

# DIFERENCIAÇÃO DE ADAPTAÇÃO DE ATLETAS CORREDORES AO ENSAIO ERGOESPIROMÉTRICO DE BRUCE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

GUILHERME GÖRGEN DA ROCHA, FRANCIELLE PASQUALOTTI MEINHARDT, MIRIAM BEATRIS RECKZIEGEL, HILDEGARD HEDWIG POHL, VALERIANO ANTONIO CORBELLINI  
Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil  
valer@unisc.br

## INTRODUÇÃO

A espectroscopia FT-IR é uma técnica usada para análise de componentes orgânicos e é conhecida como uma espectroscopia vibracional desde que o espectro origina-se de transições entre níveis de energias vibracionais de uma ligação covalente de uma molécula. O espectro de infravermelho situa-se entre o espectro da luz visível e o das microondas (entre 1 e 1.000  $\mu\text{m}$ ). A região de maior utilidade para análise qualitativa está situada entre 4.000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  e é conhecida como infravermelho médio (MIR) (Wang, Mizaikoff, 2008). Com base nestes princípios, intervalos espectrais definidos associados a funções químicas moleculares conhecidas (ácidos graxos, proteínas, amino-ácidos, açúcares, etc...) podem ser usados para comparar informações estruturais ou para determinar concentrações moleculares entre séries de amostras biológicas (Longas, et al., 2011).

Dentro da visão de um método de avaliação global a FT-IR associada à análise multivariada tem sido aplicada na discriminação de grupos ou populações através de técnicas de reconhecimento de padrões (Werner et al, 1998; Petibois, Délérís Cazorla, 2001)..

Na área de fisiologia do exercício a FT-IR associada à análise exploratória tem encontrado aplicações na avaliação global de adaptações metabólicas durante condicionamento físico (Petibois, Délérís, Cazorla, 2000; Petibois et al., 2002; Petibois, Délérís, 2003a; Petibois, Délérís, 2003b) e estresse oxidativo em eritrócitos (Petibois, Délérís, 2004; Petibois, Délérís, 2005) presentes em atividades de endurance.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação da espectroscopia no infravermelho de sangue total para diferenciar adaptações metabólicas e desempenho de atletas no ensaio ergoespirométrico de Bruce em relação ao sexo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia consistiu de um estudo transversal analítico descritivo, com desenho metodológico quantitativo. A amostra se compôs de um grupo de 12 atletas da equipe de Atletismo da UNISC, de diferentes modalidades (velocistas, meio-fundistas e fundistas), sendo seis do sexo masculino. Estes atletas aderiram voluntariamente a pesquisa, mediante termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo integra o projeto “Correlação entre perfil bioquímico sanguíneo e desempenho de atletas corredores no ensaio ergoespirométrico de Bruce e em provas específicas utilizando espectroscopia no infravermelho”, proposto e aprovado pelo Comitê de Ética pelo protocolo 2146/08.

Aos sujeitos foi recomendado dieta branda e descanso nas 24h prévias ao teste, sendo submetidos inicialmente à avaliação antropométrica, tensão arterial e frequência cardíaca de repouso. Em seguida, o atleta foi submetido à punção venosa cubital e realizado teste de esforço segundo ao protocolo de Bruce em esteira ergométrica e analisador de gases TEEM 100, avaliando o desempenho cardiorrespiratório a partir do volume do consumo de oxigênio ( $\text{VO}_2$ ), dióxido de carbono ( $\text{VCO}_2$ ), quociente respiratório (QR), frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA). Durante o ensaio, a frequência cardíaca foi verificada a cada 20 segundos com frequencímetro digital e a pressão arterial aferida a cada 3 minutos com esfigmomanômetro de coluna de mercúrio (Missouri). O teste de exercício foi realizado até a exaustão ou término do protocolo com 10 min de recuperação (pós-teste). Amostras de sangue

