

UNIVERSIDADE FERDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – DCF

ANA JÚLIA FLOR NEVES

**EFEITOS DA MELATONINA E DO EXTRATO
PADRONIZADO DE *Angelica keiskei* E *Panax
ginseng* SOBRE A PERFORMANCE FÍSICA**

SÃO CARLOS – SP
2025

ANA JÚLIA FLOR NEVES

Efeitos da Melatonina e do Extrato Padronizado de *Angelica keiskei* e *Panax ginseng* Sobre a Performance Física

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck

SÃO CARLOS – SP
2025



FICHA CATALOGRÁFICA

Neves, Ana Júlia Flor

Efeitos da Melatonina e do Extrato Padronizado de Angelica keiskei e Panax ginseng Sobre a Performance Física / Ana Júlia Flor Neves -- 2025.
51f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos
Orientador (a): Wladimir Rafael Beck
Banca Examinadora: Wladimir Rafael Beck, Gerson Jhonatas Rodrigues, Victor Fabricio
Bibliografia

1. Ciências Fisiológicas. 2. Avaliação da Performance. 3. Ergogenia. I. Neves, Ana Júlia Flor. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)
DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR Bibliotecário responsável: Arildo Martins -
CRB/8 7180



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas

Folha de aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ana Júlia Flor Neves, realizada em 01/09/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck (UFSCar) Prof.

Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues (UFSCar)

Prof. Dr. Victor Fabricio (UNOESTE)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Este trabalho recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

PROCESSO: 131634/2024-0

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar, agradeço à minha família, por me apoiarem até o fim do mestrado. À minha família, meu profundo agradecimento pelos cuidados, apoio emocional e incentivo inabalável, que me fortaleceram nos momentos mais desafiadores e nos 18 meses em que permaneci sem bolsa permitindo que eu seguisse por esse caminho. Principalmente à minha avó Maria Neide Gallani Flôr cuja qual mesmo sem compreender ao certo o que estudei, me apoiou incondicionalmente, sem seu apoio eu não teria conseguido me estabelecer em São Carlos. Aos meus pais Daniela Gallani Flôr e Eterlei Alex Neves que me incentivaram ao máximo nessa minha trajetória até aqui. E à minha namorada Letícia da Costa Pereira, que me apoiou emocionalmente e desencorajou todas as vezes que pensei em desistir.

Agradeço aos amigos e parceiros de república que me acolheram em sua casa mesmo não me conhecendo tão bem, que em tão pouco tempo tornaram-se pessoas que desejo levar para a vida, não caberia aqui como foi boa experiência que vocês me proporcionaram, foi muito bom ter com quem compartilhar, tagarelar e jogar. E por mais que eu tenha dito que esse não era meu lar, tornou-se.

Agradeço também aos amigos de laboratório: Taciane Pejon, Jean C. Andrade, Rafael Henrique, Guilherme Nascimento, Alinson Cipriano, Leandro Neves e Nathália Dias, que compartilharam desta trajetória, cada um a sua maneira, mas sempre colaborando comigo e entre si, repassando seus saberes, oferecendo apoio, e dos momentos de descontração que foram tão importantes para o equilíbrio durante este processo. Ao Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico (LAFEEEx) de modo geral, e aos técnicos Sr. Sérgio e Sr. Airton.

Ao meu orientador, Wladimir Rafael Beck, direciono meus mais sinceros agradecimentos pela orientação excepcional, pela paciência e dedicação ao longo de toda esta jornada. Sua expertise, incentivo constante e disponibilidade foram indispensáveis para a conclusão desta dissertação. As discussões enriquecedoras e os insights valiosos, não apenas contribuíram para este trabalho, mas também foram essenciais para o meu crescimento como pesquisadora e profissional.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte da minha trajetória, a jornada acadêmica que culmina nesta dissertação não teria sido possível sem o apoio e a colaboração de diversas pessoas, às quais expresso minha mais profunda gratidão.

RESUMO

Extratos fitoterápicos de *Panax ginseng* (*P. ginseng*) e *Angelica keiskei* (*A. keiskei*) demonstram potencial ergogênico, promovendo redução da fadiga com atuação crônica no aumento do conteúdo mitocondrial. A melatonina também se destaca por melhorar a função mitocondrial e o metabolismo energético de modo agudo, ambos interessantes no exercício de *Endurance*. Este estudo analisou o efeito ergogênico do extrato padronizado de *A. Keiskei* e *P. ginseng* (fitoterápico) e melatonina, verificando se a associação dessas drogas melhora o desempenho em comparação com o uso isolado. Os experimentos estão dispostos em duas etapas. O experimento I, investigou os efeitos do extrato fitoterápico de *A. Keiskei* e *P. ginseng* em marcadores teciduais e séricos, sem a influência do exercício. O experimento II avaliou a ergogenicidade do fitoterápico e melatonina, e a associação de ambos. Foram utilizados 60 ratos Wistar, com 45 dias de idade: 1) dois grupos de animais não exercitados: grupo controle (CT) e grupo fitoterápico (FIT); e 2) quatro grupos de animais exercitados: controle exercitado (CTEx), fitoterápico exercitado (FEx), melatonina exercitado (MEx) e fitoterápico + melatonina exercitado (FMEx). No experimento I, realizou-se por 21 dias via gavagem orogastrica a administração do fitoterápico (FIT) ou solução veículo (CT) aos 90 dias de idade, seguido pela eutanásia aos 111 dias de idade. No experimento II, houve a familiarização aquática aos 76 dias de idade e o Teste de Carga Crítica em exercício de natação (TCC) aos 86 dias de idade. Aos 90 dias de idade, iniciou-se a administração de fitoterápico (FEx e FMEx) ou solução veículo (CTEx e MEx). Posteriormente aos 111 dias de idade realizou-se a administração de melatonina (MEx e FMEx) ou solução veículo (CTEx e FEx) via intraperitoneal 30 minutos antes da realização do Teste de Tempo Limite (*t*_{lim}) à 90% da intensidade de carga crítica (*i*CC), seguido de eutanásia para coleta de materiais biológicos (sangue, tecidos musculares esqueléticos e hepático), para as análises sérica, de glicogênio e triglicerídeos intramuscular e hepático. Estabeleceu-se nível de significância estatística de 5%. No experimento I, a administração do fitoterápico não alterou os níveis de glicose e triglicerídeos, mas aumentou o glicogênio no gastrocnêmio branco e reduziu no glúteo máximo e fígado. Nos triglicerídeos, houve diminuição apenas no gastrocnêmio vermelho. No TCC, não houve diferença entre os grupos nos parâmetros: carga vs tempo e *i*CC. No experimento II, A melatonina e fitoterápico isolados aumentaram o tempo de nado no *t*_{lim}. A melatonina aumentou a glicose e diminuiu o glicogênio nos músculos gastrocnêmio branco e sóleo. Enquanto fitoterápico diminuiu os triglicerídeos sérico, no fígado e nos músculos gastrocnêmico branco, vermelho, também reduziu o conteúdo de glicogênio nos músculos gastrocnêmico branco, vermelho e sóleo. A administração da associação resultou em aumento no *t*_{lim} (FMEx > CTEx), elevou a glicose em relação aos grupos CTEx/FEx/MEx e reduziu o conteúdo de glicogênio dos tecidos gastrocnêmio branco e vermelho (FMEx < CTEx). Conclui-se que a administração de melatonina e fitoterápico causaram ergogenia com efeito somatório quando associados, ambos os compostos modularam de forma distinta o consumo dos substratos energéticos.

Palavras-chave: ergogenia; carga crítica; substratos energéticos;

ABSTRACT

Herbal extracts of *Panax ginseng* (*P. ginseng*) and *Angelica keiskei* (*A. keiskei*) demonstrate ergogenic potential, promoting fatigue reduction with a chronic effect on increasing mitochondrial content. Melatonin also stands out for its ability to improve mitochondrial function and energy metabolism acutely, both of which are beneficial in endurance exercise. This study analyzed the ergogenic effect of a standardized herbal extract of *A. keiskei* and *P. ginseng*, as well as melatonin, to determine whether the combination of these substances improves performance compared to their use alone. The experiments were divided into two phases. Experiment I investigated the effects of the herbal extract of *A. keiskei* and *P. ginseng* on tissue and serum markers, without the influence of exercise. Experiment II evaluated the ergogenicity of the herbal extract and melatonin, as well as their combination. Sixty 45-day-old Wistar rats were used: 1) two groups of non-exercised animals: control group (CT) and herbal group (FIT); and 2) four groups of exercised animals: exercised control (CTEx), exercised herbal (FEx), exercised melatonin (MEx), and exercised herbal extract + melatonin (FMEx). In experiment I, the administration of the herbal extract (FIT) or vehicle solution (CT) was performed via orogastric gavage for 21 days at 90 days of age, followed by euthanasia at 111 days of age. In experiment II, aquatic familiarization took place at 76 days of age, and the Critical Load Test in swimming exercise (CLT) at 86 days of age. At 90 days of age, the administration of herbal extract (FEx and FMEx) or vehicle solution (CTEx and MEx) began. At 111 days of age, melatonin (MEx and FMEx) or vehicle solution (CTEx and FEx) was administered intraperitoneally 30 minutes before the Time Limit Test (t_{lim}) at 90% of the critical load intensity (iCC). This was followed by euthanasia for the collection of biological materials (blood, skeletal muscle tissue, and liver) for serum, intramuscular, and hepatic glycogen and triglyceride analyses. The level of statistical significance was set at 5%. In experiment I, the administration of the herbal medicine did not alter glucose and triglyceride levels, but increased glycogen in the white gastrocnemius and reduced it in the gluteus maximus and liver. Triglycerides decreased only in the red gastrocnemius. In the TCC, there was no difference between the groups in the parameters: load vs. time and iCC. In experiment II, melatonin, and herbal medicine alone increased swimming time in the t_{lim} . Melatonin increased glucose and decreased glycogen in the white gastrocnemius and soleus muscles. While the herbal medicine decreased serum triglycerides in the liver, white gastrocnemius, and red gastrocnemius muscles, it also reduced glycogen content in the white gastrocnemius, red gastrocnemius, and soleus muscles. Administration of the combination resulted in an increase in t_{lim} (FMEx > CTEx), increased glucose compared to the CTEx/FEx/MEx groups, and reduced glycogen content in the white and red gastrocnemius tissues (FMEx < CTEx). It is concluded that the administration of melatonin and herbal medicine caused ergogenicity with a cumulative effect when combined, with both compounds modulating the consumption of energy substrates differently.

Keywords: ergogenic; critical load; energy substrates.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Desenho experimental experimento I. CT: grupo controle; FIT: grupo fitoterápico.23
- Figura 3.** Ilustração do protocolo para a análise de glicogênio muscular e hepático de Dubois et al. (1956). **Figuras:** Biorender.com26
- Figura 4.** Ilustração da Técnica para Análise de triglicerídeos intramuscular e hepático descrita por Pejon (2020). **Figuras:** Biorender.com27
- Figura 5.** Desenho experimental experimento II. CTEx: grupo controle exercitado; FEx: grupo fitoterápico exercitado; MEx: grupo melatonina exercitado; FMEx: grupo fitoterápico e melatonina;28
- Quadro 1.** Adaptação ao meio líquido; procedimentos adotados para familiarização progressiva de ratos ao nado carregado. (adaptado e traduzido)29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados obtidos do tempo de exaustão e CTA no teste de carga crítica dos grupos CTE _x , ME _x , FE _x e FME _x	35
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Gráfico ilustrativo do teste de carga crítica do rato 5. iCC: intensidade de carga crítica; CTA: capacidade de trabalho anaeróbia. Nesse exemplo a iCC é correspondente à 5,45% MC e CTA à 684,3 s.g. %MC: percentual da massa corporal; g: gramas; s: segundos.30
- Gráfico 2. A.** Glicose Sérica. **B.** Triglicerídeos Sérico. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão do conteúdo de glicose sérica. CT: grupo controle; FIT: grupo fitoterápico.32
- Gráfico 3.** Glicogênio dos grupos CT e FIT. Valores expressos em média \pm desvio padrão. Glúteo m.: glúteo máximo; Gastroc.: gastrocnêmio; B.: branco; V.: vermelho; mg: miligramas; FIT: grupo fitoterápico; CT: grupo controle. # $p < 0,01$ em relação ao CT.33
- Gráfico 4.** Triglicerídeos musculares e hepático dos grupos CT, FIT. Valores expressos em média \pm desvio padrão. Glúteo m.: glúteo máximo; Gastroc.: gastrocnêmio; B.: branco; V.: vermelho; mg: miligramas; g: gramas; CT: grupo controle; FIT: grupo fitoterápico. * $p < 0,05$ em relação ao CT.34
- Gráfico 5.** Dados obtidos da iCC no teste de carga crítica dos grupos CTE_x, MEx, FEx e FMEx. Valores expressos em média e desvio padrão. s: segundos; iCC: intensidade de carga crítica; g: gramas; CTE_x: grupo controle exercitado; MEx: grupo melatonina exercitado; FEx: grupo fitoterápico exercitado; FMEx: grupo melatonina e fitoterápico exercitado;35
- Gráfico 6.** Teste de Tempo Limite. O gráfico representa a média \pm desvio padrão do tempo de nado dos animais dos grupos. CTE_x: grupo controle exercitado; MEx: grupo melatonina; FEx: grupo fitoterápico exercitado; FMEx: grupo melatonina e fitoterápico exercitado. # $p < 0,01$ em relação ao grupo CTE_x.36
- Gráfico 7. A.** Glicose Sérica. **B.** Triglicerídeos Sérico. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão do conteúdo de glicose sérica. CTE_x: grupo controle exercitado; MEx: grupo melatonina exercitado; FEx: grupo fitoterápico exercitado; FMEx: grupo melatonina e fitoterápico exercitado. * $p < 0,05$ em relação aos grupos CTE_x, MEx e FEx.37
- Gráfico 8.** Glicogênio dos grupos CTE_x, MEx, FEx, FMEx. Valores expressos em média e desvio padrão. Glúteo m.: glúteo máximo; Gastroc.: gastrocnêmio; B.: branco; V.: vermelho; mg: miligramas; CTE_x: grupo controle exercitado; MEx: grupo melatonina exercitado; FEx: grupo fitoterápico exercitado; FMEx: grupo melatonina e fitoterápico exercitado. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.38
- Gráfico 9.** Triglicerídeos musculares e hepático dos grupos CTE_x, MEx, FEx, FMEx. Valores expressos em média e desvio padrão. Glúteo M.: glúteo máximo; Gastroc.: gastrocnêmio; B.: branco; V.: vermelho; mg: miligramas; g: gramas; CTE_x: grupo controle exercitado; MEx: grupo melatonina exercitado; FEx: grupo fitoterápico exercitado; FMEx: grupo melatonina e fitoterápico exercitado.39

