

## Avaliação do ácido láctico intramuscular através da espectroscopia Raman: novas perspectivas em medicina do esporte\*

Fabiano de Barros Souza<sup>1</sup>, Marcos Tadeu T. Pacheco<sup>2</sup>, Antônio B. Vila Verde<sup>2</sup>, Landulfo Silveira Jr.<sup>2</sup>, Rodrigo L. Marcos<sup>1</sup> e Rodrigo Alvaro B. Lopes-Martins<sup>1</sup>

### RESUMO

O uso da espectroscopia Raman no infravermelho pode vir a constituir uma nova técnica para avaliação física, permitindo medidas da concentração de ácido láctico em sangue e em músculo esquelético, por um método não invasivo. A espectroscopia Raman é uma técnica que oferece grande riqueza de detalhes provida pela vibração de moléculas em diferentes níveis de energia. Em estudos prévios, foram obtidos espectros Raman de ácido láctico em plasma humano e em sangue de rato, onde os picos característicos foram observados claramente na matriz biológica. No presente estudo a espectroscopia Raman foi usada para a identificação de ácido láctico em músculo tibial de rato. Foi usado um *laser* de Ti:safira sintonizado em 830nm, um espectrômetro *Kaiser f/1.8* e um detector de CCD refrigerado. O espectro Raman do ácido láctico apresenta oito picos bem distintos, entre 700 e 1.500 $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo aos diferentes modos de vibração da molécula do ácido láctico. O pico principal em 830 $\text{cm}^{-1}$  foi usado para caracterizar a presença do ácido láctico no músculo tibial de rato. Foram analisados espectros Raman de músculos tibiais *in vivo* e *in vitro*. Além disso, também foi monitorada a difusão do ácido láctico através do músculo, *in vitro*. Pode-se concluir, a partir dos resultados obtidos, que a espec-

troscopia Raman no infravermelho próximo apresenta grande potencial para, no futuro, com o aperfeiçoamento da técnica, ser utilizada em avaliações físicas com o intuito de permitir medições das concentrações de ácido láctico no músculo esquelético, através de metodologia não invasiva.

**Palavras-chave:** Ácido láctico. Espectroscopia Raman. Músculo tibial de rato.

### RESUMEN

**Evaluación de ácido láctico intra-muscular a través de espectroscopia Raman: novas perspectivas en medicina del deporte**

*El uso de la espectroscopia Raman de infrarojo puede constituir una nueva técnica para la evaluación física, permitiendo medidas de la concentración de ácido láctico en sangre y en músculo esquelético, por un método no invasivo. La espectroscopia Raman es una técnica que ofrece una gran riqueza de detalles provista por la vibración de las moléculas en diferentes niveles de energía. En estudios previos, se obtuvieron espectros Raman de ácido láctico en plasma humano e en sangre de ratón, donde los picos característicos se observaron claramente en la matriz biológica. En el presente el estudio de la espectroscopia Raman ha sido usado para la identificación de ácido láctico en el músculo tibial del ratón. Se utilizó un *laser* de Ti:Safiro sintonizado en 830nm, un espectrómetro *Kaiser f/1.8* y un detector de CCD refrigerado. El espectro Raman de ácido láctico presenta ocho picos bien distintos, entre 700 e 1.500 $\text{cm}^{-1}$ , correspondiendo a los diferentes modos de vibración de la molécula de ácido láctico. El pico principal en 830 $\text{cm}^{-1}$  ha sido usado para caracterizar la presencia de ácido láctico en el músculo tibial de ratón. Fueron analizados los espectros Raman de músculos tibiales *in vivo* e *in vitro*. Además de esto, también fué monitoreada la difusión de ácido láctico a través del músculo, *in vitro*. Nosotros podemos concluir a partir de los resultados obtenidos, que la espectroscopia Raman de infrarojo próximo*

\* Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D. Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP.

1. Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica.  
2. Laboratório de Terapia Fotodinâmica.

Recebido em 10/6/03

2ª versão recebida em 7/10/03

Aceito em 4/11/03

### Endereço para correspondência:

Rodrigo Alvaro B. Lopes Martins, Ph.D.  
Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica  
Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento – IP&D  
Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP  
Av. Shishima Hifumi, 2.911 – Urbanova  
12244-000 – São José dos Campos, SP  
E-mail: rlopes@univap.br

presenta un gran potencial para, en el futuro, con el perfeccionamiento de la técnica a ser utilizada en evaluaciones físicas con la intención de permitir mediciones de las concentraciones de ácido láctico en el músculo esquelético, a través de una metodología no invasiva.

**Palabras clave:** Acido láctico. Espectroscopia Raman. Músculo tibial de ratón.

## INTRODUÇÃO

Para que um indivíduo realize uma atividade física é necessário que suas funções orgânicas estejam plenamente ajustadas, resultando assim em maior tolerância quanto a solicitações muito intensas dos exercícios<sup>1</sup>. Através de treinamento orientado é possível a adaptação dos sistemas fisiológicos solicitados durante esforço físico<sup>1</sup>.

