potente radical hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio e da hidroxila. Esse radical é capaz de iniciar a peroxidação lipídica ao retirar um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular. Como consequência, a estrutura da membrana é destruída pela elevação da concentração de hidroperóxidos (WELCH et al., 2002).

A atividade física intensa gera acidose metabólica, que pode liberar ferro da hemoglobina, o qual participa da formação do radical •OH intracelular (WELCH et al., 2002). Nas hemácias, esta liberação produz meta-hemoglobina, sobretudo quando as concentrações de glutationa reduzida estão baixas. A peroxidação lipídica da membrana decorrente da liberação do ferro resulta em hemólise (COMPORI et al., 2002).

Em relação às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, o grupo treinado que ingeriu EHE de *Croton* apresentou redução de 65,51% de MDA muscular em relação ao grupo exercitado que ingeriu o veículo Tween 80. Portanto, verificou-se redução da peroxidação lipídica, pois o extrato diminuiu a quantidade de malonaldeído no tecido muscular, preservando a integridade celular.

O malonaldeído é uma substância pertencente à função orgânica aldeído, o qual possui cadeia curta, cuja concentração é medida pela reação com o ácido tiobarbitúrico. O teor de MDA tem sido utilizado para estimar a intensidade da peroxidação lipídica celular através da formação de malonaldeído que ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos (BONNES; GUÉRIN, 1992).

Não só a membrana plasmática, mas também as organelas citoplasmáticas podem ser prejudicadas pelas ERO. Entretanto, a membrana oxidada gera consequências mais desfavoráveis, pois resulta na peroxidação lipídica, que afeta todo o metabolismo celular devido à alteração da estrutura e da permeabilidade das membranas celulares (FERREIRA et al., 1997). Os lipídios das membranas são geralmente insaturados, o que os torna bastante susceptíveis à oxidação lipídica (PEARSON, 1977). A peroxidação dos fosfolipídios aumenta as concentrações de MDA, elevando a rigidez e a deformidade das membranas das hemácias, que por sua vez aumenta as possibilidades de ocorrer hemólise (ONGAJOOOTH et al., 1996).

A peroxidação lipídica favorece a produção de substâncias tóxicas à célula, como por exemplo, o malonaldeído (MDA), podendo causar a morte celular (FERREIRA et al., 1997). O malonaldeído pode ser formado "in vivo" ou pré-formado em alimentos. A maior parte dos

produtos de oxidação lipídica, como o MDA e óxidos de colesterol têm chamado a atenção da comunidade científica devido à sua provável relação com a formação de câncer (PEARSON et al., 1983 e ADDIS, 1986) e mutagenicidade (MUKAI; GOLDSTEIN, 1976)

Sobre as sulfidrilas totais musculares, notou-se que não houve diferença significativa ao se comparar o grupo sedentário tratado com extrato hidroetanólico de *C. argyrophyllus*, com o que recebeu o veículo. O mesmo vale para os grupos treinados, pois também não houve significância entre os que receberam gavagem de extrato e os tratados com veículo Tween. Entretanto, verificou-se diferença entre os grupos que receberam o veículo, visto que o treinado apresentou oxidação de grupos sulfidrilas 45,35% maior do que o submetido a apenas eletroestimulação. Também verificamos que, entre os grupos tratados com extrato hidroetanólico, ocorreu dano 47,63% maior às sulfidrilas dos treinados em comparação com os sedentários. Isso aconteceu porque provavelmente não houve tempo para recrutamento do sistema de defesa antioxidante das glutationas no tecido muscular, resultando possivelmente em oxidação de proteínas (LIMA, 2011).

Ocorre diminuição da quantidade de glutationa reduzida (GSH) e aumento da produção de glutationa oxidada (GSSG) na inativação de um agente oxidante. Todavia, haverá recuperação da GSH se o sistema de óxido-redução estiver íntegro. No entanto, caso haja excesso de agentes oxidantes e/ou depleção do sistema antioxidante, os níveis de consumo de GSH e a produção de GSSG estarão desequilibrados, característica do estresse oxidativo (SHAN; AW; JONES, 1990).