LISTA DE ABREVIATURAS E ABREVIACÕES

AMPK: proteína quinase ativada por AMP
ATP: adenosina trifosfato
A. keiskei: *Angelica keiskei*
C: carga
CAT: catalase
cm: centímetros
CT: grupo controle
CTA: capacidade de trabalho anaeróbia
CTEx: grupo controle exercitado
ERR α : receptor alfa relacionado ao estrogênio
EROs: espécies reativas de oxigênio
FAT CD36: transportador de ácido graxo CD36
FIT: grupo fitoterápico
FEx: grupo fitoterápico exercitado
FMEx: grupo melatonina + fitoterápico exercitado
g: gramas
GLUT4: transportador de glicose tipo 4
h: hora
iCC: intensidade de carga crítica
kg: quilograma
LAn: Limiar Anaeróbio
ME: tecidos musculares esqueléticos
MEx: grupo melatonina exercitado
MFEL: máxima fase estável de lactato
mg: miligrama
ml: mililitros
mm: milímetro
min: minuto
mtDNA: DNA mitocondrial
MT1: receptor de melatonina tipo 1
MT2: receptor de melatonina tipo 2
MT3: receptor de melatonina tipo 3

NaCl: cloreto de sódio

nm: nanômetros

NRF: fatores respiratórios nucleares

O₂: oxigênio

P. ginseng: *Panax ginseng*

PGC-1 α : Coativador-receptor ativado por proliferador de peroxissoma

PPARs: receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

RPM: rotações por minuto

ROR/RZR: receptores órfãos relacionados ao ácido retinóico

R²: coeficiente de determinação

s: segundos

SOD: superóxido dismutase

T: tempo

TCC: teste de carga crítica

t_{lim} : teste de tempo limite

t_{fam} : fator A de transcrição mitocondrial

UCP-2: proteína de desacoplamento mitocondrial 2

μ l: microlitros

°C: graus celsius

%MC: percentual da massa corporal

LISTA DE SIGLAS

AVMA: American Veterinary Medical Association

CCBS: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DCF: Departamento de Ciências Fisiológicas

LAFEEEx: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico

PIPGCF: Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

UFSCar: Universidade Federal de São Carlos

UNICAMP:

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 HIPÓTESE	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 ANIMAIS	22
4.2 EXPERIMENTO I	22
4.2.1 Desenho Experimental	22
4.2.2 Aplicação do Extrato Padronizado de <i>Angelica keiskei</i> e <i>Panax ginseng</i>	23
4.2.3 Eutanásia e coleta de materiais biológicos	24
4.2.3.1 Eutanásia	24
4.2.3.2 Análise sérica	24
4.2.3.3 Glicogênio	24
4.2.3.4 Triglicerídeo	26
4.2.4 Análise Estatística	27
4.3 EXPERIMENTO II	27
4.3.1 Desenho Experimental	27
4.3.2 Adaptação ao Meio Líquido	29
4.3.3 Teste de Carga Crítica (TCC)	29
4.3.4 Aplicação do Extrato Padronizado de <i>Angelica keiskei</i> e <i>Panax ginseng</i>	30
4.3.5 Administração de Melatonina	31
4.3.6 Teste de Tempo Limite (flim)	31
4.3.7 Eutanásia e coleta de materiais biológicos	31
4.3.8 Análise Estatística	32
5 RESULTADOS	32
5.1 EXPERIMENTO I	32
5.1.1 Conteúdo Sérico de Glicose e Triglicerídeos	32
5.1.2 Glicogênio Muscular Esquelético e Hepático	32
5.1.3 Triglicerídeos Muscular Esquelético e Hepático	33
5.2 EXPERIMENTO II	34
5.2.1 Teste de Carga Crítica	34
5.2.2 Efeito das Drogas Sobre o Teste de Tempo Limite	35
5.2.3 Concentrações Séricas de Glicose e Triglicerídeos	36
5.2.4 Glicogênio Muscular Esquelético e Hepático	37
5.2.5 Triglicerídeos Muscular Esquelético e Hepático	38
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	44
8 CONFLITO DE INTERESSES	44
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO I	51
ANEXO II	52

1 INTRODUÇÃO

Na fisiologia do exercício os recursos ergogênicos são definidos como uma técnica ou substância usada com o intuito para promover melhoria do desempenho e da performance nos mais diferentes tipos de exercícios, sendo estes recursos classificados como psicológicos, nutricionais, farmacológicos ou fisiológicos (THEIN et al., 1995). Alguns ergogênicos promovem uma melhor captação dos substratos energéticos como glicose, glicogênio e triglicerídeos, enquanto outros dispõem de maiores estoques destes substratos, conseqüentemente levando a um aumento na tolerância ao esforço em exercícios extenuantes (LIMA-SILVA et al., 2007).

Durante o exercício físico, a mitocôndria apresenta notória importância na produção de energia, devido ao seu papel fundamental na produção de adenosina trifosfato (ATP). Tal organela realiza o processo de biogênese mitocondrial caracterizado pelo aumento na funcionalidade e quantidade de mitocôndrias, sendo este provocado por inúmeros fatores, dois deles: o exercício físico e o uso de recursos ergogênicos (BHATTI et al, 2017; JORNAYVAZ e SHULMAN, 2010).

Segundo Jornayvaz e Shulman (2010) as proteínas que se encontram nas mitocôndrias são resultantes da codificação tanto do genoma nuclear quanto do genoma mitocondrial, sendo o DNA mitocondrial (mtDNA) uma molécula responsável pela codificação das subunidades dos complexos da cadeia respiratória de elétrons I, III, IV e V. De acordo com Rius-Pérez (2020) os genes mitocondriais e nucleares envolvidos na biogênese mitocondrial são mediados principalmente pela ativação do Coativador-receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α) regulador chave da biogênese mitocondrial, fosforilação oxidativa e defesa antioxidante, que mantém a homeostase metabólica. Esta proteína leva à ativação de múltiplos fatores de transcrição, incluindo a fatores respiratórios nucleares (NRF-1 e 2), receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), fator A de transcrição mitocondrial (*tfam*) e receptor alfa relacionado ao estrogênio (ERR α), para elevar a transcrição de genes relacionados à biogênese mitocondrial e respectivas funções (VENTURA-CLAPIER et al., 2008; PEREIRA, 2015; RIUS-PÉREZ 2020). Por sua vez, os NRF-1 e NRF-2 levam ao aumento da transcrição de enzimas mitocondriais essenciais, que parecem interagir com *tfam*, que desencadeia a transcrição e replicação do mtDNA (RIUS-PÉREZ et

al., 2020; PEREIRA, 2015). Por fim, a PGC-1 α induz respiração e biogênese mitocondrial no tecido muscular por uma indução de proteína de desacoplamento mitocondrial 2 (UCP-2) e indução da expressão dos genes NRF-1 e NRF-2 (RIUS-PÉREZ et al., 2020; VENTURA-CLAPIER et al., 2008; JORNAYVAZ e SHULMAN, 2010; KANG e JI, 2012). Em suma, o aumento destes fatores de transcrição ocasiona o surgimento de novas organelas mitocondriais funcionais, que por sua vez possuem maior capacidade de fosforilação oxidativa, refletindo em maior aporte bioenergético, papel fundamental para o exercício, uma vez que a manutenção do mesmo por longos períodos demandam muita ressíntese de adenosina trifosfato (RIUS-PÉREZ et al., 2020; PEREIRA, 2015). Assim, o processo de biogênese auxilia no aumento de mitocôndrias funcionais e conseqüentemente no aumento da produção de energia, logo na melhora da capacidade de utilização de oxigênio e eficiência do exercício (PEREIRA, 2015).

Não bastante, com a elevada demanda metabólica provocada pelo exercício, principalmente aqueles de longa duração e intensidade próxima ao limite superior do domínio pesado (GAESSER e POOLE, 1996) o uso de recursos ergogênicos tem se tornado prática recorrente. Diante disso, alguns compostos fitoterápicos têm se mostrado promissores dentro do fenômeno fisiológico que se apresenta (ergogenia) podendo atuar nas mitocôndrias. Dentre estes o *Panax ginseng* (*P. ginseng*) e *Angelica keiskei* (*A. keiskei*) tem denotado tamanha atenção científica. O *P. ginseng* é usado como tônico há milênios na Medicina Tradicional asiática (HYUN et al., 2022), os ginsenosídeos são os principais compostos ativos. A maior parte dos estudos voltados para as propriedades farmacológicas e terapêuticas dessa planta se concentrou nos ginsenosídeos, como Rb1, Rg1, Rg3, Re e Rd (KIM et al., 2017). Atualmente há vários suplementos de *P. ginseng* no mercado, conhecidos por aumentar os níveis de energia (por meio do aumento de PGC-1 α , NRF-1, AMPK e Citocromo-C levando a um aumento na oxidação de ácidos graxos), aliviar o estresse, melhorar o desempenho atlético e as funções do sistema imunológico, controlar os níveis de açúcar no sangue (por meio da maior translocação de GLUT-4 para a membrana), melhorar as funções mentais e promover o bem-estar geral (BACH et al., 2016; LEE et al., 2015). Bach et al. (2016) encontrou resultados significativos que corroboram com a hipótese de que esta planta atua na redução da fadiga, porém no que se refere ao aumento da

performance física, este estudo não achou evidências suficientes para comprovar o efeito.

Por sua vez, a *Angelica keiskei* (ashitaba) é uma planta nativa do Japão (KIL et al., 2017), composta principalmente por chalconas (cetonas α , β -insaturadas), têm diversos derivados como intermediários na biossíntese de flavonoides bioativos. Ainda que os componentes ativos da *Angelica keiskei* não sejam exatamente conhecidos, estudos fitoquímicos resultaram na identificação de mais de 100 substâncias, como chalconas, cumarinas e flavononas (KIL et al., 2017). Estes compostos possuem grande capacidade antioxidante que auxiliam minimizando o estresse oxidativo e atenuando os danos ocasionados por radicais livres nas células e tecidos (SISWANTO et al., 2024). A expressão de enzimas antioxidantes diminuiu o nível de colesterol no fígado e potencializou a absorção de luteolina (KIM et al., 2012). Observou-se um aumento na expressão de genes associados à β oxidação de ácidos graxos, bem como a uma elevação na fosforilação da AMPK em tecidos adiposo e hepático, o que resulta em uma menor acumulação de gordura e colesterol no plasma (ZHANG, 2015; KIL et al., 2017). Esta planta, também é conhecida pela sua função no metabolismo glicêmico e lipídico, através de uma maior translocação de GLUT-4 na membrana de células do músculo esquelético (KAWABATA et al., 2011).

Considerando os efeitos destes dois fitoterápicos, Kim et al., (2017) buscou associar ambos os compostos (proporção de 1:1), e observou que houve melhora no desempenho dos animais que receberam a associação comparados a administração isolada de cada composto (*P. ginseng* e *A. keiskei*). Neste mesmo estudo (KIM et al., 2017), observou que a associação promoveu maior atividade enzimática de Catalase e da Glutathione peroxidase, bem como maiores quantidades de PGC-1 α , NRF-1 e AMPK, intimamente relacionados à função mitocondrial. Esse fenômeno promove a biogênese mitocondrial, essencial para a geração de energia, a qual favorece a gasto calórico e reduz o acúmulo de gordura, podendo assim amenizar processos inflamatórios devido à sua ação antioxidante (KIM et al., 2017). Ainda há poucos estudos na literatura sobre esta associação fitoterápica no contexto ergogênico, visto que estes achados suscitam a ação sinérgica destes compostos, ocasionando efeitos diversos. Assim, considera-se relevante o estudo dos efeitos dessa droga sobre os parâmetros fisiológicos.

Neste viés, quando o assunto é ergogenia, estudos recentes constataram que dentre os inúmeros recursos ergogênicos, a melatonina (N-acetyl-5-methoxytryptamine) – molécula indol anfifílico (AMARAL et al., 2019), apresenta efeito ergogênico em modelo animal (BECK et al., 2015A, 2016). Sintetizada principalmente na glândula pineal a partir do aminoácido triptofano, esta molécula exerce sua função primária na regulação do ritmo circadiano (temperatura corporal e ciclo sono-vigília) (REITER et al., 2010; ROSS et al., 2013). Este hormônio também é capaz de exercer outras funções além da regulação do ciclo sono-vigília como efeitos antioxidantes (REITER et al., 2016; GALANO et al., 2018; TAN et al., 2002; CHITIMUS et al., 2020; KRUK et al., 2021), anti-inflamatórios (MAURIZ et al., 2013) e alterações no metabolismo energético (FARIA et al., 2022; MANCHESTER et al., 2015), utilizada também no tratamento de diabetes, obesidade e doenças neurológicas. Diante de todo o exposto, seu efeito ergogênico vem sendo atribuído aos seus efeitos antioxidantes (TAN et al., 2002; BERZOZA et al., 2024), sua capacidade de causar alterações no metabolismo energético (FARIA et al., 2022), aumentar a atividade dos complexos I e IV da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2001; MARTÍN et al., 2000; REITER et al., 2017), e também da capacidade de promover a neutralização do estresse oxidativo induzido pelo exercício (BERZOZA et al., 2024).

Do ponto de vista fisiológico, a atuação desse hormônio se dá por meio da ativação de dois receptores transmembrana, denominados MT1 e MT2, situados nos músculos, presentes no sarcolema, citosol (quinona redutase 2 ou MT3 e núcleo (ROR/RZR) (MA et al., 2021; HA et al., 2006; NOSJEAN et al., 2001; KOJETIN et al., 2014) e em diversos órgãos periféricos. Esses receptores estão acoplados a proteínas G α i/o; dessa forma, a inibição da adenilato ciclase e a diminuição dos níveis intracelulares do segundo mensageiro AMPc figuram entre as vias de sinalização frequentemente associadas a melatonina (REITER et al., 2021) e à regulação dos canais iônicos (TAROCCO et al., 2020). A melatonina melhora a função mitocondrial aumentando a eficiência da cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, da produção de ATP (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2011; MANCHESTER et al., 2015). Do mesmo modo, a melatonina ocasiona a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), reduzindo o estresse oxidativo e os danos mitocondriais (TAN et al. 2016). Ademais, essa molécula estimula a biogênese mitocondrial em tecidos metabolicamente ativos,

como músculos e cérebro (REITER et al., 2021; MA et al., 2021). Suas funções no metabolismo energético se dão através do metabolismo de glicose (aumentando a sensibilidade a insulina) com o aprimoramento da captação nos tecidos periféricos como hepático e muscular (MAZEPA et al., 1999), aumentando transportadores de glicose como GLUT4 (FARIA et al., 2021), no metabolismo lipídico ocorre lipólise no tecido adiposo que acarretam a liberação de ácidos graxos para serem utilizados como fonte de energia, ademais ao intensificar a atuação das enzimas que possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias no fígado acarreta a redução dos níveis de triglicerídeos (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2005).