Como a contração muscular voluntária depende de vários fatores, como o sistema nervoso central, o neurônio periférico, a junção neuromuscular e os músculos estriados esqueléticos, é difícil de estabelecer uma definição estrita de fadiga muscular. Segundo Edwards<sup>2</sup>, a fadiga muscular é a incapacidade de manter a força requerida ou esperada de contração muscular. A princípio, qualquer um desses fatores pode estar envolvido com o processo de fadiga muscular e, portanto, o fator fisiológico significativo para o desenvolvimento da fadiga pode ser de caráter mecânico, metabólico ou eletrofisiológico.

Apesar de a fadiga muscular se caracterizar como um fenômeno complexo atribuído a fatores múltiplos, alguns autores concordam que a fadiga pode ser classificada como de origem periférica ou central<sup>3,4</sup>. O acúmulo de metabólitos como o ácido láctico ocorre durante atividade física intensa, sendo acompanhado por uma queda de pH tecidual. Entretanto, existem evidências de que o próprio aumento da concentração de íons hidrogênio possa ter um efeito inibitório sobre os filamentos contráteis, incluindo a redução na sensibilidade da troponina ao íon cálcio<sup>5</sup>.

Vários estudos têm investigado os fatores biológicos que influenciam o condicionamento dos atletas, buscando parâmetros de referência para prescrição dos treinamentos. Outro aspecto importante visa caracterizar fisiologicamente uma zona metabólica a partir da qual ocorre desequilíbrio entre a produção e eliminação de metabólitos, os quais podem gerar fadiga muscular. Entre esses metabólitos o ácido láctico vem sendo citado como um excelente indicador do sistema energético que está sendo utilizado predominantemente durante o exercício<sup>1,6</sup>. O ácido láctico é produzido constantemente no organismo, tendo sua concentração aumentada na região muscular durante atividade física de alta intensidade<sup>7</sup>.

Desde que Fletcher e Hopkins<sup>8</sup> demonstraram a formação de ácido láctico durante a contração muscular, muita atenção tem sido dada aos prováveis mecanismos que controlam sua produção e remoção durante o exercício. No final dos anos 50 e início dos anos 60, Hollmann *et al.*<sup>9</sup> introduziram o conceito de “início do metabolismo anaeróbio para mensurar a *performance* cardiorrespiratória”. Em seus estudos, os autores observaram que durante o exercício com incremento de cargas a cada três minutos, atingia-se um ponto onde a ventilação pulmonar (VP) aumentava em maior grau do que o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ). Como as mudanças na VP e no ácido láctico sanguíneo eram coincidentes, Hollmann definiu esse momento do exercício como “ponto de ótima eficiência ventilatória”. Posteriormente, Wasserman e McLlory<sup>10</sup>, baseados em um estudo utilizando indivíduos com patologias cardiovasculares, introduziram o termo “limiar anaeróbio”, propondo que parâmetros ventilatórios poderiam ser utilizados para estimar o ponto de inflexão da curva de ácido láctico sanguíneo.

Tema central de inúmeras pesquisas realizadas nas últimas décadas, o “limiar anaeróbio” apresenta-se como um dos assuntos mais polêmicos e controvertidos dentro da história recente da Fisiologia do Exercício. Embora haja discordância entre os pesquisadores sobre seus mecanismos básicos<sup>10</sup>, o limiar anaeróbio (LAn) tem sido amplamente utilizado por pesquisadores, fisiologistas, preparadores físicos e médicos. Aplicações práticas da determinação do LAn incluem a prescrição da intensidade adequada de exercício<sup>13</sup>, predição de *performance*<sup>14</sup> e a avaliação dos efeitos do treinamento aeróbio, principalmente durante um acompanhamento longitudinal<sup>15</sup>.

Apesar do grande número de terminologias e referências utilizadas para determinar os limiares, os mesmos podem ser basicamente divididos em duas categorias: OPLA (*onset of plasma lactate accumulation*) como sendo a intensidade de exercício anterior ao aumento exponencial do ácido láctico no sangue. Embora alguns autores utilizem basicamente o mesmo referencial do estudo anterior, eles definem esta intensidade de exercício como sendo o limiar de lactato (LL)<sup>16</sup>. Outros autores porém, utilizando a mesma terminologia (LL), apresentam outra referência para sua determinação e definiram o LL como sendo a intensidade de exercício que determina um aumento de 1mM no ácido láctico sanguíneo, acima dos valores da linha de base ( $\Delta 1mM$ ). Coyle<sup>17</sup> justifica sua metodologia por encontrar no LL, intensidades de exercício que são 5% maiores do que as encontradas no OPLA, sendo estas muito próximas às velocidades selecionadas pelos atletas durante a prova de maratona. Além disso, em ciclistas, o emprego da intensidade correspondente ao LL resulta em frequência muito similar da glicogenólise muscular, resultando em tempo

de fadiga, em função da depleção de glicogênio, também muito similar entre os sujeitos (três horas)<sup>18</sup>.