A formação de pontes dissulfeto nas proteínas portadoras de grupamento tiol é favorecida pelo excesso de GSSG, pois o meio se torna mais pró-oxidante. A atividade destas enzimas fica reduzida como resultado da oxidação causada pelas pontes dissulfeto. A ação de compostos antioxidantes, como a GSH, pode reverter esta oxidação (GILBERT, 1990).

A membrana plasmática dos eritrócitos é rica em grupos tióis, os quais podem ser convertidos em componentes dissulfeto pelos agentes oxidantes, induzindo a desnaturação das proteínas da membrana (GILBERT, 1990). Neste processo, pode ocorrer lesão intracelular, que forma os corpúsculos de Heinz pela oxidação da hemoglobina à Meta-Hemoglobina, (WINTERBOURN, 1990). Além disso, a membrana dos glóbulos vermelhos também está sob ataque de agentes oxidantes. Logo, o estresse oxidativo intracelular pode ocorrer devido aos produtos desta lipoperoxidação (RICE-EVANS et al., 1986).

A lesão da membrana da hemácia pode resultar da associação dos fenômenos de lipoperoxidação, formação de corpúsculos de Heinz e oxidação dos grupos sulfidrila. Caso a atividade do sistema antioxidante seja superada, o estresse oxidativo resultará em lise celular. É importante salientar que os processos mencionados podem ser generalizados para vários tecidos do organismo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

7- CONCLUSÃO

O extrato hidroetanólico da entrecasta de *Croton argyrophyllus* apresentou em sua composição, significativa diversidade de compostos antioxidantes. A reduzida concentração de fenóis totais encontrada pode ter sido responsável pela baixa atividade antioxidante no modelo radicalar de DPPH•. Apesar disso, quando administrado oralmente, o extrato apresentou considerável efeito protetor plasmático e muscular para os marcadores (CK, LDH e MDA) de lesão proveniente do estresse oxidativo desencadeado pelo exercício físico resistido de alta intensidade, não apresentando proteção contra oxidação de proteínas sulfidrila.

8- REFERÊNCIAS

- ADAM, B. O.; FANELLI, C.; SOUZA, E. S.; STULBACH, T.E.; MONOMI, P.Y. Conhecimento nutricional de praticantes de musculação de uma academia da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Sports Nutrition** v. 2, n. 2, 24–36, Março. 2013.
- ADDIS, P.B. Occurrence of lipid oxidation products in foods. **Food Chem. Toxicol.** 24(10/11):1021. 1986.
- ALMEIDA, T.S.; ROCHA, J.B.T.; RODRIGUES, F.F.G.; CAMPOS, A.R; COSTA, J.G.M. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 630-633, 2013.
- ARAÚJO, D. S. M. S.; ARAÚJO, C.G.S. Aptidão física, saúde e qualidade de vida relacionada à saúde em adultos. **Rev Bras Med Esporte**, v. 6, n. 5 – Set/Out. 2000.
- ARCEGO, D. M.; KROLOW, R.; LAMPERT, C.; NOSCHANG, C.; FERREIRA, A. G. K.; SCHERER, E.; WYSE, A. T. S.; DALMAZ, C. Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: Effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. **Physiology & Behavior** 124, 23–32, 2014.
- ARNHOLD, A. L.; HECK, T. G. Método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e sua importância para a avaliação da peroxidação lipídica em diversas aplicações. XXII Seminário de Iniciação Científica, Unijuí. 2014
- AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1509-1512. 2009.
- AZEVEDO, P. H. S. M.; DEMAMPRA, T. H.: OLIVEIRA, G. P.; BALDISSERA, V.; BÜRGER-MENDONÇA, M.; MARQUES, A. T.; OLIVEIRA, J. C.; PEREZ, S.E. A. Efeito de 4 semanas de treinamento resistido de alta intensidade e baixo volume na força máxima, endurance muscular e composição corporal de mulheres moderadamente treinadas. **Brazilian Journal of Biomotricity**. v. 1, n. 3, p. 76-85. 2007.
- BACURAU, R. F. P.; ROSA, L. F. B. P. C. Produção de espécies reativas de oxigênio durante a atividade física. In: LANCHÁ JR, A.H. Nutrição e Metabolismo Aplicado à Atividade Motora. São Paulo: Atheneu, p.151-153. 2004
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123. 2006.
- BERRY, P. E.; HIPP, A. L.; WURDACK, K. J.; VAN Ee, B.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe *Crotoneae* (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF sequence data. **American Journal of Botany** 92: 1520-1534, 2005.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130. 1999.

