DIFERENCIAÇÃO DE ATLETAS CORREDORES NA ADAPTAÇÃOMETABÓLICAAO ENSAIO ERGOESPIROMÉTRICO DE BRUCE: UMA ABORDAGEM POR DRIFTS EM RELAÇÃO AO ESTÁGIO DO TESTE

GUILHERME GÖRGEN DA ROCHA, VITOR ESTEVAM SEVERO, MIRIAM BEATRIS RECKZIEGEL, VALERIANO ANTONIO CORBELLINI, HILDEGARD HEDWIG POHL

Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil
valer@unisc.br

INTRODUÇÃO

O espectro de infravermelho situa-se entre o espectro da luz visível e o das microondas (entre 1 e 1.000 µm). A região de maior utilidade para análise qualitativa está situada entre 4.000 e 400 cm^{-1} e é conhecida como infravermelho médio (MIR) (Wang, Mizaikoff, 2008).A espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) vem sendo cada vez mais aprimorada por ser uma ferramenta muito útil para o monitoramento do plasma ou sangue "in natura", pois permite a determinação simultânea de vários marcadores bioquímicos em um único espectro de plasma, bem como, uma pequena quantidade de sangue, o equivalente a uma alíquota extraída da polpa digital.Além disso, permitem estimar a concentração de biomoléculas que possam ter relação a dados clínicos. Portanto, este método permite uma visão global do organismo humano (DÉLÉRIS, PETIBOIS, 2004a).

Os esportes de maneira geral movem cifras inestimáveis de dinheiro no qual uma parcela considerável esta envolvida no melhoramento do condicionamento físico e nas técnicas de treinamentos dos atletas. Sendo assim, muitas pesquisas buscam o aprimoramento nas tecnologias para aperfeiçoar o desempenho dos esportistas. Dentre estas, a FT-IR tem-se mostrado sensível na avaliação de algumas patologias ocasionadas pelo esporte como estresse oxidativo(DÉLÉRIS; PETIBOIS 2004a), e *overtrainning*(PETIBOIS,DÉLÉRIS, 2005), bem como quantificação de parâmetros bioquímicos (LAFRANCE, LANDS, BURNS, 2004; DÉLÉRIS, PETIBOIS 2004b; PETIBOIS et. al. 2004) e avaliação de padrões de treinamento de atletas. (PETIBOIS, DÉLÉRIS, CAZORLA, 2000; BENEZZEDDINE-BOUSSAIDI et. al. 2008). A FT-IR ligada ao esporte já deixou de ser uma aposta, no entanto muito ainda tem a se pesquisar a cerca dessa tecnologia no esporte, pois é uma ferramenta que pode vir gerar bons frutos.

Sendo assim o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação da espectroscopia no infravermelho de sangue total para diferenciar adaptações metabólicas intragenéricas de atletas corredores no ensaio ergoespirométrico de Bruce em relação ao estágio do ensaio.

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), 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 (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 (ThermoNicolet Corporation, Madison, USA) ou espectrofotômetro no Infravermelho marca/modelo Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer (Perkin Elmer®). Os espectros foram registrados com 16 pulsos de varredura, respectivamente, na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} com uma resolução espectral de 4 cm^{-1}.Em seguida, 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 de gênero:

- sexo masculino, estágio pré-teste versus estágio pós-teste;
- sexo feminino, estágio pré-teste versus estágio 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 atletasna tabelaincluem 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
	$\bar{y}$(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.

A análise do perfil de espectros de infravermelhos médio dos atletas masculinos no estágio pré-teste (repouso) e pós-teste (recuperação, Figura 1) evidencia a presença de alterações significativas ao lado de algumas semelhanças em determinadas regiões espectrais.