(5 mL) foram recolhidas da fossa cubital com *vacutainer* sem anticoagulante nos estágios pré-teste e pós-teste e da polpa digital com lanceta e micropipeta na transição entre dois estágios. Triplicatas de 5 µL de sangue foram recolhidas em tubos eppendorfs com 150 mg de KBr (VETEC, grau espectroscópico) nos estágios pré e pós-teste e simplicatas na transição entre dois estágios. As amostras de sangue foram liofilizadas (2h15min, 1x10<sup>-4</sup> torr) e introduzidas em acessório de reflectância difusa com fonte de luz monocromática (PIKE Technologies, Madison, USA) conectado a um espectrômetro Nicolet magna 550 FTIR (Thermo Nicolet Corporation, Madison, USA). Os espectros foram registrados entre 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> com uma resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup> e 32 varreduras.

Na análise por espectroscopia no infravermelho, os espectros foram normalizados (entre 0 e 1,0) e a média das áreas das bandas espectrais de cada atleta para os estágios pré- e pós-teste foram calculadas a partir do software OMNIC E.S.P 7.0 e correlacionadas com VO<sub>2</sub>máx e VCO<sub>2</sub>máx em software Excel 97-2003 via coeficiente de correlação de Pearson. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste-t bicaudado ao nível de significância de 95%

## RESULTADOS

Na Tabela 1 podem ser observadas as variáveis de caracterização antropométrica da amostra estudada. Os atletas, com idade média de 20,83 e 17,50 anos obtiveram resultados de IMC de 22,68 ± 2,26 kg/m<sup>2</sup> e 20,38 ± 3,16 kg/m<sup>2</sup>. Em relação aos sexos as médias de idade foram 22,7 ± 2,3 e 20,7 ± 3,9, para o sexo masculino e feminino respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em outros estudos a seguir descritos. Siqueira, *et al.* (2009), em estudo realizado com vinte maratonistas do sexo masculino com idade média de 35,5±10 anos, encontraram valores de IMC de 21 ± 1,2 kg/m<sup>2</sup>. Em relação ao sexo feminino, Nunes *et al.* (2009), em estudos realizado com 112 atletas de futsal com a idade, 22,1 ± 5,4 anos, encontraram o IMC de 22,3±1,9 kg/m<sup>2</sup> e percentual de gordura de 23,2 ± 5,1%.

A avaliação ergoespirométrica busca diferenciar o consumo de oxigênio entre os sexos, observando-se valores mais elevados de consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>) em atletas do sexo masculino quando comparadas com atletas do sexo feminino com médias de VO<sub>2</sub> máximo de 64,69 ± 16,97 e 49,99 ± 6,71 ml/Kg/min, respectivamente.

**Tabela 1** – Características da amostra de atletas que foram submetidos ao protocolo de Bruce em 2008.

Nº	Modalidade	Idade (anos)	IMC (kg.m <sup>-2</sup> )	VO <sub>2</sub> máx mL.Kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	VCO <sub>2</sub> máx mL.Kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>
<b>Atletas masculinos</b>					
01	Fundista	27	21,40	93,82	108,6
02	Fundista	17	25,14	52,59	52,84
03	Corredor (200 e 400 m)	21	25,02	55,73	61,16
04	Fundista	15	19,25	55,98	53,59
10	Corredor (100 e 200m)	17	22,03	*	*
12	Fundista	28	23,22	65,32	66,19
X(DP)		20,8(5,5)	22,7(2,3)	64,69(16,97)	68,48(23,10)
<b>Atletas femininos</b>					
05	Corredor 3.000 m com obst., 5.000 m e 10.000m	19	20,00	57,52	56,86
06	Corredor 400 m	18	20,62	*	*
07	Salto em distância	18	19,77	*	*
08	Meio-fundista	17	17,07	53,16	56,84
09	Fundista	15	18,52	46,99	49,00
11	Arremesso de peso	28	28,30	42,28	48,51
X(DP)		19,2(4,5)	20,7(3,9)	49,99(6,71)	52,80(4,68)

IMC: Índice de massa corpórea. M = masculino; F = feminino; X = média; DP = desvio-padrão. \*Não quantificado

No que se refere análise da espectrometria no infravermelho os espectros médios dos estágios pré- e pós-teste para os sexos encontram-se representados na Figura 1 e na Tabela 2 encontram-se as médias das áreas das bandas espectrais.