Ambas as drogas se mostram relevantes para o metabolismo oxidativo, muito utilizado em exercícios de longa duração (*endurance*). Visto isso, há a necessidade de utilizar métodos para avaliar a performance neste tipo de exercício como o Teste de Tempo Limite (*tlim*) (DE ARAUJO et al., 2010). Entretanto para a realização deste teste se faz necessário outro método de avaliação para determinação de intensidade do exercício individualmente, tais como os testes de Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL) – protocolo padrão ouro que estima o Limiar Anaeróbio (LAn); Teste Incremental – estima o limiar metabólico através do sangue; Teste de Carga Crítica (TCC) – estima a intensidade de carga crítica e a capacidade de trabalho anaeróbio através da relação carga vs tempo (MANCHADO et al., 2005; GOBATTO et al., 2001); Dentre estes, o TCC, modelo de avaliação adaptado por Gobatto et al., (2013) a partir da avaliação de Potência Crítica elaborado por Monod e Scherrer (1965). Este teste permite determinar a intensidade do esforço individualmente conforme a massa corporal do animal (GOBATTO et al., 2013). Assim, também é possível definir as intensidades correspondentes aos domínios de intensidade (GAESSER e POOLE, 1996; PEJON, 2020). Geralmente o TCC superestima o segundo limiar metabólico (MFEL ou LAn) (CASTOLDI et al., 2020). Além dos testes para a determinação de intensidades de esforço correspondentes a limiares metabólicos ou domínios de intensidade, o teste de *tlim* também se caracteriza por ser um teste não invasivo, onde o animal realiza um esforço constante que pode ser mantido em exercício realizado à 90% da iCC até a exaustão, assim a capacidade de desempenho é medida pelo tempo do nado realizado (FARIA, 2021; FERNANDES e VILAS-BOAS, 2012).

Apesar de a literatura apresentar algumas informações específicas sobre

cada componente e seus eventuais efeitos ergogênicos, a associação de ambas as drogas também parece ser relevante, visto seus efeitos fisiológicos. Enquanto o fitoterápico parece atuar de forma crônica (aumentando conteúdo mitocondrial) (KIM et al., 2017), a melatonina parece otimizar o funcionamento das estruturas mitocondriais existentes (MARTÍN et al., 2000) de forma mais aguda (FARIA, 2021). Assim, há necessidade de estudos que comparem os efeitos de cada componente e os associe, sob a finalidade de verificar se tal somação causaria efeito potencializador sobre a performance física. Quando conduzida sob prescrição individual de esforço em intensidade próxima do limite superior do domínio pesado (GAESSER e POOLE, 1996).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da administração do extrato padronizado de *A. Keiskei* + *P. Ginseng* e de melatonina, associados ou isolados, sobre a performance física e parâmetros do metabolismo energético a nível sérico e tecidual.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os efeitos ergogênicos da melatonina e do extrato de *A. Keiskei* + *P. Ginseng* no exercício exaustivo realizado no limite superior do domínio intenso à 90% da iCC;
- Verificar os efeitos da melatonina e do extrato de *A. Keiskei* + *P. Ginseng* sobre o glicogênio e triglicerídeos dos músculos esqueléticos glúteo máximo, gastrocnêmio (branco e vermelho) e sóleo, além de tecido hepático;
- Analisar os efeitos da associação da melatonina e do extrato de *A. Keiskei* + *P. Ginseng* sobre o conteúdo de glicose e triglicerídeos sérico; de glicogênio muscular e hepático, triglicerídeos intramuscular e hepático;
- Determinar os efeitos do extrato de *A. Keiskei* + *P. Ginseng* sobre o conteúdo de triglicerídeos e glicogênio dos músculos esqueléticos: glúteo máximo, gastrocnêmio (branco e vermelho) e sóleo; e sobre o tecido hepático;
- Analisar os efeitos do extrato de *A. Keiskei* + *P. Ginseng* sobre o conteúdo de glicose e triglicerídeos sérico.

3 HIPÓTESE

A administração isolada de melatonina e extrato de *A. Keiskei* + *P. Ginseng* promoverá maiores tempos de nado nos animais em relação aos animais que receberão solução veículo.

A administração associada de melatonina e extrato de *A. Keiskei* + *P. Ginseng*, promoverá tempos de nado superiores as demais administrações.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A presente dissertação apresenta os experimentos em duas etapas. A primeira etapa refere-se ao experimento I, que investigou os efeitos do extrato de *A. Keiskei* + *P. Ginseng* em marcadores teciduais e séricos, sem a influência do exercício. Já o experimento II foi empregado para verificação da ergogenia do extrato de *A. Keiskei* + *P. Ginseng* e melatonina, e a associação das duas drogas.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 60 ratos albinos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 45 dias de idade, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), que ficaram alojados no biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico (LAFEEEx), localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da UFSCar. Os ratos ficaram dispostos em gaiolas, (comprimento 40 cm, largura 40 cm e altura 20 cm) contendo no máximo 5 animais/gaiola mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo de luz 12/12h, (luzes acesas das 3:00 às 15:00 horas), com água e ração “*ad libitum*”. O experimento teve início após a aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo N° 3976140623.

4.2 EXPERIMENTO I

4.2.1 Desenho Experimental

20 animais foram divididos em dois grupos: 10 animais para o grupo controle (CT) e 10 no grupo fitoterápico (FIT). Aos 45 dias de idade os animais chegaram ao biotério, previamente preparado para o acolhimento visando atender as condições ambientais. Aos 90 dias de idade o grupo FIT recebeu a administração

de solução do extrato padronizado de *A. Keiskei* + *P. ginseng* e o grupo CT recebeu solução veículo, por 21 dias. Ao final, houve eutanásia e coleta dos materiais biológicos dos animais aos 111 dias de idade (figura 1).



Figura 1. Desenho experimental experimento I. CT: grupo controle; FIT: grupo fitoterápico.
Fonte: Próprio autor

4.2.2 Aplicação do Extrato Padronizado de *Angelica keiskei* e *Panax ginseng*

O extrato padronizado de *Angelica keiskei* (*A. keiskei*) e *Panax ginseng* (*P. ginseng*) (nome comercial Mitocondrin[®], que possui tripla padronização em 8% de chalconas, 10% de flavanonas e 0,9% de ginsenosídeos Rb1, Rg1, Rg3) são compostos fitoterápicos que foram disponibilizados pela empresa Florien Fitoativos[®].

Para a preparação da solução os compostos foram solubilizados em solução salina e armazenados em frasco âmbar ou frasco envolto por papel alumínio, previamente a aplicação via gavagem orogastrica. Os animais do grupo FIT foram tratados com 15 mg/Kg de *A. keiskei* + 15 mg/Kg de *P. ginseng* e os animais do grupo CT houve a administração de solução veículo de mesmo volume (NaCl 0,9%), por 21 dias consecutivos, sempre no início do período de vigília. Houve a mensuração da massa corporal dos animais semanalmente para adequação da dose.

4.2.3 Eutanásia e coleta de materiais biológicos

4.2.3.1 Eutanásia

A eutanásia foi realizada por meio da técnica de decapitação, método este que pode ser usado de acordo com a American Veterinary Medical Association (AVMA – Guidelines for the Euthanasia of Animals) para as características dessa pesquisa.

Foram coletados os tecidos musculares esqueléticos (ME) (sóleo, gastrocnêmios e glúteo máximo direito e esquerdo) e fígado – extraídos e armazenados em tubos de plástico de 1,5 ml para análise de triacilglicerol e armazenados em tubos de ensaio contendo 1 ml de hidróxido de potássio (KOH 30%) no freezer a -20°C para análise do glicogênio; sangue – alíquota de aproximadamente 5,0 ml de sangue, inicialmente armazenada em tubos plásticos, para posterior análise sérica de glicose e triacilglicerol.

4.2.3.2 Análise sérica

Para análise sérica de glicose e triglicérides, foi coletada alíquota de aproximadamente 5 ml de sangue após a eutanásia. Essa alíquota permaneceu em repouso por cerca de 15 minutos sobre o gelo e foi centrifugada por 15 minutos a 3.000 RPM com temperatura de aproximadamente 10°C, foi alíquotado 400 µl de soro em tubos plásticos de 2 ml e armazenado a -20°C. Tais alíquotas foram utilizadas para a determinação das concentrações séricas de glicose e triglicérides, utilizando kit comercial (empresa LaborLab), seguindo as instruções do fabricante. Para a leitura em espectrofotômetro (SpectraMax i3, Molecular Devices; San José, CA, USA), foram utilizadas as amostras após o ciclo de descongelamento, estas também foram levadas ao agitador de tubos e em seguida foi pipetado 3 µl da amostra em microplacas de quartzo 96 poços e 300 µl de reagente do Kit comercial (empresa LaborLab), manteve-se em temperatura ambiente por 25 minutos e em seguida foram submetidas à leitura em espectrofotômetro a 505nm. Foram utilizadas apenas amostras em ciclo anterior de descongelamento sem evidências de hemólise.

4.2.3.3 Glicogênio

Após a eutanásia houve a coleta de 200 a 250 mg do tecido muscular

esquelético (glúteo máximo, gastrocnêmio vermelho e branco) e 500 mg do fígado, que foram imediatamente armazenados no freezer (-20°C) com hidróxido de potássio (KOH; 30%).

Para determinação do conteúdo de glicogênio seguiu-se o protocolo de Dubois et al. (1956) (ver figura 2). Seguidamente a retirada dos tubos de ensaio com as amostras do freezer (-20°C), estes foram alocados em estantes de aço inox e colocados em banho-maria a uma temperatura de 85°C por 4 minutos para concluir a digestão do tecido. Em seguida, as amostras receberam a adição de 0,1 ml solução saturada de sulfato de sódio (Na₂SO₄) em banho-maria por 2 minutos, em seguida levadas ao agitador (vórtex) antes de retornarem ao banho-maria por mais 1 minuto adicionado 3 ml de álcool bidestilado 70%, com a finalidade de ocasionar a precipitação do glicogênio e em seguida levadas a centrifuga por 5 minutos à 2000 RPM. Imediatamente após, realizou-se o descarte do sobrenadante, havendo a repetição dos mesmos passos citados acima, acrescentando 1 ml de água destilada quente e na sequência retornando ao agitador. Posteriormente foram adicionados 3 ml de álcool bidestilado 70% e levado novamente ao banho-maria e à centrifuga. Depois do último descarte do sobrenadante há a adição de 5 ml de água destilada quente e as amostras foram levadas ao agitador de tubos, esta solução final é o produto utilizado na técnica de colorimetria para leitura do glicogênio.

A leitura da absorbância é feita a partir da colorimetria da amostra. Após a obtenção do produto final é pipetado 200 µl de amostra para ME ou 10 µl de amostra para fígado, 800 µl de água destilada em seguida as amostras são cuidadosamente submetidas ao método fenol (C₆H₆O) / sulfúrico (H₂SO₄) sendo 10 µl de fenol e 2 ml de ácido sulfúrico, antes de serem analisadas as amostras foram levadas ao agitador de tubos, em seguida ao banho-maria e novamente ao agitador. Cada amostra foi analisada em cubeta de quartzo por espectrofotômetro (marca Hach) (Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico) com comprimento de onda de 490 nm contracurva padrão de glicose. A técnica foi padronizada no Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte (Faculdade de Ciências Aplicadas – UNICAMP, Limeira/SP) e o protocolo encontra-se detalhado no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico (UFSCar, São Carlos/SP).

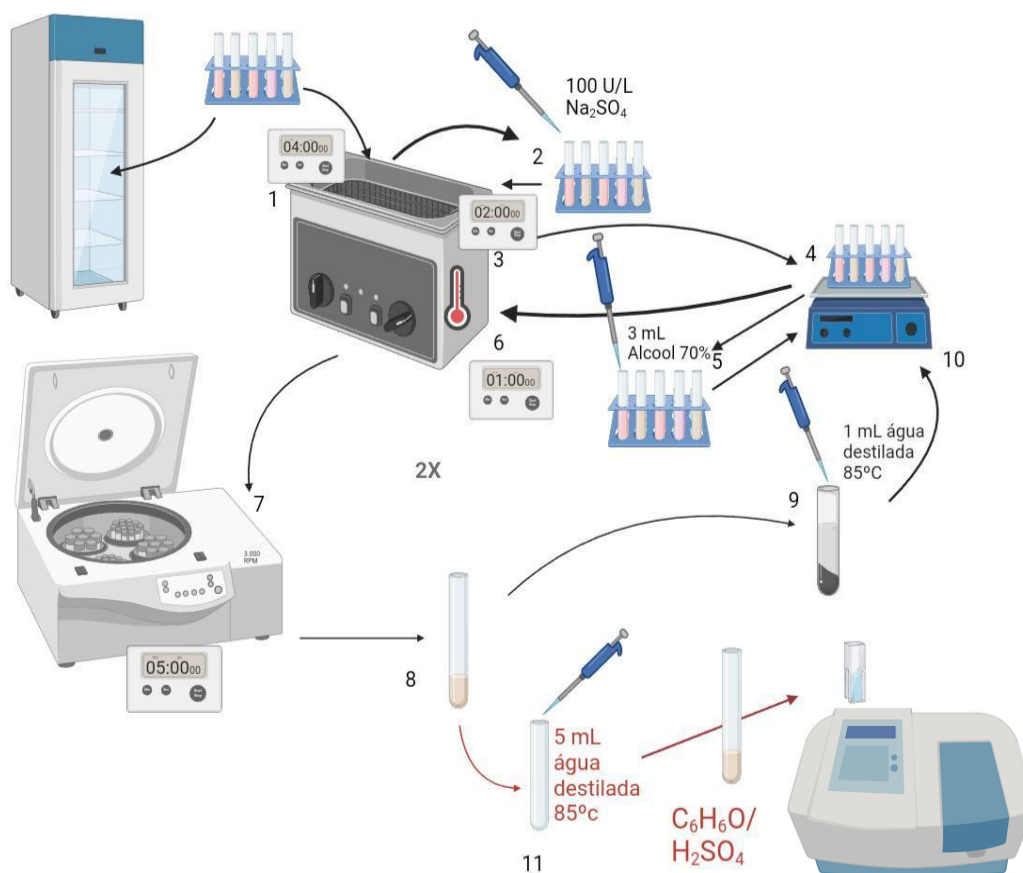


Figura 2. Ilustração do protocolo para a análise de glicogênio muscular e hepático de Dubois et al. (1956). **Figuras:** Biorender.com

4.2.3.4 Triglicerídeo

Foi seguido o protocolo descrito por Pejon (2020). Primeiramente, foram misturadas na mesma proporção, as porções aproximadas de 100 – 200 mg do fígado e tecido muscular esquelético (glúteo máximo, gastrocnêmico vermelho e branco), Triton X-100 (1%) com uma relação de 200 mg de tecido para 1ml de Triton. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por barras magnéticas (5 x 3 mm) pelo tempo de 10 horas ininterruptas, com temperatura média de 2 – 8°C, a seguir as amostras foram centrifugadas por um período de 10 minutos a 4.000 rpm. No momento seguinte, foram extraídos 10 µl do sobrenadante e pipetados em microplaca de 96 poços misturados com 200 µl do kit de reagentes (LaborLab) e mantidos em temperatura ambiente por 20 minutos. Absorbância da amostra foi determinada em espectrofotômetro (SpectraMax i3, Molecular Devices; Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa, UFSCar, São Carlos/SP) a 505 nm, seguindo as especificações desse protocolo e do kit comercial (figura 3).