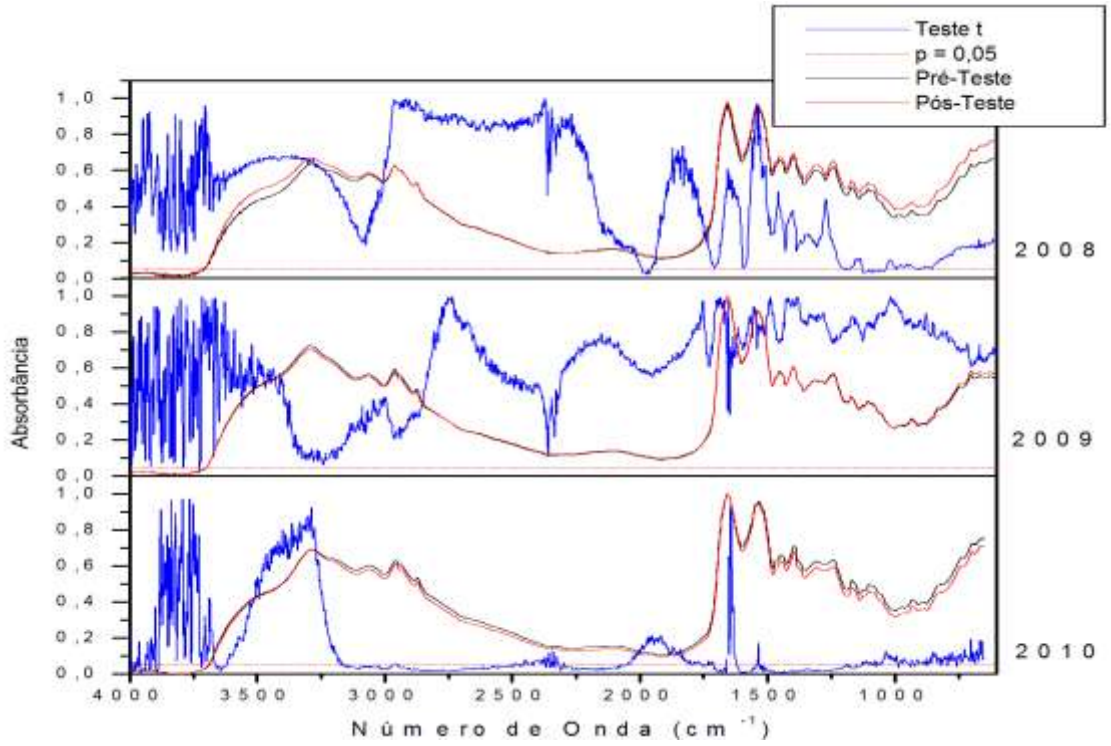

Figura 1: Espectros médios de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de sangue total de atletas masculinos no estágio de repouso (pré-teste) e após ensaio de Bruce (pós-teste) com respectivos valores de p segundo teste t em função da frequência para os anos de 2008, 2009 e 2010.

Foram observadas maiores diferenças entre os dois estágios nos anos 2008 e 2010 sendo que o último apresentou inúmeras regiões com diferenças significativas. Em 2008 estas diferenças ocorreram nas faixas espectrais de 1995 a 1950 cm^{-1} de 1190 a 1180 cm^{-1} e de 1125 a 1035 cm^{-1}. Já em 2010 as faixas espectrais foram as regiões de 3660 a 3620 cm^{-1}, de 3170 a 2970 cm^{-1}, de 2950 a 2490 cm^{-1}, de 2315 a 2050 cm^{-1}, de 1710 a 1660 cm^{-1}, de 1620 a 1540 cm^{-1}, de 1530 a 1130 cm^{-1}. Somando-se a isso pode se observar que em 2008 e 2010 a regiãoque compreende de 1190 a 1180 cm^{-1} foi comum aos dois anos, sendo que nos outros anos não existiram semelhanças em áreas diferenciadas.

Comparando-se os espectros dos atletas masculinos nos estágios de pré-teste e pós-teste, coletados no durante três anos, observaram-se varias diferenças significativas. Em 2010, houve redução na região de absorção dos lipídios e dos carboidratos comparando-se pré-teste com pós-teste, indicando ocorrência de adaptações fisiológicas aliadas ao consumo de fontes energéticas.Houve também alteração na região de lipídios como colesterol, ésteres de colesterol, ácidos graxos livres assim como triacilgliceróis, que compõem o perfil lipídico do atleta podendo-se mencionar a ocorrência de uma mobilização de lipídios durante o exercício, compondo um trabalho aeróbico durante o teste. Outro ponto a salientar refere-se à faixa das proteínas, região de 1600 a 1480 cm^{-1} do espectro, em que pode-se inferir que possivelmente

