DIFERENCIAÇÃO DE ATLETAS CORREDORES NA ADAPTAÇÃO METABÓLICA AO ENSAIO ERGOESPIROMÉTRICO DE BRUCE: UMA ABORDAGEM POR DRIFTS EM RELAÇÃO AO GÊNERO

VITOR ESTEVAM SEVERO, GUILHERME GÖRGEN DA ROCHA, 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 no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) tem emergido nos últimos anos como um método analítico com grande variedade de aplicações tanto na área biomédica **(**ELLIS, GOODACRE 2006**;** SHAW; MANTSCH 2006; WANG**;** MIZAIKOFF 2008) como na área esportiva (DESGORCES; TESTA; PETIBOIS 2008; BENEZZEDDINE-BOUSSAIDI et. al. 2008). Sua grande vantagem como técnica analítica está amparada no fato de ser uma ferramenta que não necessita reagentes específicos para diferente analitos, e que, devido à possibilidade de automatização, permite a análise de um grande número de amostras. Outro ponto muito vantajoso desta técnica é a utilização de pequenos volumes de amostras tornando as coletas minimamente invasivas a atletas e\ou pacientes (PETIBOIS; DÉLÉRIS 2003b).

A 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. 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).

Neste contexto, o objetivo deste estudo 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 34 atletas corredores (12 em 2008, 14 em 2009 e 8 em 2010) da equipe de Atletismo da UNISC, de diferentes modalidades (velocistas, meio-fundistas e fundistas). Estes atletas aderiram voluntariamente à pesquisa, mediante termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo integrou 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

(VO_2), dióxido de carbono (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 3 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, $1x10^{-4}$ 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) ou FT-IR-FT-NIR Spectrometer (Perkin Elmer®). Os espectros foram registrados entre 4000 a 600 cm^{-1} com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} e 16 pulsos de varreduras.

Na análise por espectroscopia no infravermelho, os espectros foram normalizados (entre 0 e 1,0) e armazenados em software OMNIC E.S.P versão 7.0. Os dados espectrais (intensidade de absorbância para uma dada frequência associadas a bandas específicas, Tabela 1, para os espectros médios) para os três anos foram analisados estatisticamente após aplicação de teste T de Student, segundo as seguintes categorias:

- sexo masculino versus sexo feminino para o estágio de pré-teste;
- sexo masculino versus sexo feminino para o estágio de pós-teste;

Tabela 1 – Bandas e respectivos movimentos vibracionais utilizados para descrição dos espectros de reflectância difusa no infravermelho com Transformada de Fourier de sangue total.

N°	Região espectral (cm^{-1})	Atribuição
1	3700-3400	νO-H (stO-H) = estiramento axial de grupo hidroxila
2	3400-3110	νN-H (stN-H) = estiramento axial de grupo amina
3	3110-3000	νC=C-H (stC=C-H) = estiramento axial de ligação C-H de grupo vinila
4	2990-2950	ν_{as}C-H (st_{as}C-H) = estiramento axial assimétrico de ligação C-H de grupo metila
5	2950-2890	ν_{as}C-H (st_{as}C-H) = estiramento axial assimétrico de ligação C-H de grupo metileno
6	2890-2860	ν_sC-H (st_sC-H) = estiramento axial simétrico de ligação C-H de grupo metila
7	2860-2840	ν_sC-H (st_sC-H) = estiramento axial simétrico de ligação C-H de grupo metileno
8	1800-1760	νC=O (stC=O) = estiramento axial de grupo carbonila de ácidos carboxílicos
9	1760-1590	νC=O (stC=O) = estiramento axial de grupo carbonila, amida I
10	1590-1490	δN-H ($_{ang}$N-H) = deformação angular de grupo amida, amida II, banda de tirosina
11	1490-1430	νC-CH_3 (stC-CH_3) = estiramento axial assimétrico de ligação C-H de grupo metileno
12	1430-1350	ν_sC=O (st_sC=O) = estiramento axial simétrico de grupo carbonila de grupo carboxilato
13	1310-1240	amida III
14	1240-1220	ν_{as}P=O (st_{as}P=O) = estiramento axial assimétrico de grupo $>PO_2^-$ de fosfodiéster
15	1200-1140	νC-O (stC-O) = estiramento axial e deformação angular de grupo C-O-C, C-O, C-O-P de carboidratos e derivados fosfoforilados
16	1140-1120	νC-O (stC-O) = estiramento axial e deformação angular de grupo C-O-C, C-O, C-O-P de carboidratos e derivados fosfoforilados
17	1120-1090	νC-O (stC-O) = estiramento axial e deformação angular de grupo C-O-C, C-O, C-O-P de carboidratos e derivados fosfoforilados
18	1090-1000	νC-O (stC-O) = estiramento axial e deformação angular de grupo C-O-C, C-O, C-O-P de carboidratos e derivados fosfoforilados