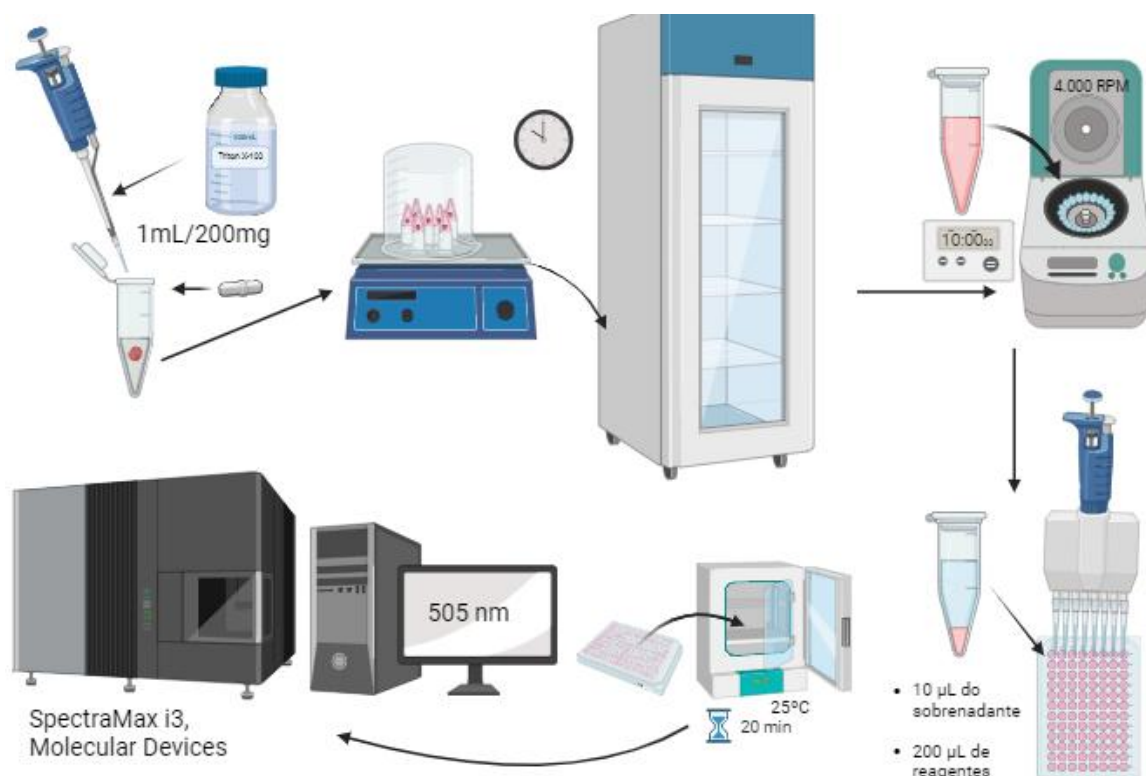


Figura 3. Ilustração da Técnica para Análise de triglicerídeos intramuscular e hepático descrita por Pejon (2020). **Figuras:** Biorender.com

4.2.4 Análise Estatística

Os dados foram apresentados em média \pm desvio padrão, foi realizado teste T de student para variáveis independentes para a análise de variância dos dados de via única (fitoterápico), por meio do software Statística 7.0. Todos os testes foram conduzidos sob nível de significância de $p < 0,05$.

4.3 EXPERIMENTO II

4.3.1 Desenho Experimental

Foram utilizados 40 ratos, estes foram divididos em 4 grupos: 10 animais para o grupo controle exercitado (CTEx), 10 para o grupo fitoterápico exercitado (FEx), 10 para o grupo melatonina exercitado (MEx) e 10 para o grupo fitoterápico de *A. Keiskei* e *P. Ginseng* + melatonina exercitado (FMEx). Aos 45 dias de idade os animais chegaram ao biotério, previamente preparado para o acolhimento visando atender as condições ambientais. Aos 76 dias de idade todos os animais iniciaram a adaptação ao meio líquido. A partir dos 86 dias de idade os ratos dos

grupos CTE_x, FE_x, ME_x e FME_x foram submetidos ao teste de carga crítica (TCC). Aos 90 dias de idade os grupos, FE_x e FME_x receberam a solução fitoterápica de *A. Keiskei* e *P. Ginseng* e os grupos CTE_x e ME_x receberam solução veículo, por 21 dias. Aos 111 dias de idade os ratos dos grupos ME_x e FME_x receberam a solução de melatonina e os grupos CTE_x e FE_x receberam solução veículo, todos 30 minutos antes da execução do teste de tempo limite (*t*_{lim}), imediatamente após a exaustão dos animais houve a eutanásia e coleta dos materiais biológicos (figura 4).

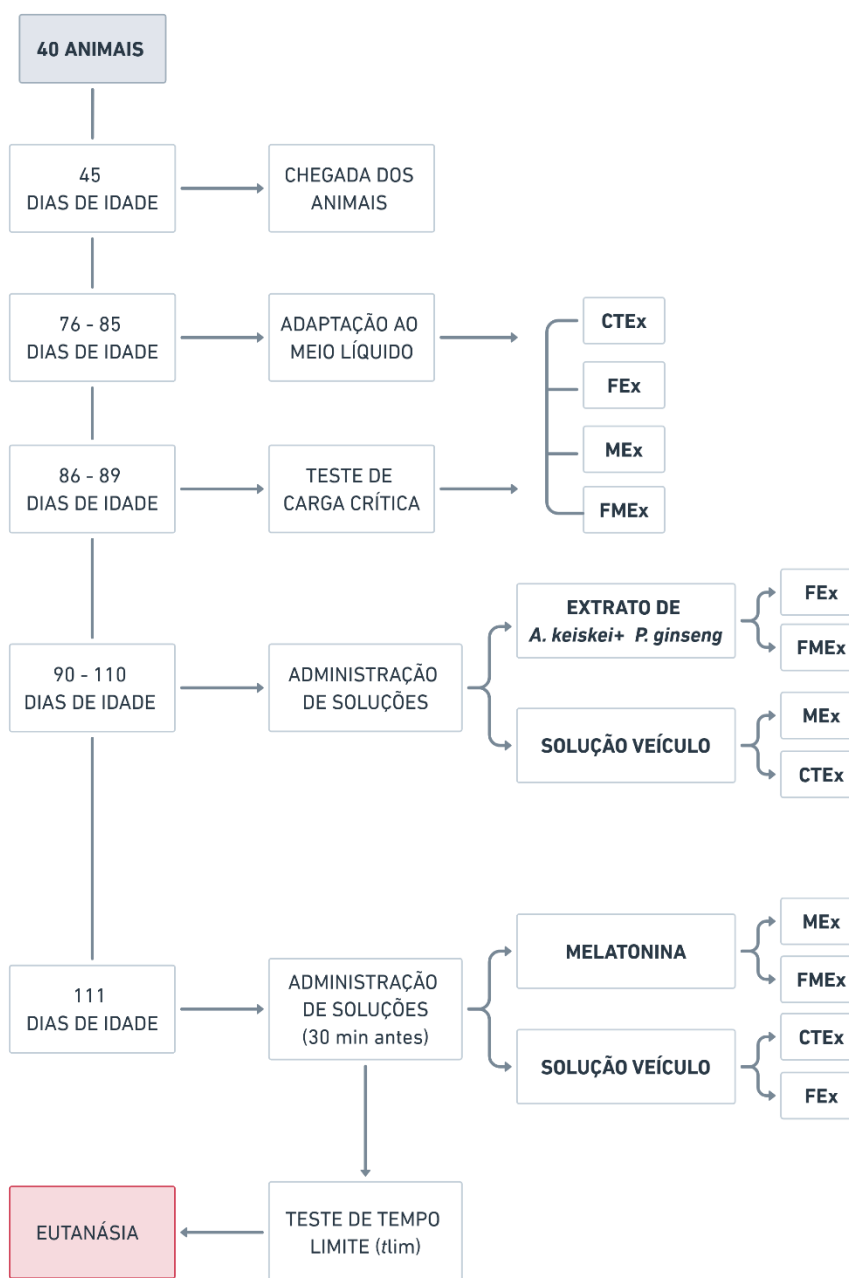


Figura 4. Desenho experimental experimento II. CTE_x: grupo controle exercitado; FE_x: grupo fitoterápico exercitado; ME_x: grupo melatonina exercitado; FME_x: grupo fitoterápico e melatonina;
Fonte: Próprio autor

4.3.2 Adaptação ao Meio Líquido

A adaptação ao meio líquido ocorreu a partir dos 76 dias de idade para os animais dos grupos CTE_x, ME_x, FE_x e FME_x, foi seguido o protocolo de adaptação progressiva ao meio líquido descrito por Gobatto e colaboradores (2013), ver quadro 1. Os ratos foram submetidos a adaptação ao meio líquido após o início do ciclo escuro dos animais. Utilizou-se 14 dias de adaptação com exposição progressiva de tempo (5 a 10 minutos), profundidade da água (10 a 80 cm) e de carga (0, 3, 5, 9, 11, 13 ou 15% da massa corporal -%MC), como detalhado no quadro 1. A carga é colocada em elástico que é envolto abaixo da cintura escapular do rato. Todos os procedimentos foram conduzidos com natação individual, em tanques com 100cm de altura (80cm de profundidade de água), 30cm de diâmetro e água a 31±1°C.

Dia	Condição	Exposição¹
1	Água rasa (10 cm)	5 min - sem carga
2	Água rasa (20 cm)	10 min - sem carga
3	Água profunda (80cm)	5 min - sem carga
4	Água profunda (80cm)	10 min - com elástico e sem carga
5	Água profunda (80cm)	5 min - com 3% MC
6	Água profunda (80cm)	3 min - com 5% MC + 5 min sem carga
7	Água profunda (80cm)	2 min - com 9% MC + 5 min sem carga
8	Água profunda (80cm)	1 min - com 11% MC + 5 min sem carga
9	Água profunda (80cm)	1 min - com 13% MC + 5 min sem carga
10	Água profunda (80cm)	30 s - com 15% MC + 5 min sem carga
1 MC = Massa Corporal		

Quadro 1. Adaptação ao meio líquido; procedimentos adotados para familiarização progressiva de ratos ao nado carregado. Min: minutos; s: segundos; %MC: porcentagem da massa corporal (adaptado e traduzido)

Fonte: Gobatto et al., 2013.

4.3.3 Teste de Carga Crítica (TCC)

O teste de carga crítica (TCC) sucedeu o período de adaptação ao meio

líquido, e foi realizado durante a fase de vigília aos 86 dias de idade. O TCC consistiu em 4 esforços máximos com intensidades correspondentes a 7, 9, 11 e 13% da massa corporal (%MC) do rato e tempo de exaustão em torno de 60 – 600 segundos, que foram realizadas em quatro dias consecutivos em ordem aleatória (gráfico 1). Fundamentado a partir do terceiro modelo de regressão linear utilizado por Gobatto et al. (2013) para estimativa individual de carga crítica, os dados foram plotados no Excel® (Microsoft, Califórnia, United of States) e submetidos a análise por regressão linear após cada TCC, de modo que os coeficientes lineares e angulares correspondem à capacidade de trabalho anaeróbia (CTA) e à intensidade de carga crítica (iCC) expressa em percentual da massa corporal (%MC). No gráfico o eixo Y representa os valores de tempo multiplicado pela carga (T · C) e o eixo X os valores de tempo. Assim, obtém-se a equação $Y = A \cdot x + B$ demonstrada no Gráfico 1 (Gobatto et al., 2013). Para que o teste seja considerado válido, optou-se por aceitar o coeficiente de determinação (R^2) superior à 0,95.