BLOOMER, R. J.; GOLDFARB, A. H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. **Can J Appl Physiol.** 29:245-63. 2004.

BLOOMER, R.; GOLDFARB, A.; MCKENZIE, M.; YOU, T., & NGUYEN, L. Effects of Antioxidant Therapy in Women Exposed to Eccentric Exercise. **International Journal of Sport Nutrition & Exercise Metabolism**, 14(4), 377-388. 2006.

BONNES, T., GUÉRIN, T. Is malonaldeyde a valuable of peroxidation? **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 985-988. 1992.

BORGES, G. A.; ARAÚJO, S. F. M.; CUNHA, R. M. Os benefícios do treinamento resistido para portadores de diabetes mellitus tipo II. **Lecturas Educación Física y Deportes**, v. 15, p. 1-1. 2010.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333. 1998.

BROWN, S. J. et al. Indices of skeletal muscle damage and connective tissue breakdown following eccentric muscle contractions. **European Journal of Applied Physiology**. 75: 369-374. 1997

BURGER, W.; HUFT, M.. Euphorbiceae. In: Flora Costaricensi Fieldiana II. 36:1-169. 1995.

CÂMARA, L. C.; SANTARÉM, J. M.; WOLOSKER, N.; DIAS, R. M. R.; Exercícios resistidos terapêuticos para indivíduos com doença arterial obstrutiva periférica: evidências para a prescrição. **J Vasc Bras**;6(3):247-257. 2007.

CARPES, S. T. Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de Apis melífera L. da região Sul do Brasil. 2008. 255 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CARVALHO, C. S.; ROSA, R.; SASSAKI, K. T.; BACILA, M. PURIFICAÇÃO E ISOENZIMAS DA LACTATO DESIDROGENASE DO MÚSCULO EPAXIAL DE Prochilodus scropha e Notothenia neglecta. **Arch. Vet. Scienc.** 3(1):65-72. 1998.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. F.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Rep**;100:126-31 1985

CASTANEDA, C.; LAYNE, L. E.; ORIANS, L. M.; GORDON, P. L.; WALSMITH, J.; FOLDVARI, M. et al. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. **Diabetes Care**; 25:2335-41, 2002.

CAVALCANTI, J. M.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DINIZ, L. R. L.; PORTELLA, V. G.; COSTA, C. O.; LINARD, C. F. B. M.; ALVES, K.; ROCHA, M. V. A. P.; LIMA, C. C.; CECATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. The essential oil of *Croton zehntneri* and transanethole improves cutaneous wound healing, **Journal of Ethnopharmacology**, v.144, n.2, p. 240-247. 2012

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449. 2007.

CHOW, C. K. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. **Am J. clin Nutr**, 32:1066-1081. 1979.

CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Physical exercise and metabolic syndrome. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niterói, v. 10, n. 4, p. 319-324. 2004.

CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Importância do exercício resistido para o idoso. **Rev. Soc. Cardiol. Estado São Paulo**, São Paulo, v. 12, p. S15-26. 2002.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am. J. Clin. Nutr.** 72(suppl), 637S–46S, 2000.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. Coffee. London: Elsevier Science Publishers. p. 153-202, 1985.

COMPORTE M, SIGNORI C, BUONOCORE G, CICCOLI L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. **Free Rad Biol Med**; 32:568-776, 2002.

COOK, J. et., Self-Reported Physical Inactivity by Degree of Urbanization - United States, 1996. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 47, n. 50, p. 1097-1100, Dec 25 1998.

CORDOVA, A.; NAVAS, F. J. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. **Rev Bras Med Esporte**, Niterói , v. 6, n. 5, Oct. 2000.