FONTE: NAUMANN, 2000.

RESULTADOS

Os dados referentes aos atletas avaliados encontram-se na Tabela 2. Além da identificação dos atletas na tabela incluem o ano da avaliação, modalidade do atleta, idade em anos e dados antropométricos como peso e altura sintetizados em forma de IMC (índice de massa corporal).

Tabela 2 - Dados dos atletas que foram submetidos ao protocolo de Bruce realizado em 2008, 2009 e 2010.

	Nº	Modalidade	Idade (anos)	IMC ($kg.m^{-2}$)
		Atletas masculinos		
2008	**01**	Fundista	27	21,40
	02	Velocista (100 a 200m)	17	25,14
	03	Velocista (200 a 400m)	21	25,02
	04	Fundista	15	19,25
	10	Velocista (100 a 200m)	17	22,03
	12	Fundista	28	23,22
2009	**01**	Fundista	16	18,13
	02	Velocista (100 e 200 m)	18	22,12
	03	Marcha Atlética	19	20,88
	04	Fundista	16	19,04
	05	Fundista	29	22,62
	08	Fundista	29	22,04
	11	Fundista	14	21,84
2010	**01**	Fundista	17	21,08
	02	Velocista (100 e 200 m)	30	22,36
	03	Marcha Atlética	20	22,34
	04	Fundista	19	21,93
	05	Fundista	29	23,02
	06	400 m	19	23,07
	ȳ(DP)		21,05(5,59)	21,92(1,78)
		Atletas femininos		
2008	**05**	Fundista 3.000m c barreiras	19	20,00
	06	Velocista (400m)	18	20,62
	07	Salto em distância e triplo	18	19,77
	08	Meio-fundista	17	17,07
	09	Fundista	15	18,52
	11	Arremesso de peso	18	26,30
2009	**06**	400 m	19	21,32
	07	Salto em distância e triplo	20	21,12
	09	Fundista	16	18,9
	10	Arremesso de peso	19	28,2
	12	Meio-fundista	19	16,60
	13	Marcha Atlética	21	22,31
	14	Fundista	34	19,71
2010	**07**	Salto em distância e triplo	35	20,11
	08	Fundista	19	16,44
	ȳ(DP)		20,47(5,89)	20,47(3,26)

LEGENDA: IMC: Índice de massa corpórea. M = masculino; F = feminino. ȳ = média; DP = desvio-padrão.

Diferenças significativas entre os estágios foram observadas entre atletas masculinos e femininos antes de iniciar o ensaio ergoespirométrico de Bruce nos três anos da realização da coleta. Em 2008 as faixas espectrais com estas características foram mais extensas, compreendendo as regiões de 3075 a 2950 cm^{-1}, de 2910 a 2660 cm^{-1}, de 1750 a 1685 cm^{-1}, de 1590 a 1550 cm^{-1}, de 1530 a 1160 cm^{-1} e de 1075 a 1065 cm^{-1}. Já em 2009, faixas espectrais com diferenças significativas foram observadas nas regiões de 3370 a 3230 cm^{-1}, de 2390 a 2160 cm^{-1} e de 1460 a 1445 cm^{-1}**.** Em 2010, as faixas espectrais com $p< 0,05$ foram as faixas espectrais de 3225 a 3150 cm^{-1}, de 3140 a 3135 cm^{-1}, de 2960 a 2950 cm^{-1}. Além disso, pode se observar que para os anos de 2008 e 2009 uma faixa em comum com diferença significativa é a que compreende uma faixa de 1460 a 1445 cm^{-1}. Já em comparação com 2008 e 2010, nota-se semelhança nas faixas espectrais com $p<0,05$ de 3060 a 2950 cm^{-1} e comparando 2009 e 2010 não existem faixas espectrais com $p<0,05$ em comum.