Vários estudos têm examinado a relação entre as concentrações de ácido láctico e de noradrenalina e adrenalina, sugerindo forte relação causal entre as mesmas<sup>19</sup>. Mazzeo e Marshall verificaram que o comportamento da curva das catecolaminas durante o exercício de cargas progressivas é muito semelhante ao comportamento do ácido láctico, podendo-se utilizar o ponto de inflexão da concentração de adrenalina (limiar de adrenalina), para a predição do LL.

A avaliação direta da concentração de ácido láctico durante o exercício reconhecidamente apresenta algumas dificuldades e inconvenientes. A primeira distorção nos métodos atualmente empregados deve-se ao fato de que o ácido láctico mensurado encontra-se na circulação sistêmica, e não exatamente na musculatura predominantemente utilizada em determinada atividade física. Como o ácido láctico durante o exercício é produzido e liberado principalmente pela musculatura ativa, e pode ser removido pela própria musculatura ativa, pelos músculos inativos, pelo coração e fígado, as concentrações de ácido láctico podem ser diferentes para uma mesma intensidade de exercício, dependendo do local utilizado para a coleta de sangue. Assim, a comparação dos resultados entre os diferentes estudos deve ser realizada levando-se em consideração o local de obtenção da amostra de sangue, bem como do tratamento (plasma ou sangue total) que se dá a essas amostras. Um segundo inconveniente deve-se ao fato de tratar-se de métodos invasivos que, em menor ou maior grau, embutem um risco de contaminação, tanto do atleta, quanto do avaliador. Um terceiro fator importante refere-se a que, normalmente, não é possível a realização das análises durante a atividade física, em tempo real, só podendo ser feitas antes ou após a mesma. Tendo em vista esses fatores, torna-se deveras interessante, do ponto de vista da avaliação física, o estudo mais aprofundado de novas tecnologias que possibilitem a redução dos riscos e o aumento da fidedignidade nas mensurações das concentrações musculares de ácido láctico durante o esforço físico.

Técnicas de espectroscopia têm sido utilizadas para análise de tecidos biológicos, apresentando resultados bastante confiáveis, uma vez que se consiga adequar a técnica espectroscópica às informações necessárias para uma análise precisa da amostra<sup>20</sup>.

Quando a luz incide sobre uma substância qualquer, ela pode ser absorvida ou espalhada elasticamente. *Espectroscopia de infravermelho* (IR) mede a frequência na qual uma dada amostra absorve uma radiação IR e a intensidade desta absorção. Assim, o espectro de infravermelho representa a identificação de uma amostra com picos de absorção

correspondentes à frequência de vibração entre os átomos constituintes do material. A determinação das frequências permite identificar os componentes químicos da amostra, visto que cada grupo químico é conhecido por absorver luz em uma dada frequência. A intensidade de uma certa absorção está relacionada com a concentração de um respectivo componente, fornecendo, assim, uma análise quantitativa. *Espectroscopia Raman com transformada de Fourier* usa radiação de *laser* com energia próxima à do infravermelho para excitar uma dada amostra e medir a luz emitida pela mesma. Grande parte da luz espalhada pode ter a mesma frequência que a luz incidente (espalhamento Rayleigh – elástico). Entretanto, uma pequena fração da luz incidente ( $h\nu_i$ ) pode ter sua energia diminuída ( $h(\nu_i - \nu_R)$  Stokes) ou aumentada ( $h(\nu_i + \nu_R)$  anti-Stokes) (espalhamento Raman – inelástico) (figura 1). Visto que a energia da luz é proporcional à frequência, a mudança de frequência da luz espalhada inelasticamente é igual à frequência vibracional da molécula espalhada. Esse processo de troca de energia entre molécula, luz espalhada e luz incidente é conhecido como efeito Raman. Do ponto de vista energético, o processo de espalhamento Raman pode ser descrito como a transição de uma molécula do estado fundamental para um estado vibracional excitado, acompanhada por uma absorção simultânea de um fóton incidente e emissão de um fóton espalhado (Raman). A luz Raman espalhada pode ser coletada por um espectrômetro, onde sua intensidade é mostrada em função de sua mudança de frequência (deslocamento Raman). Visto que cada amostra molecular possui seu próprio conjunto vibracional molecular, o espectro Raman de uma amostra em particular consistirá de uma série de picos, cada um deslocado pela sua frequência vibracional característica daquela molécula, fornecendo assim a identificação para a molécula que está sendo estudada. O deslocamento Raman é frequentemente medido em comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), uma unidade conveniente para relacionar a mudança de frequência da luz espalhada em relação à frequência da luz incidente.