houve um processo de hemoconcentração com o ensaio, resultando em um aumento no hematócrito e consequentemente das proteínas totais. Assim como, nessa mesma região do espectro mostrou-se a presença de intensidade aumentada de deformações de proteínas α-hélice, que estão associadas à presença de grande quantidade de hemoglobina e mioglobina, portanto, pode-se concluir que devido ao esforço e ao processo de estresse oxidativo, houve rabdomiólise, que por sua vez liberará na corrente sanguínea a mioglobina (PETIBOIS et. al. 2001; PETIBOIS et. al. 2002;PETIBOIS; DÉLÉRIS 2004a)

A faixa dos sacarídeos, região de 1200 a 1150 cm^{-1} do espectro, encontra-se nos testes dos anos de 2008 e 2010,contudo de maneiras distintas. Em 2008, mostra-se que no pós-teste houve um aumento nessa região, as explicações podem estar associadas a um possível aumento da glicemia de inicio da atividade, em que o corpo ainda esta mobilizando glicogênio do fígado e, consequentemente, glicose para os músculos. Em 2010, a resposta foi a redução da região dos glicídios no pós teste, sendo nesse momento aceitável dizer que houve a redução da glicemia.Ainda na amostra de 2010, nota-se uma diferença na região próxima de 1190 a 1180 cm^{-1}, que compreende o lactato, podendo ser um indício que houve trabalho anaeróbico.Uma justificativa para essa abordagem pode estar atrelada às fases de treinamento de pré-temporada, nas quais os atletas não estavam bem adaptados ao treino, em que se encontravam nos períodos da coleta em 2010, condizendo com um índice de VO_2 reduzido. Por isso, em 2008, por estarem em fase de treinamento mais avançado, houve aumento da glicemia, realização trabalho aeróbico e um índice de VO_2 aumentado (PETIBOIS et. al. 2001; LAFRANCE; LANDS; BURNS 2004; PETIBOIS; DÉLÉRIS 2004b; PETIBOIS; DÉLÉRIS 2005).

Para as atletas femininas (Figura 2), nos três anos da realização da coleta as faixas espectrais que apresentaram diferenças significativas foram mais numerosas em 2010. Em 2008, foram significativas as faixas espectrais de 1550 a 1530 cm^{-1}. E em 2010, as faixas espectrais com $p<0,05$ foram asfaixas de 3400 a 3230 cm^{-1}. Além disso, não se pode observar em nenhum dos anos da coleta faixas espectrais com diferenças significativa em comum.