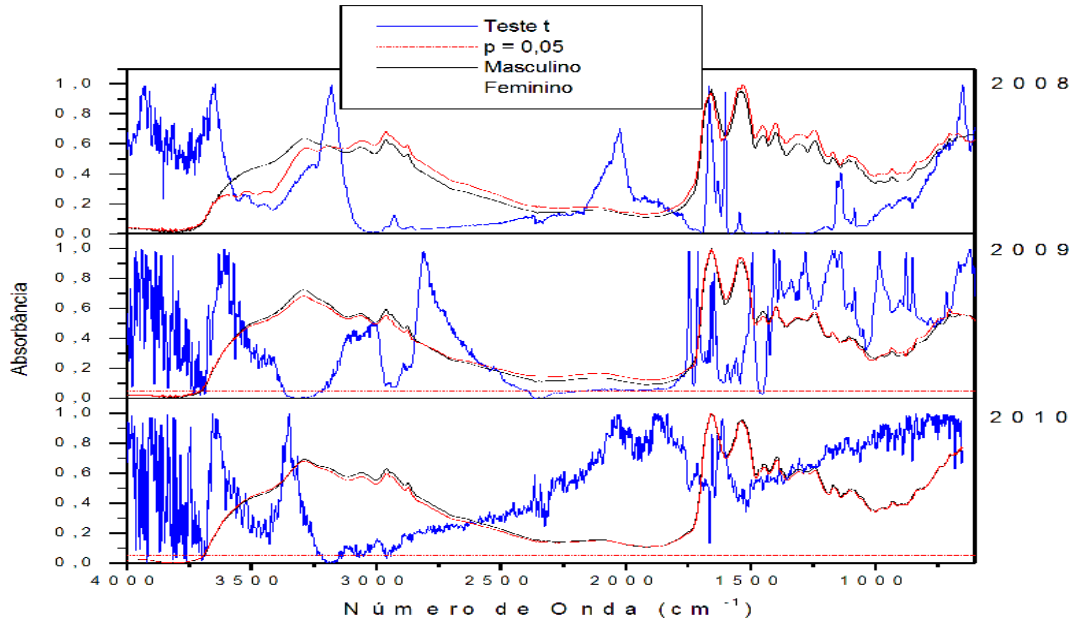

Figura 1: Espectros médios de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de sangue total de atletas masculinos e femininos no estágio de repouso (antes do ensaio ergoespirométrico de Bruce) com respectivos valores de p segundo teste t em função da frequência para os anos de 2008, 2009 e 2010.

Diferenças significativas também foram encontradas entre os sexos após a fase de recuperação do ensaio ergoespirométrico, nos três anos da realização da coleta, sendo que em 2009 foram mais amplas as faixas espectrais que apresentaram diferenças significativas. Em 2008, foram significativas as faixas espectrais de 2895 a 2375 cm^{-1} e de 2290 a 2260 cm^{-1}**.** Já em 2009, as faixas espectrais com diferenças significativas compreende a faixa espectral de 2460 a 1785 cm^{-1} e de 1630 a 1575 cm^{-1} de 1545 a 1540 cm^{-1}.Em 2010, as faixas espectrais com $p<0,05$ foi que compreendeu de 3685 a 3180 cm^{-1}. Somando-se a isso pode se observar que para os anos de 2008 e 2009 uma região com diferença significativa em comum é a que compreende uma faixa de 2290 a 2260 cm^{-1}, já em comparação 2008 e 2010/2009 e 2010 não nota-se semelhança nas regiões com $p<0,05$.