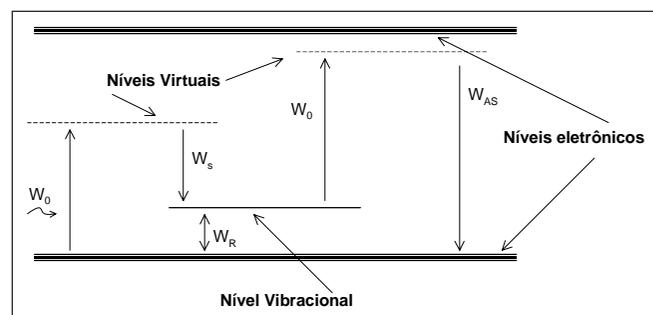


Fig. 1 – Esboço de transições de elétrons para obtenção de componentes Stokes e anti-Stokes

Células e tecidos são constituídos de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídios, vitaminas e outros componentes, os quais formam o complexo molecular com uma estrutura extremamente intrincada. Todas as doenças, sem exceção, são causadas por mudanças na bioquímica celular e/ou dos tecidos. O corrente desafio da medicina moderna é o de encontrar uma técnica analítica que investigue essas alterações por métodos não-invasivos e não-destrutivos. Poucos métodos analíticos satisfazem esses requerimentos e são sensíveis o suficiente para revelar detalhes de composição e de estrutura. As técnicas que têm mais se destacado nesses estudos são as de espectroscopia NMR, infravermelho (IR) e de Raman. Dentre elas, as técnicas de espectroscopia Raman e de infravermelho estão atualmente emergindo como métodos poderosos para diagnóstico médico, visto que alterações microscópicas podem ser detectadas por espectroscopia óptica pelos sinais característicos da doença, resultando em um diagnóstico *in vivo* não-invasivo.

Espectroscopia Raman e de IR podem fornecer informações bioquímicas detalhadas, as quais podem ser utilizadas para detectar doenças em seu estágio inicial de desenvolvimento. Como a técnica de espectroscopia vibracional pode ser utilizada através de fibras ópticas, a remoção de amostra não é necessária, o que representa uma grande vantagem sobre as técnicas convencionais de biópsia para análise histopatológica<sup>21</sup>. Uma vez diagnosticado opticamente, o órgão doente pode ser tratado efetivamente antes de alcançar um estágio avançado. Técnicas de espectroscopia vibracional, como Raman e IR, têm sido recentemente utilizadas para investigação de câncer em peles humanas e em de animais<sup>22,23</sup>, assim como para diagnóstico de aterosclerose<sup>24,25</sup>. Espectroscopia Raman tem também sido utilizada para estudar doenças inflamatórias de pele e avaliar o efeito de drogas sobre a epiderme<sup>25</sup>. Dependendo da natureza da vibração, a qual é determinada por simetria da molécula, as vibrações podem ser permitidas ou proibidas em infravermelho ou Raman.

O objetivo do presente trabalho é o estudo da espectroscopia Raman no infravermelho, como possível metodologia para a detecção do ácido láctico em músculo esquelético.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250 e 350g provenientes do Biotério do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP. Os animais foram mantidos sob temperatura média de 25°C e ciclo claro/escuro de 12h, com água e ração *ad libitum* até o momento da experimentação.

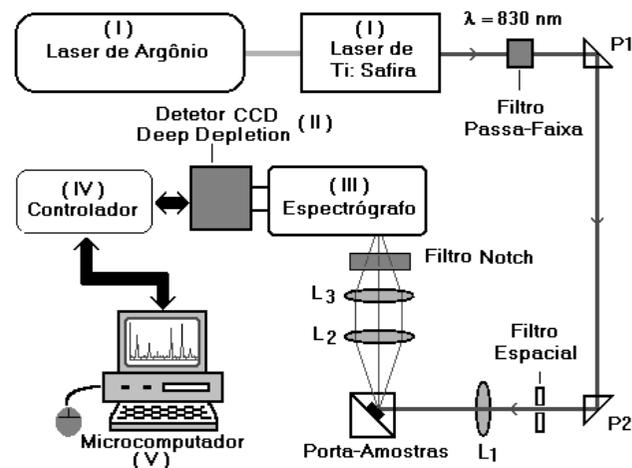


Fig. 2 – Diagrama de blocos ilustrando o sistema de espectroscopia Raman de bancada

No momento da experimentação, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg kg<sup>-1</sup> i.v.) por via intraperitoneal e fixados em mesa cirúrgica. O músculo tibial anterior e o nervo tibial foram então dissecados e isolados. O animal foi posicionado no equipamento de espectroscopia Raman (figura 2), para as aquisições dos espectros característicos.

### O sistema Raman

A espectroscopia Raman (ER) é uma técnica de espectroscopia vibracional usada para determinação de estrutura molecular e para a identificação e quantificação de materiais. As principais aplicações dessa técnica na área químico-farmacêutica têm sido a análise não-destrutiva de produtos acabados sólidos, líquidos e gases, e a rápida identificação de amostras.