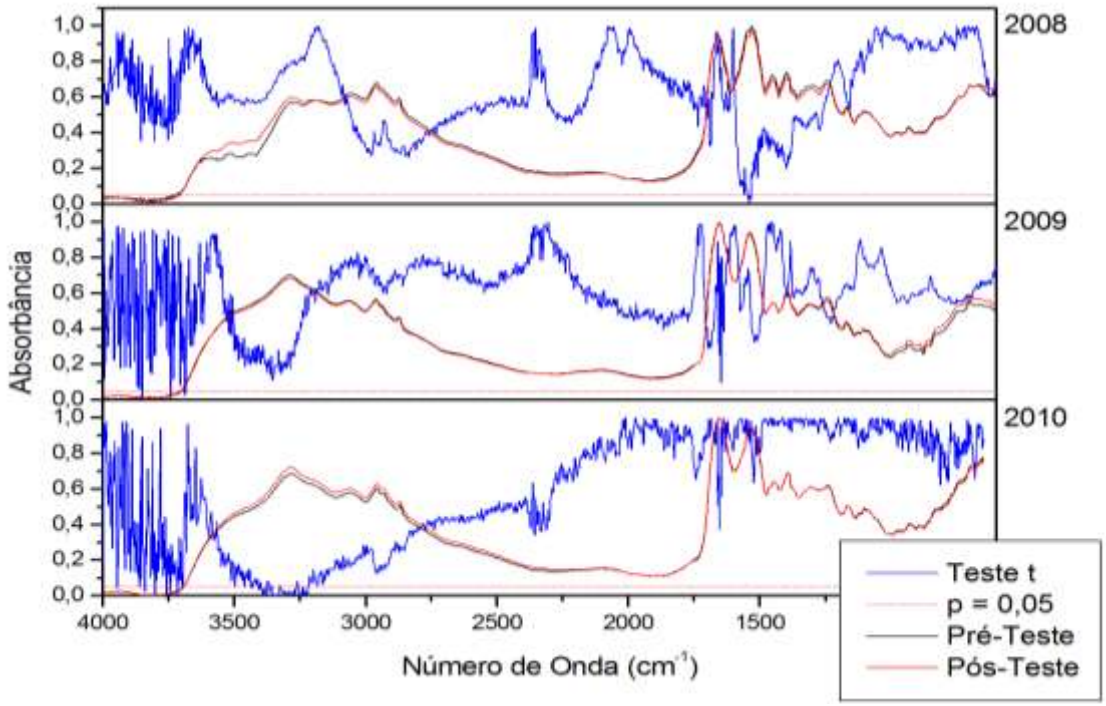

Figura 2: Espectros médios de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier de sangue total de atletas femininos no estágio de repouso (pré-teste) e após ensaio de Bruce (pós-teste) com respectivos valores de p segundo teste t em função da frequência para os anos de 2008, 2009 e 2010.

Seguindo o nosso estudo foram analisados os espectros de atletas femininas nos mesmos estágios que os atletas masculinos (pré- e pós-teste). No entanto, observou-se que não houve, em nenhum dos períodos, muitas diferenças nos estágios de pré- e pós-teste, o que nos induziu a uma resposta que quando se tratado de atletas femininas, as alterações fisiológicas e bioquímicas são pouco aparentes, nos levando a crer que ou elas são pouco impactadas pelos exercício, ou elas possuem uma rápida recuperação aos impactos causados pelo mesmo. No entanto, na faixa espectral de próxima de 1550 a 1540 cm^{-1}, que compreendem as proteínas, observaram-se diferenças significativas ($p<0,05$) no ano de 2008, sendo que no estágio pré-teste apresentou-se com maior intensidade do que em relação ao pós-teste, indicando uma possível depleção das proteínas.Além disso, ainda se mostrou em 2009 e 2010 indicativo que com um "n" maior pode se tornar uma área com diferenças significativas. Uma possível explicação seria que nessa região ocorreu uma redução na absorbância no pós- teste em função de mobilização de energia via aminoácidos das proteínas, reduzido a quantidade de proteínas sanguíneas através da gliconeogênese (PETIBOIS et. al. 2001).

CONCLUSÃO

A espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) mostrou ser suficientemente sensível para avaliação intragenérica da adaptação de atletas durante o ensaio ergoespirométrico de Bruce, possibilitando a caracterização de particularidades entre os gêneros.Dessa forma, é extremamente oportuna a utilização de equipamentos de infravermelho e consequentemente da FT-IR para avaliação de adaptação metabólica durante um exercício físico.

REFERÊNCIAS

BENEZZEDDINE-BOUSSAIDI, L.; CAZORLA, G.; GUEZENNEC, C,-Y.; FONTAND, E.; BURNAT, P. Contrôlebiologique de l'entraînementsportif 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.

DUNN, W.B..; ELLIS, D.I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies.*Trends in Analytical Chemistry*, 24(4):285-294, 2005.

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.

LAFRANCE, D.; LANDS, C.L.; BURNS, D.H.In vivo lactate measurement in human tissue by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy.*Vibrational Spectroscopy* 36(2): 195–202, 2004.

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 dusurentraînementautraversdel'examensanguin : étatdesconnaissances. La Revue de MédecineInterne,22(8):723-736, 2001.

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.
PETIBOIS, C.; DELERIS, G.; CAZORLA, G. Perspectives in the utilisation of Fourier-transform infrared spectroscopy of serum in sports medicine: health monitoring of athletes and prevention of dopping. *Sports Medicine,* 29(6):387-396, 2000.
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.*AnalyticalandBioanalyticalChemistry,* 391(5):1641-1654, 2008.

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