COSTA, A. B.; OLIVEIRA, A. M. C.; SILVA, A. M. O.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Atividade antioxidante da polpa, casca e sementes do noni (*morinda citrifolia linn*). **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal – SP**, v. 35, n. 2, p. 345-354. 2013.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E. O.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.; SANTOS, P. F. Composição química e avaliação da atividade anti bacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 583-6. 2008.

CRUZAT, V. F. et al. Current aspects about oxidative stress, physical exercise and supplementation. **Rev Bras Med Esporte**; 13(5): 336-342. 2007.

DEMINICE, R.; SICCHIERI, T.; PAYÃO, P. O.; JORDÃO, A. A. Blood and salivary oxidative stress biomarkers following an acute session of resistance exercise in humans. **Int J Sports Med.** Sep;31(9):599-603. 2010.

DIAS, R.; FROLLINI, A. B.; PRESTES, J.; TEIXEIRA, L. F. M.; CEREJA, D. M.P.; BAGANHA, R. J. et al. Exercícios de força e parâmetros imunológicos: contagem leucocitária, inflamação e regeneração. **R. bras. Ci. e Mov**;16(3):100-107. 2008.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev** 82: 47-95. 2002.

EFRAIM P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 181-201. 2011.

EVANS, W. J. Vitamin E, vitamin C, and exercise. **Am J Clin Nutr**, 72(suppl): 647S–52S. 2000.

FAURE, P.; LAFOND, J. L. Measurement of plasma sulphhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: FAVIER, A. E. et al. (Eds.). **Analysis of Free Radicals in Biological Systems**. Basel: Birkhäuser Verlag, p. 237-248. 1995.

FAIAL, C. S. G.; DA SILVA, L. J. F.; DE PAULA, A. R. J.; SIMÃO, R. SPINETI, J.; MORAES, E. R. A Composição de Fibras Musculares pelo Teste de Potência Flegner em Corredores Fundistas, Meio-Fundistas e Velocistas. **Fit Perf J**. 6(5): 321-4. 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras**, São Paulo , v. 43, n. 1, Mar. 1997.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. **Sports Med**. 36:327-58. 2006

FORJAZ, C. L. M.; REZK, C. C.; MELO, C. M.; SANTOS, D. A.; TEIXEIRA, L. A.; NERY, S. S.; TINUCCI, T. Exercício resistido para o paciente hipertenso: indicação ou contra-indicação. **Revista brasileira de hipertensão**. São Paulo, v. 10, n. 2, p. 119-124. 2003.

FOSCHINI, D.; PRESTES, J. CHARRO, M. A. Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Humano.**; 9(1): 101-106. 2007.

FOSS, M. L.; KETEYIAN, J. S. Fox's Phisiological basis for exercise and sport. McGraw-hill. 1998.

GARCÍA, J. A. V.; DAOUD, R. Efeitos dos antioxidantes fenólicos na prática desportiva. **Fitness & Performance Journal**, v.1, n.4, p.21-27. 2002.

GILBERT, H. F.; Mc LEAN, V. M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**; 63: 69-172. 1990

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381. 2007.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A. World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae and Pandaceae. **The Royal Botanic Gardens**, Kew, v. 2, 417-536. 2000.

GRAVES, J. E.; FRANKLIN, B. A. Treinamento Resistido na Saúde e Reabilitação. Rio de Janeiro: **Revinter**. 2006.

GROUSSARD, C.; MACHEFER, G.; RANNOU, F.; FAURE, H.; ZOUHAL, H.; SERGENT, O.; et al. A. Physical fitness and plasma non-enzymatic antioxidant status at rest and after a Wingate test. **Can J Appl Physiol.**;28:79-92. 2003.

AMERICAN COLLEGE OF SPORT MEDICINE. **Guidelines for exercise test and prescription.** Philadelphia: Lea Febiger. 1986.

GUTIÉRREZ, J. R. V. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. **Revista Cubana de Medicina Militar**, v. 31, n. 2, p. 126-133. 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radical Biology and Medicine, 3rd edition. Oxford: **Oxford University Press**. 1999.

HALLIWELL, B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? **Free Radical Research** 25, 439-454. 1996.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. New York: **Oxford Science Publications**, 3. ed. 2000.