O diagrama em blocos do sistema Raman é mostrado na figura 2. Resumidamente, um laser de argônio de 5W é usado para bombear um laser de estado sólido de Ti:safira. O laser de argônio foi instalado e alinhado de maneira a fornecer a máxima potência. O laser de Ti:safira foi instalado e alinhado de maneira a fornecer a máxima ação laser nos comprimentos de onda sintonizáveis entre 750 e 950nm. O sinal Raman espalhado na amostra é coletado a 90 graus utilizando-se filtros de rejeição do tipo *notch* e focalizados na entrada da fenda do espectrógrafo. Os filtros *notch* eliminam a luz *Rayleigh* espalhada e transmitem o sinal Raman para o espectrógrafo para dispersão. A luz dispersada pelo espectrógrafo é detectada por um CCD *Deep Depletion* refrigerado por nitrogênio líquido. O comprimento de onda de excitação do laser de Ti:safira passa por um filtro holográfico “passa-faixa”, eliminando a luz indesejada, transmitindo somente o comprimento de onda desejado. Então,

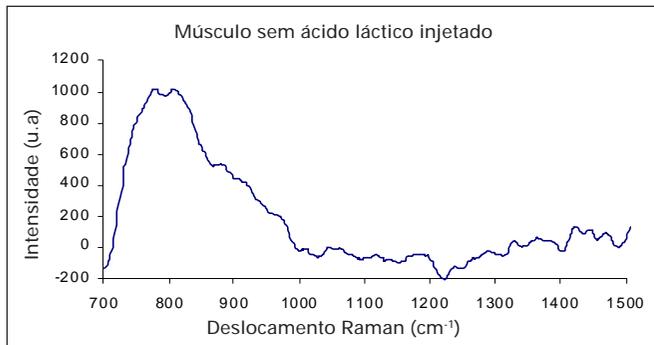


Fig. 3 – Espectro característico do músculo tibial de rato sem ácido láctico injetado. O traçado é representativo de seis animais.

o laser de excitação é focalizado na amostra após passar pela óptica de dispersão.

Após a preparação de todo o sistema, foi realizada uma aquisição de 50 segundos para obter o espectro Raman do músculo sem o ácido láctico (basal). Em seguida, foram injetados 50µl de ácido láctico a 86%, em uma concentração de 9,4mol/l com uma seringa de 1ml na região proximal da musculatura. Após a injeção, foi esperado um tempo de três minutos e logo em seguida a realização das aquisições no sistema Raman, sendo cada aquisição realizada com um tempo de 50 segundos.

### Injeção do ácido láctico e aquisição dos espectros no experimento *in vitro*

O músculo previamente preparado, como descrito anteriormente, foi fixado no porta-amostra, permitindo a realização de aquisições contínuas de 200s, em intervalos de quatro minutos.

Para verificar a difusão do ácido na musculatura foi realizada uma injeção de 50µl de ácido láctico na concentração de 9,4mol/l. Após a injeção foram ainda realizadas sete aquisições a intervalos de quatro minutos totalizando 11 aquisições.

Isso nos permitiu estabelecer um gráfico demonstrativo da difusão do ácido láctico na musculatura. A distância do ponto de injeção até o ponto de incidência do laser no músculo foi de 1,5cm, sendo a distância máxima permitida pelo comprimento do músculo tibial de rato.

### Tratamento dos espectros

Os espectros obtidos com as aquisições no sistema Raman foram filtrados por um filtro digital e implementados com a utilização do software *Matlab*. Os espectros tiveram boa parte de seus ruídos excluídos para melhor observação do pico desejado e para que fosse possível medir a intensidade dos picos, para comparação da difusão em diferentes momentos após a injeção do ácido láctico.

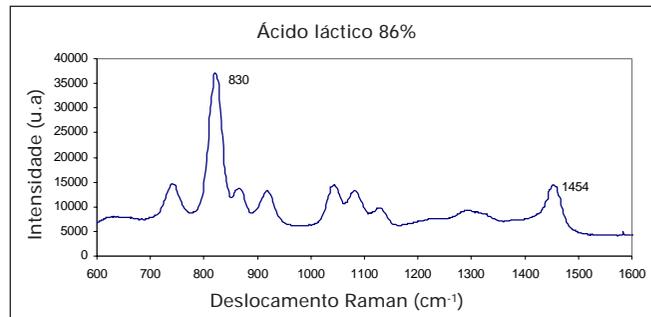


Fig. 4 – Espectro Raman do ácido láctico a 86%. Podem ser observados dois picos característicos bem demarcados em 830 e 1.454cm<sup>-1</sup>. O traçado é representativo de seis animais utilizados.

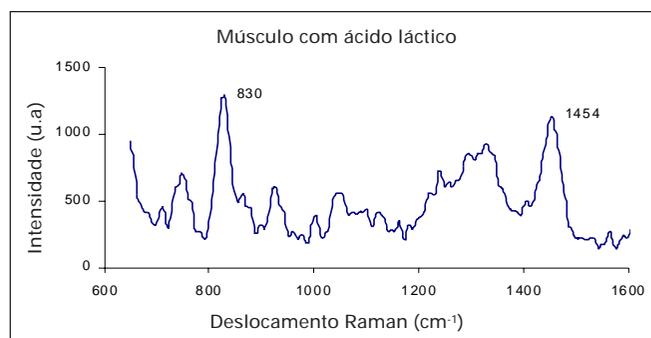


Fig. 5 – Espectro característico do músculo tibial de rato com ácido láctico injetado. Podem ser observados os picos de ácido láctico demarcados em 830 e 1.454cm<sup>-1</sup>. O traçado é representativo de seis animais utilizados.