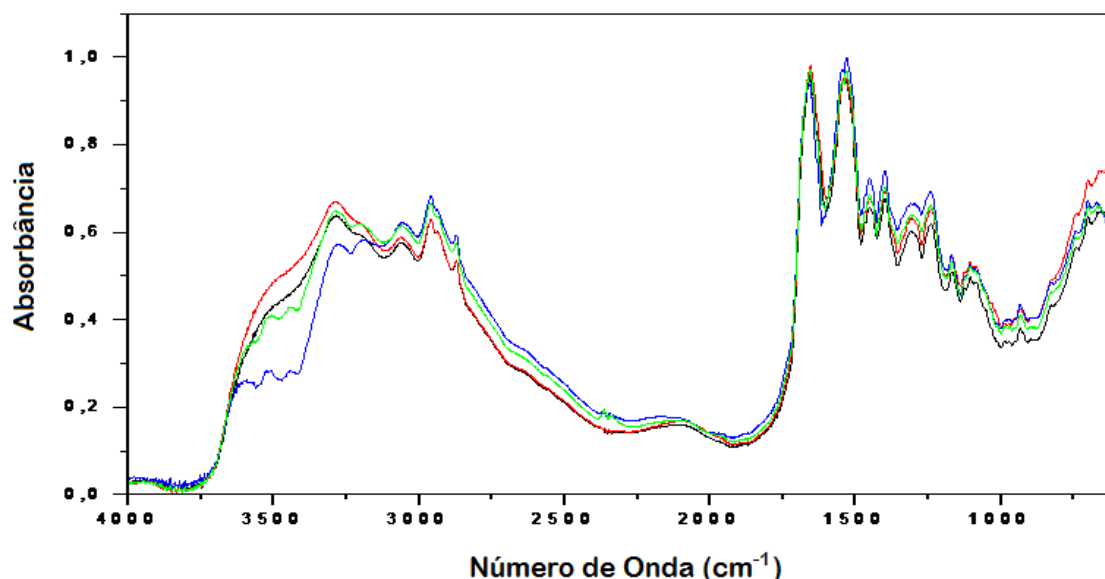


Figura 1: Espectros normalizados médios de FT-IR de sangue total liofilizado de seis atletas masculinos e seis femininos submetidos ao ensaio ergoespirométrico nos estágios pré- e pós-teste. (—): masculino, pré-teste; (—): masculino, pós-teste; (—): feminino, pré-teste; (—): feminino, pós-teste.

**Tabela 2** – Comparação em relação ao sexo entre médias de áreas de bandas de espectros FT-IR de sangue total liofilizado de atletas corredores do Projeto de Atletismo - UNISC nos estágios de pré- e pós-teste ergoespirométrico segundo protocolo de Bruce avaliados em 2008.