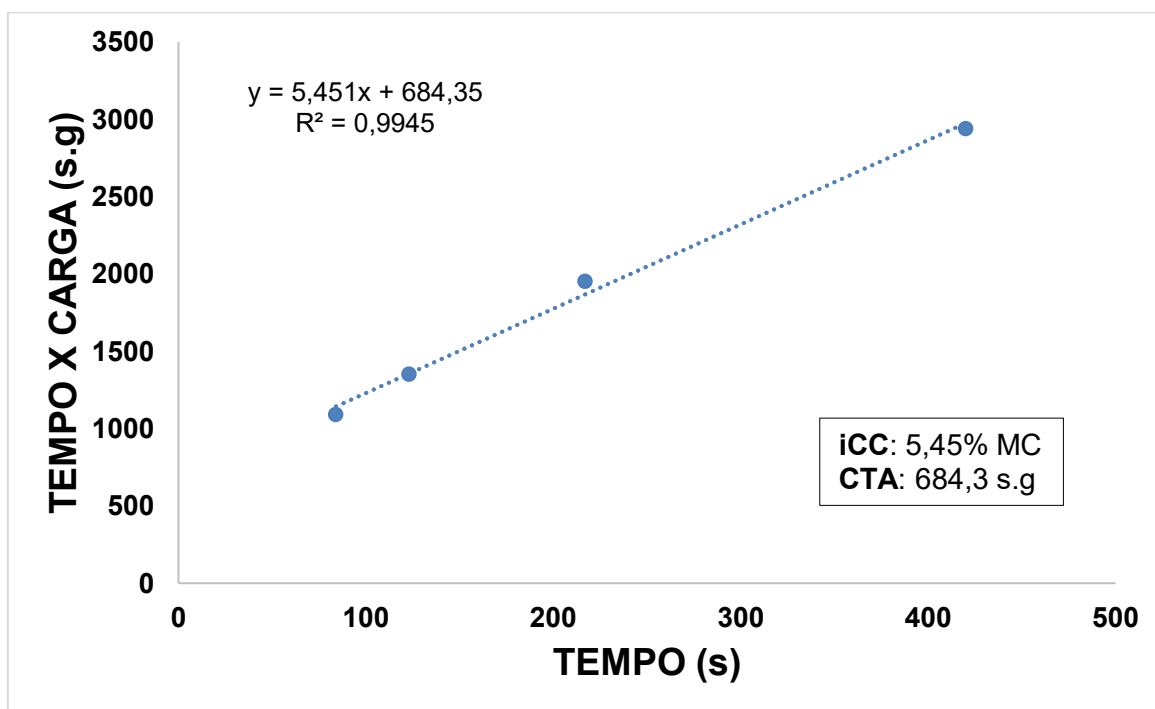


Gráfico 1. Gráfico ilustrativo do teste de carga crítica do rato 5. iCC: intensidade de carga crítica; CTA: capacidade de trabalho anaeróbia. Nesse exemplo a iCC é correspondente à 5,45% MC e CTA à 684,3 s.g. %MC: percentual da massa corporal; g: gramas; s: segundos.

Fonte: Próprio autor

4.3.4 Aplicação do Extrato Padronizado de *Angelica keiskei* e *Panax ginseng*

A administração do fitoterápico seguiu o protocolo descrito no item 3.2.2.

Houve a administração via orogastrica de solução com extrato de *A. keiskei* (15 mg/Kg) + de *P. ginseng* (15 mg/Kg) para os animais dos grupos FEx e FMEx e administração de solução veículo de mesmo volume (NaCl 0,9%) para os animais dos grupos MEx e CTEEx, por 21 dias consecutivos, sempre no início do período de vigília.

4.2.5 Administração de Melatonina

Para administração de melatonina (Sigma Aldrich Chemical Corporation; St Louis, MO, USA; M-5250, > 98%), seguiu-se o modelo utilizado por Faria (2021), assim a droga foi dissolvida em etanol (< 0,1%) e diluída em solução salina (NaCl, 0,9%) para administração de 10 mg.kg⁻¹. Esta foi conduzida por via intraperitoneal 30 minutos previamente a realização do *flim* para os grupos MEx e FMEx. Para os animais dos grupos CTEEx e FEx administrou-se solução veículo de mesmo volume (etanol e NaCl 0,9%). Este procedimento assegura uma administração precisa de melatonina e de solução veículo, garantindo a consistência das condições experimentais e a confiabilidade dos resultados obtidos.

4.2.6 Teste de Tempo Limite (*flim*)

Aos 111 dias de idade os animais dos grupos CTEEx, MEx, FEx e FMEx foram submetidos ao exercício de natação até a exaustão sob intensidade correspondente a 90% iCC, denominado teste de tempo limite (*flim*), a fim de testar o efeito ergogênico da melatonina e do fitoterápico de *A. Keiskei* e *P. Ginseng*. Utilizou-se o critério de identificação da exaustão padronizado por Beck e Gobatto (2013): análise do comportamento do nado do animal com a finalidade de observar a realização dos esforços severos sem sucesso em retornar à superfície pelo período de 15 segundos consecutivos, determinando assim a exaustão e realizando um registro do tempo total de nado. A exaustão foi aceita por concordância de dois observadores experientes considerando os critérios acima.

4.3.7 Eutanásia e coleta de materiais biológicos

Esta etapa foi descrita em detalhes no índice 4.2.3.

4.3.8 Análise Estatística

Os dados foram apresentados em média \pm desvio padrão, foram realizadas ANOVA Fatorial de duas vias para análise de variância dos dados, sendo os efeitos principais a melatonina e fitoterápico, com posterior análise de post-hoc de Newman Keuls, por meio do software Statistica 7.0. Todos os testes foram conduzidos sob nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO I

5.1.1 Conteúdo Sérico de Glicose e Triglicerídeos

O fitoterápico não afetou significativamente as concentrações séricas de glicose ($p=0,06$) e triglicerídeos ($p=0,45$), como é visto no gráfico 2.

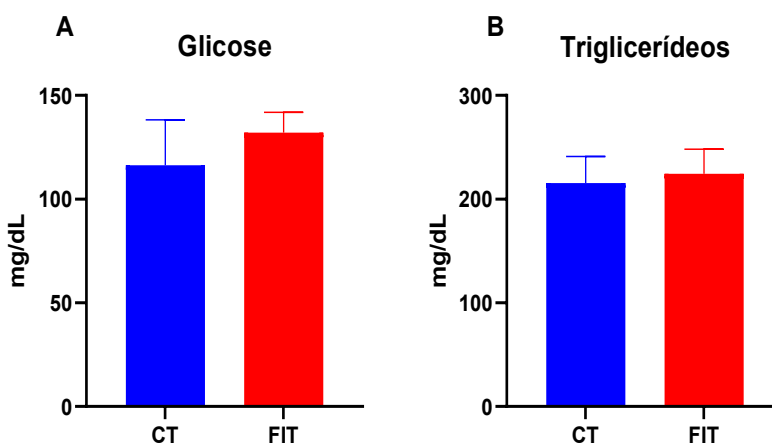


Gráfico 2. A. Glicose Sérica. B. Triglicerídeos Sérico. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão do conteúdo de glicose sérica. CT: grupo controle; FIT: grupo fitoterápico.

5.1.2 Glicogênio Muscular Esquelético e Hepático

O fitoterápico ocasionou aumento do conteúdo de glicogênio no músculo gastrocnêmio branco ($p < 0,01$). Por outro lado, houve diminuição significativa nos tecidos hepático ($p < 0,01$) e glúteo máximo ($p < 0,01$), como é visto no gráfico 3. Em contrapartida o fitoterápico não afetou significativamente os tecidos ME gastrocnêmio vermelho ($p=0,51$) e sóleo ($p=0,58$) (gráfico 3).

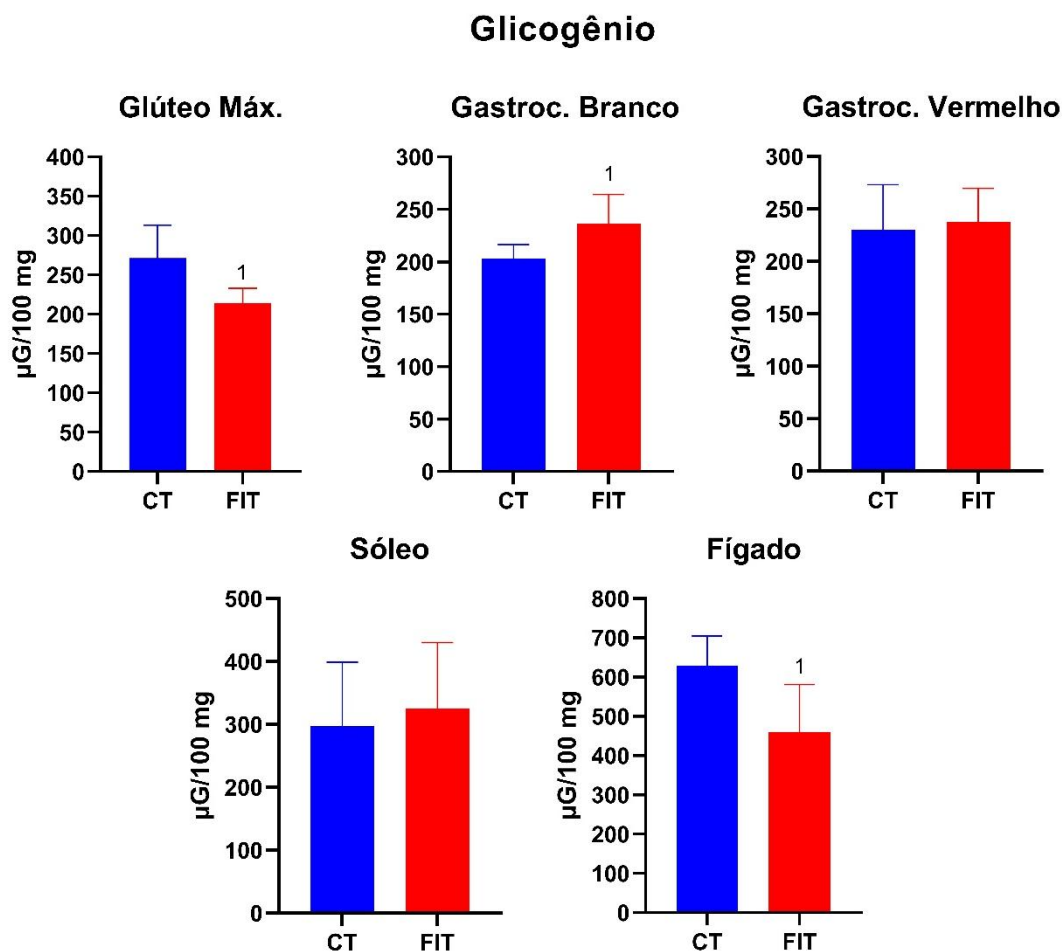


Gráfico 3. Glicogênio dos grupos CT e FIT. Valores expressos em média \pm desvio padrão. Glúteo m.: glúteo máximo; Gastrocn.: gastrocnêmio; B.: branco; V.: vermelho; mg: miligramas; FIT: grupo fitoterápico; CT: grupo controle. # $p < 0,01$ em relação ao CT.

5.1.3 Triglicerídeos Muscular Esquelético e Hepático

O fitoterápico ocasionou diminuição do conteúdo de triglicerídeos intramusculares no tecido ME gastrocnêmio vermelho ($p=0,04$). Entretanto, o fitoterápico não afetou de forma significativa os tecidos ME glúteo máximo ($p=0,42$), gastrocnêmio branco ($p=0,78$), sóleo ($p=0,24$) e tecido hepático ($p=0,09$), como é visto no gráfico 4.

Triglicerídeos

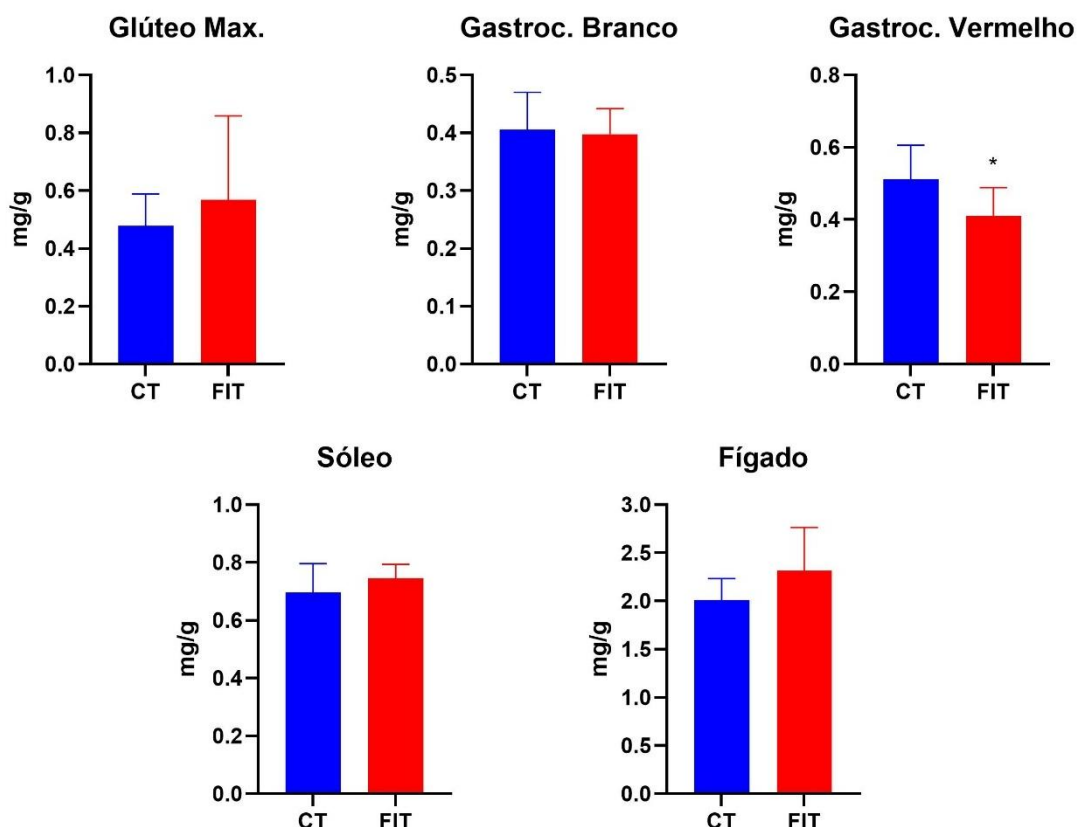


Gráfico 4. Triglicerídeos musculares e hepático dos grupos CT, FIT. Valores expressos em média \pm desvio padrão. Glúteo m.: glúteo máximo; Gastroc.: gastrocnêmio; B.: branco; V.: vermelho; mg: miligramas; g: gramas; CT: grupo controle; FIT: grupo fitoterápico. * $p < 0,05$ em relação ao CT.

5.2 EXPERIMENTO II

5.2.1 Teste de Carga Crítica

No teste de carga crítica, conduzido previamente às administrações das drogas, foi confirmada ausência de diferença entre as intensidades de carga crítica (iCC) sob os efeitos principais melatonina ($F=1,10$, $p=0,30$) e fitoterápico ($F=0,00$, $p=0,98$) no teste de ANOVA. E em relação a capacidade de trabalho anaeróbio (CTA) também não houve diferença entre os efeitos melatonina ($F=3,92$, $p=0,057$) e fitoterápico ($F=0,64$, $p=0,42$) (gráfico 5). Quanto ao tempo de exaustão obtido nas diferentes cargas aplicadas para determinação da carga crítica, também não teve diferença estatística: 7%MC (melatonina: $F=0,60$, $p=0,44$; fitoterápico: $F=0,83$, $p=0,37$); 9%MC (melatonina: $F=0,11$, $p=0,74$; fitoterápico: $F=0,42$, $p=0,51$); 11%MC (melatonina: $F=0,00$, $p=0,98$; fitoterápico: $F=1,38$, $p=0,24$); 13%MC (melatonina: $F=1,28$, $p=0,26$; fitoterápico: $F=1,02$, $p=0,31$) (tabela 1).