## RESULTADOS

### Espectro Raman do músculo tibial de ratos

Foram realizados espectros Raman do músculo tibial de ratos controle, isto é, sem injeção de ácido láctico. Na figura 3 podemos observar um espectro característico do músculo tibial de ratos sem ácido láctico injetado.

### Espectro Raman do ácido láctico em cubeta de quartzo

O espectro Raman do ácido láctico apresentou diversas linhas características que podem ser bem resolvidas na faixa de frequências do nosso sistema, que vai até 1.500cm<sup>-1</sup>. Essas frequências correspondem aos diferentes modos de vibração da molécula do ácido láctico, tendo seus picos principais característicos em 830 e 1.457cm<sup>-1</sup>.

A figura 4 mostra um espectro do ácido láctico a 86% (*Sigma Chemical Co.*, St. Louis, EUA), evidenciando os vários picos da amostra em cubeta de quartzo.

### Espectro Raman do ácido láctico em músculo tibial de ratos após a injeção de ácido láctico

A figura 5 demonstra o espectro Raman do músculo tibial de ratos após a injeção de ácido láctico. Podemos ob-

servar claramente a presença dos picos característicos do ácido láctico nas posições de 830 e 1.457cm<sup>-1</sup>.

### Difusão do ácido láctico observada através dos espectros Raman

A tabela 1 mostra os valores das aquisições seriadas para avaliação da difusão do ácido láctico no músculo tibial de ratos. O resultado da análise de regressão linear fornece uma correlação positiva de 0,95 entre os valores de tempo da aquisição e intensidade do sinal Raman, demonstrados na tabela.

TABELA 1

Valores das intensidades em unidades arbitrárias (u.a), obtidas em relação ao tempo das aquisições após a injeção do ácido láctico. O resultado da análise de regressão linear fornece uma correlação positiva de 0,95 entre os valores de tempo da aquisição e intensidade do sinal Raman ( $p < 0,0001$ )

Aquisições	Tempo (min.)	Intensidade (u.a)
1	4	9.433
2	8	10.566
3	12	12.830
4	16	17.358
5	20	20.377
6	24	15.700
7	28	20.507
8	32	22.962
9	36	25.185
10	40	33.750
11	44	31.666

## DISCUSSÃO

As técnicas de espectroscopia Raman e de infravermelho estão atualmente emergindo como métodos poderosos para diagnóstico médico, visto que alterações microscópicas podem ser detectadas por espectroscopia óptica pelos sinais característicos da doença, resultando em um diagnóstico *in vivo* não-invasivo.

Como mencionado anteriormente, a espectroscopia Raman e a de IR podem fornecer informações bioquímicas detalhadas, as quais podem ser utilizadas para detectar doenças em seu estágio inicial de desenvolvimento. Como a técnica de espectroscopia vibracional pode ser utilizada através de fibras ópticas, a remoção de amostra não é necessária, o que representa uma grande vantagem sobre as técnicas convencionais de biópsia para análise histopatológica. Dependendo da natureza da vibração, a qual é deter-

minada por simetria da molécula, as vibrações podem ser permitidas ou proibidas em infravermelho ou Raman.

Em alguns materiais, o sinal Raman pode ser anulado pela fluorescência de impurezas se as amostras forem excitadas com luz visível. Entretanto, com o recente desenvolvimento de espectrômetro de IR e Raman com transformada de Fourier operando próximo da região do infravermelho (NIR-FT-Raman), essa situação foi alterada completamente. Foi demonstrado que a maioria de amostras orgânicas pode ser excitada com um laser de Nd:YAG com  $\lambda = 1.064\text{nm}$ . Visto que muito dos componentes de material biológico não possuem bandas de absorção nesse intervalo, existe uma probabilidade muito baixa de excitação de fluorescência. A partir disso, a técnica de espectroscopia Raman tem sido constantemente utilizada em medicina e biologia para diagnóstico médico, estudo em plantas, assim como para análise de poluentes no meio ambiente.

Neste trabalho avaliamos a utilização da espectroscopia Raman como possível ferramenta para identificação de metabólitos como o ácido láctico, baseados no fato de que cada componente bioquímico presente nos tecidos apresenta um espectro vibracional característico, com bandas estreitas e bem resolvidas. Como o interesse particular deste trabalho foi a identificação de ácido láctico intramuscular, demonstramos que a técnica apresentou significativa resolução das bandas vibracionais, trazendo informações da presença desse metabólito quando aumentada sua concentração na musculatura observada.