HELLSTEN, Y., APPLE, F.S.; SJÖDIN, B. Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. **J Appl Physiol.** 81:1484-7. 1996.

HEYWOOD, V. M.; BRUMMITT, R. K.; CULHAM, A.; SEBERG, O. Flowering Plant Families of the World. **Firefly Books**, 424p. 2007.

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

JORGE et al. Treinamento resistido progressivo nas doenças Musculo esqueléticas crônicas. **Rev Bras Reumatol** . 49(6):726-34. 2009.

KELLEY, G. A. KELLEY, K. S. Progressive resistance exercise and resting blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Hypertension**.; 35:838-43, 2000.

KENNETH, A.; BEHM, D. O Impacto do Treino de Resistência à Instabilidade no Equilíbrio e Estabilidade. **Sports Med.** Vol 35: 43-53, 2005.

KIM, G. D.; RYU, Y. C.; JO, C.; LEE, J. G.; YANG, H. S.; JEONG, J. Y.; JOO, S. T. The characteristics of myosin heavy chain-based fiber types in porcine longissimus dorsi muscle. **Meat Science** 96., 712–718. 2014

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.** 16(4):433-441. 2003.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Rev. Brás. Nutr. Clin.** 18(2): 87-94. 2003.

LIMA, C. A. Atividade redox-protetora da *Passiflora cincinnata Mast* sobre o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da

Saúde) - Núcleo de Pós-Graduação em Medicina , Universidade Federal de Sergipe, Aracaju. 2011.

LUKASKI, H. C. Vitamin and mineral status: effects on physical performance. **Nutrition.** 20(7-8): 632-44. 2004.

MATOS, F. J. A. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais. Projeto para pequenas comunidades. Fortaleza: UFC. 1994.

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: UFC. 2ed. 1997.

MATSUDO, V. K. R. et al. Physical education, health and well-being. International Council of Sport Science and Physical Education. **World Summit on Physical Education**, Berlin, p. 85-94. 1999.

MCANULTY, S. R.; MCANULTY, L. S.; NIEMAN, D. C.; DUMKE, C. L.; MORROW, J. D.; UTTER, A. C.; HENSON, D. A.; PROULX, W. R.; GEORGE, G. L. Consumption of blueberry polyphenols reduces exercise-induced oxidative stress compared to vitamin C. **Nutr. Res.** 24:209-221. 2004.

MCARDLE, A.; PATTWELL, A.; VASILAKI A.; GRIFFITHS, R. D.; JACKSON, M. J. Contractile activityinduced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. **Am J Physiol Cell Physiol.** 280:C621-7. 2001.

MENDES, M. J. F. L. et al. Associação de fatores de risco para doenças cardiovasculares em adolescentes e seus pais. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**, Recife , v. 6, supl. 1, May. 2006

MICHAEL J et al. Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats.. **Experimental Gerontology** 45, 882–895. 2010.

MINAMOTO, V. B. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. **Fisioterapia e pesquisa;** 12(3): 50-5, 2005.

MIYAZAKI, H.; OHISHI, S.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; TOSHINAI, K.; HA, S.; JI, L. L., OHNO, H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. **Eur J Appl Physiol;** 84: 1-6. 2001.

MOLLICK, A. S.; SHIMOJI, H.; DENDA, T.; YOKOTA, M.; YAMASAKI, H. *Croton Codiaeum variegatum* (L.) Blume cultivars characterized by leaf phenotypic parameters, **Scientia Horticulturae**, v.132, p.71-79. 2011.

MONTOPOLI, M.; BERTIN, R.; CHEN, Z.; BOLCATO, J.; CAPARROTTA, L.; FROLDI, G. *Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanom a SK23 and colon cancer HT29 cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.144, n.3, p. 747-753. 2012.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 315-320. 2009.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S.; BERTINI, L. M.; OLIVEIRA, C. L.; RODRIGUES, J. R.; CARDOSO, J. H. Larvicidal activity of essential oils from brazilian *Croton* species against Aedesaegypti L. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 161-4. 2006.

MORILLAS-RUIZ, J. M.; VILLEGAS, G. J. A.; LÓPEZ, F. J.; VIDAL-GUEVARA, M. L.; ZAFRILLA, P. Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress. **Clinical Nutrition**. 25: 444–453. 2006.