Tabela 1. Dados obtidos do tempo de exaustão e CTA no teste de carga crítica dos grupos CTE_x, MEx, FEx e FMEx.

Carga	CTEx	MEx	FEx	FMEx
7% (%MC)	292,3 ± 145,77 (s)	311,3 ± 222,27 (s)	417,2 ± 161,78 (s)	321,4 ± 143,60 (s)
9% (%MC)	222,3 ± 70,91 (s)	222,8 ± 101,69 (s)	215,2 ± 45,34 (s)	201,0 ± 47,41 (s)
11% (%MC)	104,8 ± 26,65 (s)	118,8 ± 41,817 (s)	117,8 ± 31,20 (s)	131,4 ± 35,24 (s)
13% (%MC)	87,6 ± 22,28 (s)	85,2 ± 17,05 (s)	75,5 ± 14,32 (s)	85,9 ± 15,55 (s)
CTA (s.g)	536,14 ± 110,88	601,02 ± 140,19	540,14±137,55	680,38 ± 178,43

Valores expressos em média e desvio padrão. Dados obtidos da iCC e tempo de exaustão no teste de carga crítica dos grupos com cargas de 7, 9, 11 e 13% da massa corporal (MC). MC: massa corporal; s: segundos; g: gramas; CTA: capacidade de trabalho anaeróbio; CTE_x: grupo controle exercitado; MEx: grupo melatonina exercitado; FEx: grupo fitoterápico exercitado; FMEx: grupo melatonina e fitoterápico exercitado;

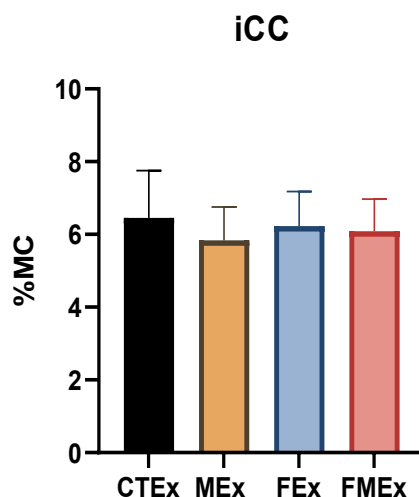


Gráfico 5. Dados obtidos da iCC no teste de carga crítica dos grupos CTE_x, MEx, FEx e FMEx. Valores expressos em média e desvio padrão. s: segundos; iCC: intensidade de carga crítica; g: gramas; CTE_x: grupo controle exercitado; MEx: grupo melatonina exercitado; FEx: grupo fitoterápico exercitado; FMEx: grupo melatonina e fitoterápico exercitado;

5.2.2 Efeito das Drogas Sobre o Teste de Tempo Limite

Foram observados efeitos principais significativos para a melatonina

($F=5,02$, $p<0,01$) e o extrato padronizado de *A. Keiskei* e *P. Ginseng* ($F=8,17$, $p<0,01$), que promoveram aumento significativo no tempo de nado dos animais. Dados de média e desvio padrão, além do teste de post hoc estão apresentados no gráfico 6, que demonstra diferença significativa na performance somente para o grupo com drogas associadas em relação ao controle.

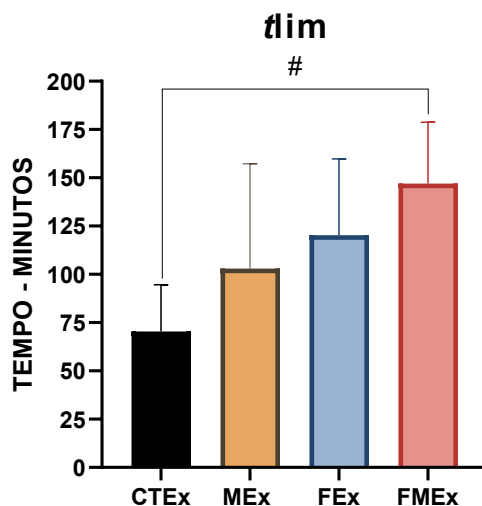


Gráfico 6. Teste de Tempo Limite. O gráfico representa a média \pm desvio padrão do tempo de nado dos animais dos grupos. CTEEx: grupo controle exercitado; MEx: grupo melatonina; FEx: grupo fitoterápico exercitado; FMEx: grupo melatonina e fitoterápico exercitado. # $p<0,01$ em relação ao grupo CTEEx.

5.2.3 Concentrações Séricas de Glicose e Triglicerídeos

Foram observados os efeitos principais significativos para melatonina ocasionou o aumento do conteúdo de glicose sérica ($F=5,61$, $p=0,02$), mas não para o fitoterápico ($F=3,26$, $p=0,08$; gráfico 7A), nos triglicerídeos por outro lado, a melatonina não provocou efeito significativo ($F=0,29$, $p=0,59$), enquanto o fitoterápico levou a uma diminuição ($F=5,00$, $p=0,03$) no conteúdo de triglicerídeos sérico. Dados de média e desvio padrão, além do teste de post hoc estão apresentados no gráfico 5, que demonstra diferença significativa no conteúdo de glicose somente para o grupo com drogas associadas em relação ao controle, melatonina e fitoterápico (gráfico 7A).

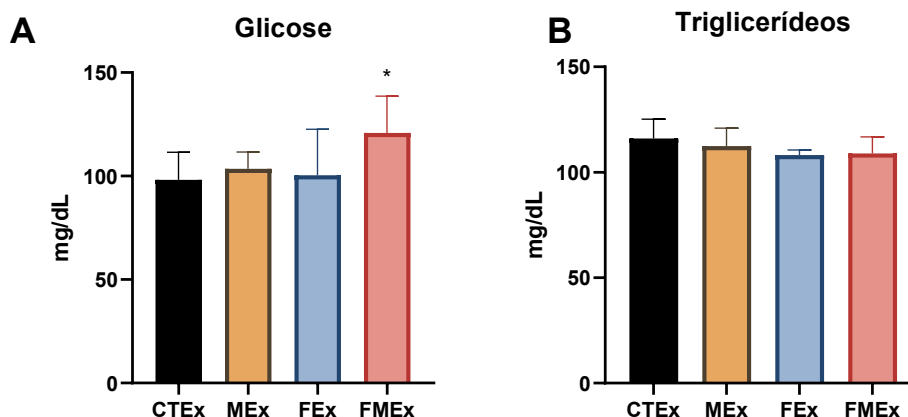


Gráfico 7. A. Glicose Sérica. **B.** Triglicerídeos Sérico. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão do conteúdo de glicose sérica. CTEEx: grupo controle exercitado; MEx: grupo melatonina exercitado; FEx: grupo fitoterápico exercitado; FMEx: grupo melatonina e fitoterápico exercitado. * $p < 0,05$ em relação aos grupos CTEEx, MEx e FEx.

5.2.4 Glicogênio Muscular Esquelético e Hepático

Os efeitos principais melatonina e fitoterápico não afetaram significativamente os conteúdos de glicogênio hepático (melatonina: $F=0,42$, $p=0,51$; fitoterápico: $F=0,84$, $p=0,36$) e conteúdo de glicogênio intramuscular do tecido ME glúteo máximo (melatonina: $F=1,57$, $p=0,21$; fitoterápico: $F=0,62$, $p=0,43$). A administração da melatonina causou diminuição no glicogênio muscular nos tecidos gastrocnêmico branco ($F=7,07$, $p=0,01$), e sóleo ($F=5,60$, $p=0,02$), porém não afetou de forma significativa o ME gastrocnêmio vermelho ($F=3,77$, $p=0,06$). Em paralelo a isto, a administração do fitoterápico gerou diminuição no conteúdo do glicogênio muscular nos tecidos gastrocnêmico branco ($F=7,07$, $p=0,01$), gastrocnêmio vermelho ($F=13,97$, $p < 0,01$) e sóleo ($F=5,12$, $p=0,03$) (gráfico 8). Dados de média e desvio padrão, além do teste de post hoc estão apresentados no gráfico 8, demonstra diferença significativa na diminuição do conteúdo de glicogênio intramuscular nos tecidos gastrocnêmio branco e vermelho para os grupos que receberam a administração das drogas e da associação em relação ao grupo controle (MEx < CTEEx, FEx < CTEEx e FMEx < CTEEx), o grupo que recebeu a administração apenas com solução fitoterápica também teve o conteúdo de glicogênio diminuído no ME

sóleo.

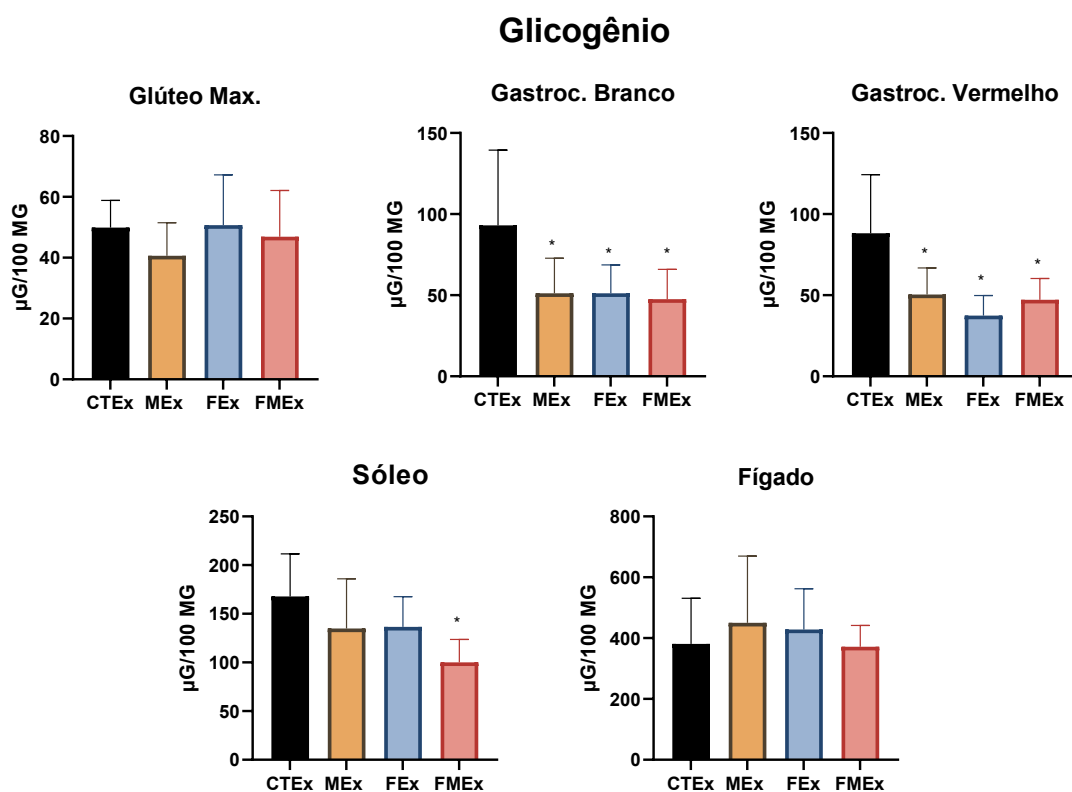


Gráfico 8. Glicogênio dos grupos CTEEx, MEx, FEx, FMEx. Valores expressos em média e desvio padrão. Glúteo m.: glúteo máximo; Gastroc.: gastrocnêmio; B.: branco; V.: vermelho; mg: miligramas; CTEEx: grupo controle exercitado; MEx: grupo melatonina exercitado; FEx: grupo fitoterápico exercitado; FMEx: grupo melatonina e fitoterápico exercitado. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.2.5 Triglicerídeos Muscular Esquelético e Hepático

Os efeitos principais melatonina e fitoterápico não afetaram o conteúdo de triglicerídeos intramusculares dos tecidos ME glúteo máximo (melatonina: $F=0,10$, $p=0,74$; fitoterápico: $F=1,18$, $p=0,28$) e sóleo (melatonina: $F=3,28$, $p=0,08$; fitoterápico: $F=1,97$, $p=0,17$), do mesmo modo, a melatonina, não afetou significativos o conteúdo intramuscular de triglicerídeos nos tecidos ME gastrocnêmio branco ($F=0,01$, $p=0,89$), gastrocnêmio vermelho ($F=1,42$, $p=0,24$) e no tecido hepático ($F=0,63$, $p=0,43$). Por outro lado, a administração do fitoterápico apresentou efeitos estatísticos significativos na diminuição do conteúdo intramuscular de triglicerídeos no tecido muscular esquelético (ME) gastrocnêmio branco ($F=5,07$, $p=0,03$), gastrocnêmio vermelho ($F=6,21$, $p=0,01$) e hepático ($F=7,36$, $p=0,01$), como é possível ver no gráfico 9. Dados de média e desvio padrão, além do teste de post hoc estão apresentados no gráfico 9, não demonstra

diferenças estatísticas significativas entre nenhuma das drogas administradas.