Nos protocolos em que foi realizada a administração exógena de ácido láctico através de injeção intramuscular foi possível detectar claramente essa substância e diferenciá-la dos demais componentes musculares. Embora Pilotto *et al*<sup>26</sup> em seu trabalho afirmem que o sistema Raman foi capaz de detectar ácido láctico em níveis fisiológicos no sangue onde o sinal demonstrou maior intensidade e menor ruído, o que facilitou no tratamento computacional do espectro Raman obtido. No músculo, a relação sinal/ruído é modificada, apresentando aumento significativo de ruído e diminuição do sinal da substância estudada, o que dificulta a detecção fisiológica do ácido láctico.

No uso do sistema Raman para detecção de ácido láctico ficou clara a necessidade de protocolos mais específicos, em que a instabilidade do sistema seja amenizada com relação ao tipo de *laser* empregado e ao tipo de alinhamento do sistema antes de cada experimento. O tipo de sistema empregado neste trabalho constitui, sem sombra de dúvida, uma poderosa ferramenta para a análise qualitativa de amostras biológicas. No entanto, sua alta complexidade dificulta sua utilização por profissionais da área de Fisiologia do Esforço, fora do laboratório de experimenta-

ção. Trata-se ainda de uma tecnologia em desenvolvimento, na qual se percebe a necessidade de um sistema mais robusto e fechado, que apresente maior especificidade e menor custo, para ser utilizado na prática por profissionais da área.

Por outro lado, Pilotto *et al.*<sup>21</sup> descreveram as dificuldades encontradas no uso do sistema Raman de fibra óptica, principalmente no que diz respeito à intensidade de ruído causado pelo forte sinal Raman emitido pela própria fibra óptica, interferindo diretamente no sinal do ácido láctico. Por esse motivo, para chegar a esses resultados foi utilizado o sistema Raman de bancada.

Quanto ao deslocamento Raman dos picos, foi observada pequena variabilidade experimental, o que Silveira<sup>20</sup> descreve como sendo a captação de sinal pelo espectrógrafo podendo sofrer pequena variação de deslocamento pela grade de corte posicionada para a busca do sinal desejado.

Com relação às intensidades dos picos encontrados, o sistema evidenciou um pico mais intenso próximo de  $830\text{cm}^{-1}$  como foi citado por Pilotto *et al.*<sup>21</sup> e um menos intenso próximo de  $1.456\text{cm}^{-1}$ , sendo característico da substância. Embora o segundo pico não tenha sido observado nos resultados do protocolo *in vitro* em que o sinal estava prejudicado, exigindo um número grande de acumulações durante as aquisições, esta discrepância deveu-se provavelmente, segundo Silveira<sup>20</sup>, à baixa potência conseguida no alinhamento do *laser* de Ti:safira.

No protocolo *in vitro* foi relevante o aumento da intensidade dos picos no decorrer da difusão do ácido láctico, ou seja, foi possível demonstrar a difusão da substância do local da administração até o ponto onde se fez a colheita do sinal, na tentativa de monitorar a difusão do ácido láctico na musculatura esquelética (tabela 1). Por outro lado, em dois pontos ocorreu queda na intensidade do sinal Raman, indo ao encontro do que cita Silveira<sup>20</sup>, que mesmo durante um acúmulo e aquisições constantes podem ocorrer pequenas diferenças nas intensidades de colheita do sinal pelo espectrógrafo, ocasionado principalmente pela instabilidade da potência do *laser* ou por problemas de geometria na incidência da luz na amostra. Como a composição diferenciada dos tecidos é responsável pela diferença espectral observada, o diagnóstico do processo patológico ou a classificação do tecido pode ser obtida pela identificação dessas diferenças espectrais, utilizando todo o espectro ou transições e vibrações mais importantes<sup>20</sup>.

A técnica de espectroscopia Raman apresenta grande interesse na área médica pela sua especificidade molecular. Porém, a intensidade do sinal Raman retroespalhado é extremamente fraca comparada com outros processos de decaimento radioativo, principalmente a fluorescência. De

maneira geral, a intensidade do sinal Raman é 1.000 vezes menos intensa do que a emissão fluorescente. Por isso, faz-se necessária a utilização de instrumentação adequada para a colheita desse fraco sinal; entretanto, em algumas ocasiões o sinal acaba prejudicando a realização do experimento e a análise dos resultados por um fator de variação da intensidade de sinal.

Um fator interessante e muito importante nas aplicações da espectroscopia Raman em amostras biológicas é a correta escolha do comprimento de onda de excitação. A maioria das moléculas biológicas possui transições dos níveis eletrônicos em comprimentos de onda na região do ultravioleta e visível. Fazendo-se uso de *lasers* visíveis para a excitação Raman, como o *laser* de íon de argônio, por exemplo, a fluorescência dessas biomoléculas acaba predominando sobre o sinal Raman. Como essas moléculas não apresentam transições eletrônicas para excitação no infravermelho próximo, a fluorescência quase que inexistente, sendo a opção por *lasers* com comprimento de onda entre 700 e 900nm preferível.