Banda	M Pré-T	F Pré-T	M Pós-T	F Pós-T	M x F Pré-T	M x F Pós-T	M Pré-T x Pós-T	F Pré-T x Pós-T
vN-H	121,12 (24,48)	72,94(32,44)	113,12 (39,97)	108,61 (8,12)	NS	NS	NS	NS
vO-H	181,69 (15,77)	152,34(32,96)	178,31 (23,96)	188,32 (8,41)	NS	NS	NS	NS
vC=CH	64,19 (7,26)	72,13(4,23)	67,95 (2,32)	75,08 (1,15)	S	S	NS	NS
v <sub>as</sub> C-H(CH <sub>3</sub> )	28,72 (1,06)	32,22(1,50)	29,62 (1,18)	33,06 (0,53)	S	S	NS	NS
v <sub>as</sub> C-H(CH <sub>2</sub> )	32,96 (0,98)	37,24(2,04)	34,10 (1,50)	38,47 (0,83)	S	S	NS	NS
v <sub>s</sub> C-H(CH <sub>3</sub> )	15,39 (0,65)	17,83(0,93)	16,03 (0,75)	18,12 (0,35)	S	S	NS	NS
v <sub>s</sub> C-H(CH <sub>2</sub> )	8,57 (0,33)	10,08(0,60)	8,98 (0,44)	10,20 (0,24)	S	S	NS	NS
vC=O	6,60 (0,35)	8,08(1,75)	7,06 (0,59)	7,39 (0,59)	S	S	NS	NS
vC=O(amida I)	107,43 (1,27)	106,09(4,74)	109,09 (2,39)	109,19 (1,29)	NS	NS	S	NS
δN-H (amida II)	82,13 (2,72)	87,98(0,55)	84,06 (3,42)	86,41 (1,79)	S	S	NS	S
vC-CH <sub>3</sub>	36,75 (1,37)	40,82 (1,64)	38,49 (2,26)	38,79 (2,47)	S	NS	NS	NS
v <sub>s</sub> C=O(COO <sup>-</sup> )	46,93 (1,20)	51,78 (3,34)	48,70 (1,75)	51,41 (2,74)	S	S	S	NS
Amida III	40,04 (1,88)	46,04 (2,43)	42,66 (3,68)	43,88 (2,48)	S	NS	NS	NS
v <sub>as</sub> P=O	17,28 (0,62)	19,39 (1,27)	18,43 (1,44)	18,27 (1,00)	S	NS	S	NS
vC-O I	29,42 (1,23)	31,69 (1,81)	31,64 (1,79)	30,60 (2,24)	S	NS	S	NS
vC-O II	8,83 (0,60)	9,27 (0,52)	9,62 (0,57)	9,23 (0,76)	NS	NS	NS	NS
vC-O III	14,05 (0,06)	15,04 (0,93)	15,09 (0,82)	13,79 (2,51)	S	NS	S	NS
vC-O IV	37,17 (1,54)	40,67 (3,55)	41,42 (3,90)	39,15 (3,76)	S	NS	S	NS

M = masculino; F = feminino. Desvio padrão em parênteses. Pré-T:Pre-teste; Pós-T: Pós-teste; NS: não significativo. S: p < 0,05; vN-H: 3700-3400 cm<sup>-1</sup>; vO-H: 3400-3110 cm<sup>-1</sup>; vC=C-H: 3110-2990 cm<sup>-1</sup>; v<sub>as</sub>C-H(CH<sub>3</sub>): 2990-2950 cm<sup>-1</sup>; v<sub>as</sub>C-H(CH<sub>2</sub>): 2950-2890 cm<sup>-1</sup>; v<sub>s</sub>C-H(CH<sub>3</sub>): 2890-2860 cm<sup>-1</sup>; v<sub>s</sub>C-H(CH<sub>2</sub>): 2860-2840 cm<sup>-1</sup>; vC=O: 1800-1760 cm<sup>-1</sup>; vC=O(amida I): 1760-1590 cm<sup>-1</sup>; δN-H (amida II): 1590-1490 cm<sup>-1</sup>; vC-CH<sub>3</sub>: 1490-1430 cm<sup>-1</sup>; v<sub>s</sub>C=O(COO<sup>-</sup>): 1430-1350 cm<sup>-1</sup>; Amida III: 1310-1240 cm<sup>-1</sup>; v<sub>as</sub>P=O: 1240-1220 cm<sup>-1</sup>; vC-O I: 1200-1140 cm<sup>-1</sup>; vC-O II: 1140-1120 cm<sup>-1</sup>; vC-O III: 1120-1090 cm<sup>-1</sup>; vC-O IV: 1090-1000 cm<sup>-1</sup>.

Observa-se que no pré-teste os valores médios das áreas das bandas espectrais masculinos são maiores que os femininos, excetuando-se as bandas  $\nu$ O-H,  $\nu$ N-H, e  $\nu$ C=O(amida I). No pós-teste, estas diferenças se concentraram apenas em movimentos vibracionais de ligação C-H de lipídios,  $\nu$ C=O e  $\nu_s$ C=O(COO<sup>-</sup>) de ácidos carboxílicos e ésteres acumulados como metabólitos (lactato, por exemplo) e  $\delta$ N-H(amida II) e amida III de proteínas. As bandas relativas à contribuição de carboidratos e de ésteres de fosfato não apresentaram diferenças significativas entre os sexos.