MUKAI, F. H. and GOLDSTEIN, D. B. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. **Science**, N.Y., 191:868. 1976.

MUNN, J.; HERBERT, R. D.; HANCOCK, M. J.; GANDEVIA, S. C. Resistance training for strength: effect of number of sets and contraction speed. **Med SciSports Exerc.**, v. 37, n. 9, p. 1622-1626. 2005.

ONGAJOOOTH, L.; ONGAJYOOOTH, S.; LIKIDLILID, A., CHANTACHUM, Y., SHAYAKUL, C., NILWARANGKUR, S. Role of lipid peroxidation, trace elements and antioxidant enzymes in chronic renal disease patients. **Journal of the Medical Association of Thailand**, Bangkok, v.79, n.12, p.791- 800. 1996.

PEARSON, A. M.; GRAY, I. J.; WOLZAK, A. M.; HORENSTEIN, N. A. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. **Food Technol.**, 37:121. 1983.

PEARSON, A. M.; LOVE, J. D.; SHORLAND, F. B. Warmed-overflavor in meat, poultry and fish. **Adv. Food Res.**, 23:1. 1977.

PERSGHIN, G.; PRICE, T. B.; PETERSEN, K. F.; RODEN, M.; CLINE, G. W.; GEROW, K.; et al. Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. **N Engl J Med**;335:1357-62. 1996.

PETRY, E. R; ALVARENGA, M. L.; CRUZAT, V. F.; TIRAPEGUI, J. Exercício físico e estresse oxidativo: mecanismos e efeitos. **R. bras. Ci. e Mov**;18(4):90-99. 2010.

PIERCE, K.; ROZENEK, R.; STONE, M. H. Effects of high volume weight training on lactate, heart rate, and perceived exertion. **J Strength Cond Res**. v.7, n. 4, p. 211-215. 1993.

PITANGA, F. J. G. Epidemiologia, atividade física e saúde. **Rev. Bras. Ciênc. e Mov**, Brasília. v.10, n.3 p. 49-54. 2002.

POLLACK, M.; LEEUWENBURGH, C. “Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: Free radicals, aging, antioxidants and disease,” in C. K. Sen, L. Packer, and O. Hanninen (eds.), *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier Science B.V, pp. 881–923. 1999.

POLLOCK, M. L. et al. Resistance Exercise in individuals with and without cardiovascular disease: Benefits, Rationale, Safety, and Prescription An Advisory From the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, **American Heart Association**. Circulation v. 101, p. 828-833. 2000.

RAMOS, J. M. O. Identificação dos constituintes químicos e estudo farmacológico do óleo essencial das folhas da *Croton argyrophyllus Kunth*. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) UFS/SE, Aracaju. 2013.

RESENDE, M. L. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a germinação de sementes de café (*Coffea arabica L.*). Tese CV. Rubi. 2006.

RICE-EVANS, C.; BAYSAL, E.; FLYNN, D. Kontoghiorghe G. Iron-mediated free radical effects on erythrocytes: the role of desferrioxamine. **Biochem Soc Trans**; 14: 368-9. 1986.

RINNE, T.; MUTSCHLER, E.; WIMMER-GREINECKER, G.; MORITZ, A.; OLBRICH, H.G. Vitamins C and E protect isolated cardiomyocytes against oxidative damage. **Int. J.Cardiol.** 75, 275–281. 2000.

RODRIGUES, E. L. **O efeito da suplementação de vitaminas antioxidantes no equilíbrio pró e antioxidante de ratos submetidos ao treinamento de natação a 80% da carga máxima**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – São José dos Campos:UniVap. 92p. 2005.

ROWLANDS, D. S.; DOWNEY, B.; Physiology of triathlon. In: Garrett WE Jr, Kirkendall, DT, editors. **Exercise and sport science**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 921-2. 2000.

SANT'ANNA, L. C. **Avaliação da composição química da semente de abóbora (*Cucurbita pepo*) e do efeito do seu consumo sobre o dano oxidativo hepático de ratos (*Rattus norvegicus*)**. 69f. (Dissertação de mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2005.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; Negri, G.; **J. Braz. Chem. Soc.**, 18, 11, 2007.