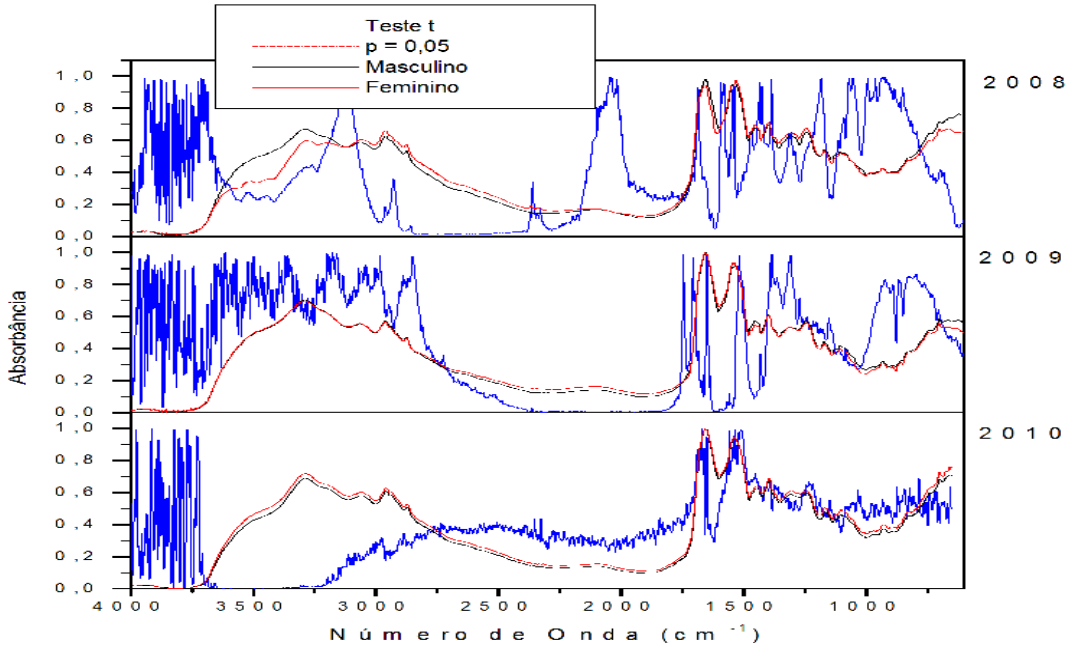

Figura 2: Espectros médios de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de sangue total de atletas masculinos e femininos no estágio de recuperação (após ensaio ergoespirométrico de Bruce) com respectivos valores de p segundo teste t em função da frequência para os anos de 2008, 2009 e 2010.

Sendo assim, partindo dos espectros dos atletas em repouso, e comparando atletas nota-se muitas diferenças que mostram características fisiológicas já registrada em literatura. Em 2008, observa-se a diferença significativa entre homens e mulheres nas regiões de 3050 a 2950 cm^{-1} e de 2900 a 2700 cm^{-1} bem como de 1750 a 1700 cm^{-1}, referentes a absorções de triacilgliceróis, ácidos graxos livres e ésteres de colesterol, encontrando-se mais elevados nas mulheres. Este comportamento reflete uma característica fisiológica das mulheres por acumularem mais gordura que homens e por isso pode ser uma resposta aceitável como adaptação diferenciada durante a atividade. Ainda acerca dessas faixas espectrais nota-se que em 2009 e 2010 há indícios que com maior número de representantes femininas essas faixas também poderiam se mostrar significativas (PETIBOIS et. al. 2001).

Ainda na região de 1300 a 1200 cm^{-1} é visível uma diferença significativa apontando que mulheres apresentam maior quantidade de carboidratos no pré-teste em relação aos homens.