Triglicerídeos

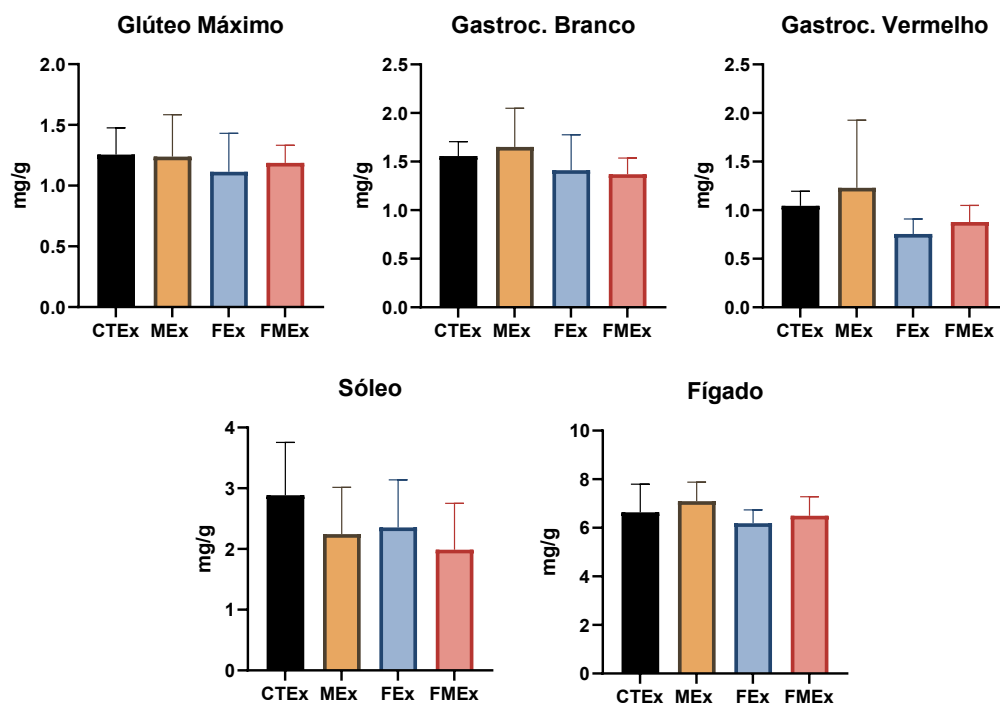


Gráfico 9. Triglicerídeos musculares e hepático dos grupos CTEEx, MEx, FEx, FMEx. Valores expressos em média e desvio padrão. Glúteo M.: glúteo máximo; Gastroc.: gastrocnêmio; B.: branco; V.: vermelho; mg: miligramas; g: gramas; CTEEx: grupo controle exercitado; MEx: grupo melatonina exercitado; FEx: grupo fitoterápico exercitado; FMEx: grupo melatonina e fitoterápico exercitado.

6 DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi o potencial ergogênico significativo da melatonina e extrato de *P. ginseng* e *A. keiskei*, confirmados pelo tempo até a exaustão no *flim*, indicando que quando administrados juntos estes compostos possuem efeito somatório. Sobre os substratos energéticos, o extrato de *P. ginseng* e *A. keiskei* e a melatonina causaram modulações distintas.

O resultado de ANOVA indica que administração aguda de melatonina tem um papel importante na melhoria do desempenho físico (*flim*), corroborando estudos anteriores que destacam seu efeito ergogênico (FARIA et al., 2022; BECK et al., 2015A; BECK et al., 2016), nestes estudos anteriores a administração de 10 mg.kg⁻¹ de melatonina também foi considerada mais eficaz durante o período de

vigília em ratos (BECK, 2015). Por outro lado, o resultado de post-hoc, não apresentou efeito da melatonina em relação ao grupo controle, indo de contrapartida aos estudos citados anteriormente (FARIA et al., 2022; BECK et al., 2015A; BECK et al., 2016), isso pode ser explicado pela metodologia diferente realizada nestes estudos.

A melatonina parece atuar principalmente aumentando a utilização de glicogênio muscular, sem afetar os triglicerídeos ou o glicogênio hepático e elevando os níveis de glicose sérica, o que pode fornecer energia adicional para os músculos, como observamos em nossos resultados. Faria et al., (2022), observou que os animais que receberam a administração de melatonina não só evidenciaram um aumento no tempo de nado dos animais, como também identificaram que nestes animais houve um aumento na expressão de PGC-1 α e NRF-1. Somado a isso, a melatonina possui uma habilidade já evidenciada em amplificar a ação da contração muscular sobre a PGC-1 α , o que resulta em uma maior tolerância ao exercício (WONG et al., 2015; TADAISHI et al., 2011). É provável que tais efeitos decorreram por meio de receptores de melatoninérgicos presentes na membrana do músculo esquelético como MT1 e MT2 (HA et al., 2006).

Esses fatores indicam que há maior biogênese mitocondrial provocado pela administração de melatonina, esse processo é de suma importância para o processo de metabolização dos substratos energéticos como a glicose ao priorizar a fosforilação oxidativa de ácidos graxos nas mitocôndrias para a síntese de ATP, colaborando na manutenção dos níveis de glicogênio nas células, um fator que poderia restringir o desempenho em atividades físicas prolongadas. (STACCHIOTTI et al., 2020; KRUK et al., 2021; FARIA et al., 2022; LIU et al., 2019). Ainda que, haja estudos (MAZEPA et al., 2000; SANCHEZ-CAMPOS et al., 2001) que proponham que a melatonina aja modulando os substratos energéticos ao final do exercício, potencializando a utilização de lipídios e atenuando o consumo de carboidratos, no presente estudo a melatonina ocasionou um aumento no conteúdo de glicose ($F=5,61$, $p=0,02$) em relação aos animais que receberam a solução veículo, tal cenário indica um efeito modulador da melatonina no metabolismo de glicose previamente a realização do exercício, aumentando a glicemia e eventualmente auxiliando no fornecimento glicose para os músculos. Além disso, a melatonina pode modular a liberação de hormônios como glucagon e adrenalina, que promovem a liberação de glicose no sangue (PESCHKE et al., 2013),

melhorando a função mitocondrial em tecido muscular de ratos (STACHIOTTI et al., 2020). A melatonina também se demonstrou capaz de aumentar a transcrição de transportadores de glicose e triglicerídeos (GLUT4 e FAT/CD36, respectivamente), assim otimizando o transporte e a disponibilidade para o posterior uso destes substratos pelo músculo (FARIA et al., 2021). Isso corrobora com o maior \dot{V}_{O_2} ($F=5,02$, $p<0,01$) observado neste estudo.

Dessa forma, o glicogênio muscular é uma reserva de energética importante para o exercício físico e sua ausência é um fator limitante para o desempenho (KRSSAK et al., 2000), tendo em conta que o teste aplicado (\dot{V}_{O_2}) para confirmar a ergogenia, levou os animais ao máximo de sua performance e depletou consideravelmente o conteúdo de glicogênio muscular (BECK et al., 2014). Neste cenário, a melatonina reduziu consideravelmente o conteúdo de glicogênio dos ME gastrocnêmico branco ($F=7,07$, $p=0,01$) e sóleo ($F=5,60$, $p=0,02$), dos animais que receberam solução com melatonina em relação aos animais que receberam solução veículo, e ocasionou uma diminuição nos tecidos gastrocnêmio branco e vermelho ($p<0,05$) em relação aos animais do grupo CTE_x > MEx. Uma razão para estes resultados é a capacidade da melatonina pode modular enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio, como a glicogênio fosforilase (degrada o glicogênio em glicose-1-fosfato) e a glicogênio sintase (que sintetiza glicogênio) (REITER et al., 2010; TAN et al., 2015; SHARMA et al., 2015). A redução do glicogênio nesses tecidos gastrocnêmico branco ($F=7,07$, $p=0,01$) e sóleo ($F=5,60$, $p=0,02$), propondo que a melatonina pode ter aumentado a utilização dessa fonte de energia durante o exercício. Isso pode estar relacionado ao aumento do tempo de nado, pois o glicogênio é uma fonte rápida de energia para os músculos. Esse resultado indica que a melatonina pode modular o metabolismo energético durante o exercício, favorecendo a utilização de glicogênio muscular para sustentar a atividade física, útil em situações de esforço prolongado (TAN et al., 2015; SHARMA et al., 2015). O fígado é um importante reservatório de glicogênio, que pode ser convertido em glicose e liberado no sangue durante o exercício (GIUDICE e TAYLOR, 2017). A ausência de efeito da melatonina no glicogênio e triglicerídeos hepático ($F=0,42$, $p=0,51$ e $F=0,63$, $p=0,43$, respectivamente) sugerindo que seu impacto no metabolismo energético é mais localizado nos músculos do que no fígado. Isso reforça a ideia de que a melatonina atua principalmente no metabolismo muscular durante o exercício, sem afetar significativamente as reservas hepáticas.

Os resultados apontam que a administração do extrato padronizado de *A. keiskei* e *P. ginseng* levou a um aumento ainda mais expressivo no *flim* ($F=8,17$, $p<0,01$), isso corrobora achados anteriores de efeito ergogênico, tanto do *P. ginseng* e *A. keiskei* isoladas, quanto em associação (KIM et al., 2017). Demonstrando que a associação destes compostos possui um efeito modulador no metabolismo energético, promovendo a oxidação de lipídios e melhorando a resistência física, através da redução de triglicerídeos séricos ($F=0,29$, $p=0,59$) e intramusculares [gastrocnêmio branco ($F=5,07$, $p=0,03$), gastrocnêmio vermelho ($F=6,21$, $p=0,01$) e hepático ($F=7,36$, $p=0,01$)], e da diminuição do glicogênio muscular [gastrocnêmico branco ($F=7,07$, $p=0,01$), gastrocnêmico vermelho ($F=13,97$, $p<0,01$) e sóleo ($F=5,12$, $p=0,03$)]. Porém, quando analisado o perfil energético sem a realização do exercício, o fitoterápico não ocasionou efeito no conteúdo de glicose ($p=0,06$) e triglicerídeos séricos ($p=0,45$), por outro lado, o fitoterápico parece modular o metabolismo de glicogênio e triglicerídeos de maneira tecido-específica, com efeitos distintos no músculo esquelético aumento no gastrocnêmio branco ($p<0,01$ FIT > CT), redução no glúteo máximo ($p<0,01$ FIT < CT), e redução no glicogênio hepático ($p<0,01$, FIT < CT). Esses efeitos sugerem que o fitoterápico pode estar influenciando a utilização de substratos energéticos durante o exercício, favorecendo a oxidação de lipídios e reduzindo a dependência da glicose. No entanto, a ausência de efeito sobre a glicose sérica tanto após o *flim*, quanto em repouso indica que o fitoterápico não altera significativamente o metabolismo da glicose em repouso. A diminuição nos triglicerídeos intramuscular (gastrocnêmio vermelho) pode indicar um potencial efeito benéfico no metabolismo lipídico muscular.

Tais efeitos podem ser atribuídos às propriedades sinérgicas dos compostos bioativos presentes em *A. keiskei* e *P. ginseng*, como saponinas, flavonoides e antioxidantes, que são conhecidos por melhorar a função mitocondrial, reduzir o estresse oxidativo e modular vias metabólicas relacionadas à produção de energia. A *A. keiskei* é capaz de aumentar a fosforilação de AMPK no tecido adiposo e fígado (KIL, 2017; ZHANG, 2015) e a translocação de GLUT-4 nas membranas das células do músculo esquelético, ocasionando, por conseguinte, absorção aprimorada de glicose. Além disso, reduz a degradação proteica (KWEON et al., 2019), e suas chalconas também possuem forte atividade antioxidante (WAHYUMI et al., 2024).

Além disso, *P. ginseng* é conhecido por suas propriedades adaptogênicas, que podem melhorar a capacidade física e reduzir a fadiga, enquanto *A. keiskei* pode contribuir com efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, que protegem os tecidos durante o exercício prolongado. O *P. ginseng* é capaz, por si só, de aumentar superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), PGC-1 α , NRF-1, AMPK, Citocromo-C e GLUT-4 (YOON et al., 2021; HYUN et al., 2020; PARK et al., 2021), fatores estes diretamente relacionados à maior desempenho; também potencializa a oxidação de ácidos graxos e regeneração muscular, assim como reduz a fadiga neuromuscular periférica (CRISTINE-SOUZA et al., 2022; MUÑOZ-CASTELLANOS, 2023; PARK et al., 2021).

Estes achados demonstram que há um efeito sinérgico do exercício de *endurance* e do fitoterápico já que não houve efeitos estatísticos significativos nas análises realizadas dos substratos energéticos sugere também a necessidade de analisar PGC-1 α e NRF-1 confirmando o aumento na quantidade de mitocôndrias funcionais.

A administração associada de melatonina e extrato de *A. keiskei* e *P. ginseng* (FME_x) resultou em maiores tempos de nado no *flim* ($p < 0,01$, FME_x > CTE_x), este grupo também obteve a maior homogeneidade dos resultados e maior diferença estatística em relação ao grupo CTE_x corroborando com a hipótese de que a administração somada destes compostos seria capaz de causar ergogenia no modelo utilizado (*flim*). No que tange os substratos energéticos analisados, essa associação aumentou consideravelmente o conteúdo de glicose ($p < 0,05$) em relação aos grupos CTE_x, FE_x e ME_x, também ocasionou uma diminuição no conteúdo de glicogênio intramuscular nos tecidos gastrocnêmio branco e vermelho ($p < 0,05$, FME_x < CTE_x), no entanto, não houve diferenças significativas nos conteúdos de triglicérides sérico, intramuscular e hepático, bem como no glicogênio hepático. Tais resultado ilustram uma potencialização de efeito associado entre o hormônio e os fitoterápicos, possivelmente justificada por atuarem em mecanismos fisiológicos similares, por meio da maior biogênese mitocondrial (PGC-1 α e NRF-1), da translocação dos transportadores de glicose e lipídios, melhor absorção e reabastecimento de glicogênio (YOON et al., 2021; ZHANG et al., 2019; FARIA et al., 2022).

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a administração de melatonina e extrato de *A. keiskei* e *P. ginseng* tiveram efeito ergogênico, a administração associada das drogas teve efeito somatório causando ergogenia e melhorando significativamente a performance no modelo utilizado. Os compostos causaram modulações distintas sobre o consumo dos substratos energéticos.

8 CONFLITO DE INTERESSES

Declaro que a pesquisa foi conduzida na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses, logo não há qualquer conflito de interesses com a empresa Florien Fitoativos[®] fornecedora do extrato padronizado de *Panax ginseng* e *Angélica keiskei* (Mitocondrin[®]).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA-CASTROVIEJO, Darío et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. **Journal of Pineal Research**, v. 30, n. 2, p. 65-74, 2001.

ACUÑA-CASTROVIEJO, Darío. et al. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2(2), 133-151, 2005.

ACUÑA-CASTROVIEJO, Darío. et al. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 2, p. 221-240, 2011.

AMARAL, Fernanda Gaspar Do et al. New insights into the function of melatonin and its role in metabolic disturbances. **Expert review of endocrinology & metabolism**, v. 14, n. 4, p. 293-300, 2019.

BACH, Hoang Viet et al. Efficacy of ginseng supplements on fatigue and physical performance: a meta-analysis. **Journal of Korean Medical Science**, v. 31, n. 12, p. 1879-1886, 2016.

BECK, W., & GOBATTO, C. Effects of maximum intensity aerobic swimming exercise until exhaustion at different times of day on the hematological parameters in rats. **Acta Physiologica Hungarica**, 100(4), 427-434, 2013.

BECK, W. R.; SCARIOT, P. P. M.; GOBATTO, C. A. Melatonin is an ergogenic aid for exhaustive aerobic exercise only during the wakefulness period. **International journal of sports medicine**, v. 37, n. 01, p. 71-76, 2016.