SANTOS, A. B. **Atividade Antioxidante de Extratos Vegetais da Flora Brasileira: Estudo com Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e Teoria do Funcional da Densidade (TFD)**./ Adevailton Bernardo dos Santos. Ribeirão Preto, 2006.

SCHEIBMEIR, H. D.; CHRISTENSEN, K.; WHITAKER, S. H.; JEGAETHESAN, J.; CLANCY, R.; PIERCE, J. D. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. **Intensive and Critical Care Nursing**.v. 21, p. 24-28. 2005.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte** - v. 10, n. 4 – Jul/Ago, 2004.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 43, n. 2, abr./jun. 2007

SEN, C. K. Antioxidants in Exercise Nutrition. **Sports Medicine**. 31(13):891-908. 2001.

SENTURK, U. K.; YALCIN, F. G.; KURU, O.; MEISELMAN, H. J.; BASKURT, O. K. Effect of antioxidant vitamin treatment on the time course of hematological and hemorheological alterations after an exhausting exercise episode in human subjects. **Journal of Applied Physiology**. p. 1272-1279. 2005

SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**; 47: 61-71. 1990.

SIGNORINI, J. L.; SIGNORINI, S. L. Atividade física e radicais livres: aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos. São Paulo: **Ícone**. 192p. 1995.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; TORRES, D. S. C. O gênero *Croton* (*euphorbiaceae*) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia** 60 (4): 879-901. 2009

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 193-207. 2012.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, v. 31, p. 669-682. 2010.

SILVEIRA, L. R. Considerações Críticas e Metodológicas na Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio em Células Musculares Durante Contrações. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 48(6):812-822. 2004.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr**, v. 15, n. 1, p. 71-81. 2002.

SOUSA et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 351-355. 2007.

STOCLET, J. C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M. H.; El BEDOUI, J.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V. B. Vascular protection by dietary polyphenols. **European journal of pharmacology**, v. 500, n. 1, p. 299-313. 2004.

STUPKA, N. et al. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercice. **J Appl Physiol**. 89:2325-2332. 2000.

TORRES, D. S. C. **Diversidade de Croton (Euphorbiaceae) no bioma caatinga.**/ Daniela Santos Carneiro. – Feira de Santana, 296f.: il. tab., graf. 2009.

TOSCANO, J. J. O.; EGYPTO, E. P. Freqüência da prática de exercícios físicos em indivíduos com diagnóstico de lombalgia em clínicas de reumatologia. **Anais do XXI Simpósio Internacional de Ciências do Esporte**, São Paulo, 8 a 11 de outubro, p. 130. 1998.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. A. N.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84. 2007.

VANCINI, R. L.; LIRA, C. A. B.; ABOULAFIA, J.; NOUAILHETAS, V. L. A. Radicais Livres, estresse oxidativo e exercício. São Paulo: UNIFESP. 2005. Disponível em <www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf>, acesso em 03/12/2014.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: Cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528. 2008.

VIERCK J et al. Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. **Cell Biol Int**; 24(5): 263-272. 2000.

WELCH, K. D.; DAVIS, T. Z.; VAN EDEN, M. E.; AUST, S. D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radical Biol Med**; 32: 577-83. 2002.

WINTERBOURN, C. C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Methods Enzymol**; 186: 264-72. 1990.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Research International**, Essex. v. 33, n. 6, p. 449-459. 2000.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, v. 74, n.1, p. 139-162, 1994.

YU, B. P.; CHUNG, H. Y. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. Mechanisms of Ageing and Development, **Pusan**, v.127, n.2, p.436–443, jan./feb. 2006.

ZHANG, Y. Theoretical methods used in elucidating activity differences of phenolic antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.76, n.6, p.745-748. 1999.

ZHAO, J.; FANG, F.; YU, L.; WANG, G.; YANG, L. Anti-nociceptive and antiinflammatory effects of *Croton crassifolius* ethanol extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 367-373. 2012.

ZIMMERMANN, A. M.; KIRSTEN, V. R. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. **Disc. Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria. v. 9, n. 1, p. 51-68. 2008.