No repouso, no entanto, não foram observadas muitas diferenças entre atletas dos dois gêneros, a não ser a faixa que indica a presença de água, o que mostrou que atletas masculinos apresentam uma maior redução na presença de água no sangue, sendo uma possível explicação a movimentação do liquido para os músculos e devido a maior quantidade de músculos presente em homens eles apresentam essa resposta. Além dessa adaptação nota-se em 2009, diferenças significativa na faixa espectral de 1650 a 1450 cm^{-1}, que compreendem as proteínas, indicando um nível aumentando nas atletas femininas. No entanto, essas poucas diferenças nos induzem a dizer que no pós-teste os atletas masculinos e as atletas femininas possuem caracterizas muito semelhante, ou seja no estágio pré-teste as características são bem distintas entre os atletas e no estágio pós-teste as adaptações fisiológicas e bioquímicas tendem a se tornar similares.

CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados é possível concluir que a espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) é suficientemente sensível para avaliação

da adaptação de atletas durante o ensaio ergoespirométrico de Bruce, além de ser possível observar particularidades à cerca dos diferentes gêneros dos atletas.

Soma-se ainda a facilidade de uso, a velocidade, a confiabilidade aliada à sensibilidade espectral e um volume de amostra relativamente pequeno o que a torna uma técnica favorável para a área de fisiologia do exercício e medicina desportiva.

REFERÊNCIAS

BENEZZEDDINE-BOUSSAIDI, L.; CAZORLA, G.; GUEZENNEC, C,-Y.; FONTAND, E.; BURNAT, P. Contrôle biologique de l'entraînement sportif par spectrométrie IR-TF Biological control of sport training by spectrometry FT-IR. *Science & Sports,* 23(6) 283–291, 2008.

DESGORCES, F.D.; TESTA, M.; PETIBOIS, C. Training-level induced changes in blood parameters response to on-water rowing races*. Journal of Sports Science and Medicine* 7**,** 425-430, 2008.

ELLIS D.I.; GOODACRE, R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman*. The Analyst*, 131(8):875–885, 2006.

ESCANDAR, G. M.; DAMIANI, P.C.; GOICOECHEA, H.C.; OLIVIERI A.C. A review of multivariate calibration methods applied to biomedical analysis. *Microchemical Journal*, 82(1):29-42, 2006.

PETIBOIS, C.; CAZORLA, G.; CASSAIGNE, A.; DÉLÉRIS, G. Application of FT-IR spectrometry to determine the global metabolic adaptations to physical conditioning in sportsmen. *Appied Spectroscopy,* 56(10):1259-1267, 2002.

PETIBOIS, C.; CAZORLA, G.; GIN, H.; DÉLÉRIS, G. L'étiologie clinique du surentraînement au traversde l'examen sanguin : état des connaissances. La Revue de Médecine Interne,22(8):723-736, 2001.

PETIBOIS, C.; CAZORLA, G.; POORTMANS, J.R.; DÉLÉRIS, G. Biochemical aspects of overtraining in endurance sports: the metabolism alteration process syndrome. *Sports Medicine,* 33(2):83-94, 2003.

PETIBOIS, C.; DÉLÉRIS, G. Stress-induced plasma volume change determined using FT-IR spectra. *Applied Spectroscopy,* 57(4):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,* 32(1):117-128, 2003b.

PETIBOIS, C.; DÉLÉRIS, G. Oxidative stress effects on erythrocytes determined by FT-IR spectrometry*. Analyst* 129(10):912-916, 2004a.

PETIBOIS, C.; DÉLÉRIS G. Alterations of lipid profile in endurance over-trained subjects. *Archives of Medical Research*, 35(6):532-539, 2004b.

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.* 29(8):709-716, 2005.

SHAW, A.; MANTSCH, H. Infrared spectroscopy in clinical and diagnostic analysis. *Enciclopedia of Analytical Chemistry.*1-20, 2006.

WANG, L.; MIZAIKOFF, B. Application of multivariate data-analysis techniques to biomedical diagnostics based on mid-infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 391(5):1641-1654, 2008.

Valeriano Antonio Corbellini
Avenida Independência. 2293
Bairro Universitário – CEP: 96.815-900
Santa Cruz do Sul – RS
valer@unisc.br
(51)3717-7604