BECK, Wladimir Rafael. **Resposta ergogênica da melatonina no nadir e acrofase da atividade espontânea e suas consequências na atividade da via IKK/NF- κ B e dano tecidual muscular**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Educação Física, Campinas, SP.

BECK, Wladimir Rafael et al. Melatonin has an ergogenic effect but does not prevent inflammation and damage in exhaustive exercise. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 18065, 2015.

BECK, Wladimir R.; CAMPESAN, Yuri S.; GOBATTO, Claudio A. Validity and reliability of incremental test to determine the anaerobic threshold in swimming rats. **International Journal of Applied Exercise Physiology**, 2015.

BECK, W. R.; SCARIOT, P. P. M.; GOBATTO, C. A. Melatonin is an ergogenic aid for exhaustive aerobic exercise only during the wakefulness period. **International journal of sports medicine**, v. 37, n. 01, p. 71-76, 2016.

BHATTI, Jasvinder Singh; BHATTI, Gurjit Kaur; REDDY, P. Hemachandra. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 5, p. 1066-1077, 2017.

CASTOLDI, Robson Chacon et al. Determinação do limiar anaeróbio pela carga crítica superestima teste de lactato mínimo. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 28, n. 2, 2020.

CHITIMUS, Diana Maria et al. Melatonin's impact on antioxidative and anti-inflammatory reprogramming in homeostasis and disease. **Biomolecules**, v. 10, n. 9, p. 1211, 2020.

DE ARAUJO, Gustavo Gomes et al. Padronização de um protocolo experimental de treinamento periodizado em natação utilizando ratos Wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, p. 51-56, 2010.

DUBOIS M., et al. Método colorimétrico para determinação de açúcares e substâncias relacionadas. **Anal. Chem.** 28, 350–356, 1956.

FARIA, Vinícius Silva. **Administração aguda de melatonina na performance e recuperação metabólica após esforço exaustivo: uma investigação sobre o metabolismo intermediário**. Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2021.

FARIA, Vinícius Silva et al. Acute melatonin administration improves exercise tolerance and the metabolic recovery after exhaustive effort. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 19228, 2021.

FARIA, Vinícius Silva et al. Melatonin Potentiates Exercise-Induced Increases in Skeletal Muscle PGC-1 α and Optimizes Glycogen Replenishment. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 803126, 2022.

FERNANDES, Ricardo J.; VILAS-BOAS, J. Paulo. Time to exhaustion at the VO₂max velocity in swimming: a review. **Journal of human kinetics**, v. 32, p. 121, 2012.

GAESSER, G. A. POOLE, D. C. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 24, n. 1, p. 35-70, 1996.

GALANO, Annia; TAN, Dun-Xian; REITER, Russel J. Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 530, 2018.

GIUDICE, Jimena; TAYLOR, Joan M. Muscle as a paracrine and endocrine organ. **Current opinion in pharmacology**, v. 34, p. 49-55, 2017.

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

GOBATTO, Carlos. A. et al. Estimativa de carga crítica em ratos nadadores jovens usando modelos hiperbólicos e lineares. **Fisiologia Comparativa do Exercício**, v. 9, n. 2, pág. 85-91, 2013.

HA, Eunyong et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. **Journal of pineal research**, v. 41, n. 1, p. 67-72, 2006.

HYUN, Sun Hee et al. Physiological and pharmacological features of the non-saponin components in Korean Red Ginseng. **Journal of Ginseng Research**, v. 44, n. 4, p. 527-537, 2020.

HYUN, Sun Hee et al. Effects of Panax ginseng and ginsenosides on oxidative stress and cardiovascular diseases: pharmacological and therapeutic roles. **Journal of Ginseng Research**, v. 46, n. 1, p. 33-38, 2022.

JORNAYVAZ, François R.; SHULMAN, Gerald I. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays in biochemistry**, v. 47, p. 69-84, 2010.

KAWABATA, Kyuichi et al. Prenylated chalcones 4-hydroxyderricin and xanthoangelol stimulate glucose uptake in skeletal muscle cells by inducing GLUT4 translocation. **Molecular nutrition & food research**, v. 55, n. 3, p. 467-475, 2011.

KIL, Yun-Seo et al. Angelica keiskei, an emerging medicinal herb with various bioactive constituents and biological activities. **Archives of pharmacal research**, v. 40, p. 655-675, 2017.

KIM, Eunmi; CHOI, Jinho; YEO, Ikhyun. The effects of Angelica keiskei Koidz on the expression of antioxidant enzymes related to lipid profiles in rats fed a high fat diet. **Nutrition Research and Practice**, v. 6, n. 1, p. 9-15, 2012.

KIM, Changhee et al. Ashitaba and red ginseng complex stimulates exercise capacity by increasing mitochondrial biogenesis. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 6, p. 685-692, 2017.

KIM, Ji Hye et al. Role of ginsenosides, the main active components of Panax ginseng, in inflammatory responses and diseases. **Journal of ginseng research**, v. 41, n. 4, p. 435-443, 2017.

KRSSAK, Martin et al. Intramuscular glycogen and intramyocellular lipid utilization during prolonged exercise and recovery in man: a ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 2, p. 748-754, 2000.

KWEON, Minson et al. A chalcone from Ashitaba (Angelica keiskei) stimulates myoblast differentiation and inhibits dexamethasone-induced muscle atrophy. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2419, 2019.

LEE, S. M. et al. Characterization of Korean Red Ginseng (Panax ginseng Meyer): History, preparation method, and chemical composition. **Journal of ginseng research**, v. 39, n. 4, p. 384-391, 2015.

LIU KAIQING, Liu KaiQing et al. Melatonin reduces intramuscular fat deposition by promoting lipolysis and increasing mitochondrial function. **Journal of lipid research**, v. 60, n. 4, p. 767-782, 2019.

KOJETIN, Douglas J.; BURRIS, Thomas P. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. **Nature reviews Drug discovery**, v. 13, n. 3, p. 197-216, 2014.

KRUK, Joanna; ABOUL-ENEIN, Basil Hassan; DUCHNIK, Ewa. Exercise-induced oxidative stress and melatonin supplementation: current evidence. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 71, n. 1, p. 27, 2021.

LIMA-SILVA, Adriano Eduardo et al. Metabolismo do glicogênio muscular durante o exercício físico: mecanismos de regulação. **Revista de Nutrição**, v. 20, p. 417-

429, 2007.

MA, Haozhen et al. ROR: nuclear receptor for melatonin or not?. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2693, 2021.

MANCHADO, F. D. B. et al. Maximal lactate steady state in running rats. **Journal of exercise physiology online**, v. 8, p. 29-35, 2005.

MANCHESTER, Lucien C. et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. **Journal of pineal research**, v. 59, n. 4, p. 403-419, 2015.

MAURIZ, José L. et al. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 1, p. 1-14, 2013.

MARTIN, M. et al. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. **Journal of Pineal Research**, v. 28, n. 4, p. 242-248, 2000.

MAZEPA, R. C. et al. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. **Life Sciences**, v. 66, n. 2, p. 153-160, 1999.

MAZEPA R. C., CUEVAS M. J., COLLADO P. S., GONZALES-GALLEGO J. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. **Life Sciences**, v. 66, n. 2, p. 153-160, 2000.

MONOD, H.; SCHERRER, J. The work capacity of a synergic muscular group. **Ergonomics**, v. 8, n. 3, p. 329-338, 1965.

MUÑOZ-CASTELLANOS, Borja et al. Effect of ginseng intake on muscle damage induced by exercise in healthy adults. **Nutrients**, v. 16, n. 1, p. 90, 2023.

NOSJEAN, Olivier et al. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. **Biochemical pharmacology**, v. 61, n. 11, p. 1369-1379, 2001.

PARK, Soo Kyung et al. The antioxidant activities of Korean Red Ginseng (*Panax ginseng*) and ginsenosides: a systemic review through in vivo and clinical trials. **Journal of ginseng research**, v. 45, n. 1, p. 41-47, 2021.

PEJON, Taciane Maria M., **Efeito do treinamento aeróbio de natação no conteúdo de glut4 e fat cd36 e metabolismo energético de ratas ovariectomizadas**. Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2020.

PEREIRA, Benedito. Biogênese mitocondrial e exercício físico: hipótese do acoplamento elétrico-transcricional. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 29, n. 4, p. 687-703, 2015.

PESCHKE, Elmar; BÄHR, Ina; MÜHLBAUER, Eckhard. Melatonin and pancreatic islets: interrelationships between melatonin, insulin and glucagon. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 4, p. 6981-7015, 2013.

REITER, Russel J.; TAN, Dun-Xian; FUENTES-BROTO, Lorena. Melatonin: a multitasking molecule. **Progress in brain research**, v. 181, p. 127-151, 2010.

REITER, Russel J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of pineal research**, v. 61, n. 3, p. 253-278, 2016.

REITER, Russel J., Rosales-Corral, S., Tan, D.X. et al. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. **Cell. Mol. Life Sci.** 74, 3863–3881, 2017.

REITER, Russel J. et al. Melatonin and pathological cell interactions: mitochondrial glucose processing in cancer cells. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 22, p. 12494, 2021.

RIUS-PÉREZ, Sergio et al. PGC-1 α , inflammation, and oxidative stress: an integrative view in metabolism. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, n. 1, p. 1452696, 2020.

ROSS, Megan et al. Precooling methods and their effects on athletic performance: a systematic review and practical applications. **Sports Medicine**, v. 43, p. 207-225, 2013.

SHARMA, Shweta et al. The role of melatonin in diabetes: therapeutic implications. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 59, n. 5, p. 391-399, 2015.

SISWANTO, Ferbian Milas et al. Extract of *Angelica keiskei* Leaves Attenuates Spatial Memory Impairment on the D-galactose Model of Brain Aging in Mice. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 17, n. 3, p. 1563-1573, 2024.

STACCHIOTTI, Alessandra; FAVERO, Gaia; RODELLA, Luigi Fabrizio. Impact of melatonin on skeletal muscle and exercise. **Cells**, v. 9, n. 2, p. 288, 2020.

TADAISHI, Miki et al. Skeletal muscle-specific expression of PGC-1 α -b, an exercise-responsive isoform, increases exercise capacity and peak oxygen uptake. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28290, 2011.

TAN, Dun-Xian et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 2, n. 2, p. 181-197, 2002.

TAN, Dun-Xian et al. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18886-18906, 2015.

THEIN, Lori A.; THEIN, Jill M.; LANDRY, Gregory L. Ergogenic aids. **Physical therapy**, v. 75, n. 5, p. 426-439, 1995.

VENTURA-CLAPIER, Renée; GARNIER, Anne; VEKSLER, Vladimir. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . **Cardiovascular research**, v. 79, n. 2, p. 208-217, 2008.

WAHYUNI, Ika et al. The pharmacology activities of *Angelica keiskei* Koidzumi and its efficacy and safety in humans. **Heliyon**, v. 10, n. 2, 2024.

WONG, Kari E. et al. Muscle-specific overexpression of PGC-1 α does not augment metabolic improvements in response to exercise and caloric restriction. **Diabetes**, v. 64, n. 5, p. 1532-1543, 2015.

YOON, Sang Jun et al. Effect of Korean red ginseng on metabolic syndrome. **Journal of Ginseng Research**, v. 45, n. 3, p. 380-389, 2021.

ZHANG, Tianshun et al. Ashitaba (*Angelica keiskei*) extract prevents adiposity in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. **Food & function**, v. 6, n. 1, p. 134-144, 2015.

ANEXO I



Universidade Federal de São Carlos
 Comissão de Ética no
 Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA MELATONINA E MITOCONDRIAS ASSOCIADOS OU NÃO SOBRE A PERFORMANCE FÍSICA E MARCADORES TECIDUAIS E SÉRICOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO", protocolada sob o CEUA nº 3976140623 (ID 001876), sob a responsabilidade de **Prof Dr Wladimir Rafael Beck E Ana Júlia F. Neves (Discente de Mestrado Pibicf)** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 01/08/2023.

We certify that the proposal "EFFECTS OF MELATONIN AND MITOCHONDRIAS, ASSOCIATED OR NOT ON PHYSICAL PERFORMANCE AND TISSUE AND SERUM MARKERS OF ENERGY METABOLISM", utilizing 40 Heterogenic rats (40 males), protocol number CEUA 3976140623 (ID 001876), under the responsibility of **Prof Dr Wladimir Rafael Beck E Ana Júlia F. Neves (Discente de Mestrado Pibicf)** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 08/01/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 07/2023 a 07/2025 Área: Centro de Ciências Biológicas E da Saúde

Origem: Biotério Central da UFSCar

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 40 a 45 dias

Quantidade: 40

Linhagem: Wistar

Peso: 120 a 150 g

São Carlos, 26 de fevereiro de 2024

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
 Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de São Carlos



ANEXO II



Universidade Federal de São Carlos

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO : EMENDA v26/03/2024

Certificamos que a EMENDA (versão de 26/03/2024) da proposta intitulada "EFEITOS DA MELATONINA E MITOCONDRIAS ASSOCIADOS OU NÃO SOBRE A PERFORMANCE FÍSICA E MARCADORES TECNOLÓGICOS E SÉRICOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO", CEUA nº 3976140623 (ID 012356), sob a responsabilidade de **Prof Dr Wladimir Rafael Beck E Ana Júlia F. Neves (Discente de Mestrado Piggcf)** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) em 16/04/2024.

Pedido apresentado à CEUA: A partir dos resultados obtidos com os 4 grupos experimentais constantes da primeira proposta, observou-se significativo efeito da melatonina e da mitocondria sobre o tempo limite de exercício físico. Isso permitiu responder a questão primordial do projeto, contudo, como todos os animais foram submetidos ao exercício físico, surgiu a interessante proposta de investigar o efeito da mitocondria sem a presença do exercício físico. Isso se faz relevante pois a realização do exercício físico certamente promove modificações fisiológicas nos parâmetros de interesse. Ao avaliar animais que receberam a mitocondria e não realizaram exercício físico, pode-se verificar se a droga causou alguma modificação fisiológica prévia que seria capaz de aumentar a tolerância ao esforço físico.

Considerações da CEUA: Na emenda foi solicitado acréscimo de 20 ratos machos Wistar. A solicitação é pertinente, vai contribuir para esclarecer a hipótese apresentada no projeto.

Término previsto: 07/2025

Origem: Biotério Central da UFSCar

Espécie: Ratos heterogênicos sexo: Machos idade: 40 a 45 dias Quantidade solicitada: 20

Linhagem: Wistar Peso: 120 a 150 g

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Ratos heterogênicos	Machos	60	0

São Carlos, 17 de abril de 2024

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