Considerando-se apenas o grupo de atletas masculinos, foram observadas diferenças significativas entre os estágios de pré-teste e pós-teste nas bandas  $\nu$ C=C-H,  $\nu$ C=O(amida I),  $\nu_s$ C=O(COO<sup>-</sup>),  $\nu_{as}$ P=O,  $\nu$ C-O I,  $\nu$ C-O II e  $\nu$ C-O IV. Foi observado aumento significativo nos após o teste para estas bandas, exceto para a banda  $\nu$ C=O(amida I). Já o grupo de atletas feminino apresentou espectros de infravermelho de sangue total com pouca variação entre os estágios de pré e pós-teste. Apenas a banda  $\delta$ N-H (amida II) apresentou diferenças significativas com relação ao aumento da área da banda espectral após o teste.

As alterações espectrais observadas nos dois diferentes estágios mostram haver diferenças entre os sexos que são maiores no estado de repouso. Estes resultados mostram que, após o ensaio, há diferentes padrões de adaptações entre os sexos, conduzindo um perfil sanguíneo no estágio pós-teste com maior similaridade entre os grupos em particular em relação à contribuição de metabólitos de bioenergética (derivados com ligação fosfodiéster e carboidratos).

Os atletas do sexo masculino, independente da modalidade, apresentam maiores modificações sanguíneas entre o estado de repouso e o estado pós-teste em relação às atletas do sexo feminino. o que indica maior gasto energético e maior retardo para readquirir homeostasia.

Estas alterações podem estar relacionadas com diferentes graus de hemoconcentração durante o ensaio além de diferentes capacidades de utilização de carboidratos e lipídeos no referido ensaio (POWERS, HOWLEY, 2000; MCARDLE, KATCH, KATCH, 2002). A FT-IR já tem sido usada com sucesso para prever alterações metabólicas durante condicionamento físico (PETIBOIS, DÉLÉRIS, CAZORLA, 2000; PETIBOIS et al., 2002; PETIBOIS, DÉLÉRIS, 2003a; PETIBOIS, DÉLÉRIS, 2003b) e estresse oxidativo em eritrócitos (PETIBOIS, DÉLÉRIS, 2004; PETIBOIS, DÉLÉRIS, 2005) e observadas em esportes de endurance. No trabalho aqui apresentado observa-se também a potencialidade deste método para encontrar diferenças entre sexos durante um teste de avaliação cardiorrespiratória.

A correlação univariada entre as áreas das bandas dos espectros do estágio pré-teste com  $VO_{2m\acute{a}x}$  e  $VCO_{2m\acute{a}x}$  foi investigada para atletas masculinos e femininos. Para os atletas masculinos,  $VO_{2m\acute{a}x}$  e  $VCO_{2m\acute{a}x}$  apresentaram a melhor correlação com a área da banda  $\nu$ C-O II (1140-1120  $cm^{-1}$ ) com  $r = 0,960$  e  $r = 0,971$ , respectivamente. Para as atletas do sexo feminino, a banda que melhor correlacionou com  $VO_{2m\acute{a}x}$  foi  $\nu$ C=C-H: 3110-2990  $cm^{-1}$  com  $r = 0,893$  e  $\nu$ C=C-H: 3110-2990  $cm^{-1}$  e com  $VCO_{2m\acute{a}x}$  foi  $\nu$ O-H: 3400-3110  $cm^{-1}$  com  $r = 0,786$ .

Estes resultados indicam um comportamento mais homogêneo e regular dos atletas masculinos quando submetidos ao teste ergoespirométrico segundo protocolo de Bruce. Neste caso, o desempenho está fortemente associado a contribuições de componentes energéticos do metabolismo de carboidratos. O desempenho de mulheres está fortemente associado ao metabolismo lipídico, porém necessitam de mais informação sanguínea através de combinações lineares de áreas de bandas espectrais. Entretanto, para confirmar esta hipótese é necessário aumentar o número de indivíduos para poder elaborar um modelo multivariado. Relações lineares entre bandas de espectros FT-IR e componentes bioquímicos já foram relatadas (Petibois et al., 2002; Longas et al., 2011).

## CONCLUSÃO

É possível concluir que a espectroscopia FT-IR apresenta sensibilidade ao nível de 95% de significância para diferenciar adaptações metabólicas e desempenho entre os sexos de atletas quando submetidos ao ensaio ergoespirométrico segundo protocolo de Bruce.

Agradecimentos a PUIC voluntário-UNISC, PROBITI-FAPERGS e CNPQ.

## REFERÊNCIAS

- LONGAS. M.O.; CHEAIRS. K.; PUCHALSKI. M.M.; PARK. J.I.. Reliability of fourier transform infrared spectroscopy in the characterization of human skin. *Advances in Biological Chemistry*. v.1, p. 24-28, 2011.
- NUNES, J. A. *et al.* Parâmetros antropométricos e indicadores de desempenho em atletas da seleção brasileira feminina de basquetebol. *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano*, v. 11, n. 1, p. 67-72, 2009.
- PETIBOIS. C.; DÉLÉRIS. G.; CAZORLA G. Perspectives in the utilisation of Fourier-transform infrared spectroscopy of serum in sports medicine: health monitoring of athletes and prevention of doping. *Sports Medicine*. v. 29, n. 6, p. 387-396, 2000.
- PETIBOIS. C.; CAZORLA. G.; GIN. H.; DÉLÉRIS. G. Differentiation of populations with different physiologic profiles by plasma Fourier-transform infrared spectra classification. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. v. 137, n.3, p. 184-90, 2001.
- PETIBOIS. C.; CAZORLA. G.; CASSAIGNE. A.; DÉLÉRIS. G.. Application of FT-IR spectrometry to determine the global metabolic adaptations to physical conditioning in sportsmen. *Appl. Spectrosc.* v. 56, n. 10, p. 1259-1267, 2002.
- PETIBOIS. C.; DÉLÉRIS. G. Stress-induced plasma volume change determined using FT-IR spectra. *Applied Spectroscopy*. v. 57, n.4, p. 396-399, 2003a.
- PETIBOIS. C.; DÉLÉRIS. G. 2D-FT-IR spectrometry: a new tool for the analysis of stress-induced plasma content changes. *Vibrational Spectroscopy*. v. 32. n.1. p. 117-128. 2003b.
- PETIBOIS. C.; DÉLÉRIS. G. Oxidative stress effects on erythrocytes determined by FT-IR spectrometry. *Analyst*. v. 129, n. 10, p. 912-916, 2004.
- PETIBOIS. C.; DÉLÉRIS. G. Evidency that erythrocytes are highly susceptible to exercise oxidative stress: FT-IR spectrometric studies at the molecular level. *Cell Biology International*. v. 29, n.8, p. 709-716, 2005.
- SIQUEIRA, L. O. *et. al.* Análise de parâmetros bioquímicos séricos e urinários em atletas de meia maratona. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 53, n.7, p. 844-852, 2009.
- WANG. L.; MIZAIKOFF. B. Application of multivariate data-analysis techniques to biomedical diagnostics based on mid-infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v.391, n.5, p. 1641-1654, 2008.
- WERNER. G.H.; FREUH. J.; KELLER. F.; GREGER. H.; SOMORJAI. R.; DOLENKO B.. *et al.* Mid infrared spectroscopy as tool for disease pattern recognition from human blood. *Proceedings of SPIE*. v. 3257, p. 35-41, 1998.

## AUTOR CORRESPONDENTE

Valeriano Antonio Corbellini  
Avenida Independência, 2293  
Bairro Universitário – CEP: 96.815-900  
Santa Cruz do Sul – RS  
UNISC, Educação Física, bloco 42, sala 4207  
valer@unisc.br  
(51) 3717-7604