A técnica de espectroscopia Raman demonstrou grande potencial para a detecção do ácido láctico em músculo tibial de ratos, embora seja preciso melhor adequação dos protocolos ao tipo de sistema empregado, para que em trabalhos futuros não haja problemas de instabilidade no equipamento como o ocorrido neste. As dificuldades encontradas na padronização dos experimentos são naturais, devido ao estágio de desenvolvimento de uma nova tecnologia, demonstrando, obviamente, que ainda existem diversos fatores que necessitam de maiores estudos para sua aplicação profissional.

No entanto, os resultados iniciais obtidos neste trabalho demonstram claramente que o sistema é capaz de identificar o ácido láctico presente na musculatura esquelética em concentrações semelhantes às fisiológicas, pois o poder de definição vibracional deste sistema permite alta resolução. Além disso, o sistema foi capaz de avaliar a difusão do ácido láctico em relação ao tempo, mesmo com a interferência do baixo sinal Raman.

Por outro lado, são necessárias adaptações desse sistema para que este possa ser utilizado em situações reais de esforço físico em humanos, em que sabidamente ocorre a adição de fatores complicadores como o movimento e a presença da pele humana, que constitui uma barreira à captação do sinal.

---

*Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.*

---

## REFERÊNCIAS

1. Fox EL, Foss ML. The physiological basis of physical education and athletics, Chapter 2, Wm. C. Brown Publishers, 1989.
2. Edwards RHT. Hypotheses of peripheral and central mechanisms underlying occupational muscle pain and injury. *Eur J Appl Physiol* 1988; 57:275- 81.
3. Bigland B, Furbush F, Woods J. Fatigue of intermittent submaximal voluntary contractions: central and peripheral factors. *J Appl Physiol* 1986; 61:421- 9.
4. Fitts R. Muscle fatigue: the cellular aspects. *Am J Sports Med* 1996; 24:9-14.
5. Sejersted OM, Vollestad NK. Physiology of muscle fatigue and associated pain. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1993.
6. Billat LV, Koralsztein JP. Significance of the velocity at  $VO_2$ max and time to exhaustion at this velocity. *Sports Med* 1996;22:90-8.
7. Yaznek P. Condicionamento físico do atleta transplantado. São Paulo: Sarvier APM, 1994.
8. Fletcher WM, Hopkins FG. Lactic acid in amphibian muscle. *J Physiol* 1997;35:242-9.
9. Hollmann W. Historical remarks on the development of the aerobic-anaerobic threshold up to 1966. *Int J Sports Med* 1985;6:109-16.
10. Wasserman K, McLlory MB. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. *Am J Cardiol* 1964;14:844-52.
11. Hagberg J. Exercise hyperventilation in patients with McArdle's disease. *J Appl Physiol* 1982;52:991-4.
12. Gaesser O, Poole DC. Lactate and ventilatory threshold: disparity in time course at adaptation to training. *J Appl Physiol* 1986;6:999-1004.
13. Dwyer J, Bybeer R. Heart rate indices of the anaerobic threshold. *Med Sci Sports Exerc* 1983;15:72-6.
14. Farrel PA, Wilmore JH, Coyle EF, Billing JE, Costill DL. Plasma lactate accumulation and distance running performance. *Med Sci Sports* 1979; 11:338-44.
15. Kohrt WM. Longitudinal assessment of responses by triathletes in swimming, cycling, and running. *Med Sci Sports Exerc* 1989;21:569-75.
16. Ivy JL. Alteration in the lactate threshold with changes in substrate availability. *Int J Sports Med* 1980;2:139-42.
17. Coyle E, Martin WH, Ehsani AA, Hagberg JM, Bloomfield SA, Sinacore DR, et al. Blood lactate threshold in some well-trained ischemic heart disease patients. *J Appl Physiol* 1983;54:18-23.
18. Coyle EF. Integration of the physiological factors determining endurance performance ability. *Exerc Sport Sci Rev* 1995;23:25-63.
19. Stainsby WN, Brooks GA. Control of lactic acid metabolism in contracting muscles and during exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 1990;18:29-63.
20. Silveira JR. Correlação entre a técnica de espectroscopia Raman e a análise histopatológica das placas ateromatosas em artérias coronárias humanas [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001.
21. Kendall C, Stone N, Shepherd N, Geboes K, Warren B, Bennett R, et al. Raman spectroscopy, a potential tool for the objective identification and classification of neoplasia in Barrett's oesophagus. *J Pathol* 2003;200: 602-9.
22. Crow P, Stone N, Kendall CA, Uff JS, Farmer JA, Barr H, et al. The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro. *Br J Cancer* 2003;89:106-8.
23. Wong Kee Song LM, Marcon NE. Fluorescence and Raman spectroscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2003;13:279-96.
24. Moreno PR, Muller JE. Identification of high-risk atherosclerotic plaques: a survey of spectroscopic methods. *Curr Opin Cardiol* 2002;17:638-47.
25. Van de Poll SW, Romer TJ, Puppels GJ, van der Laarse A. Imaging of atherosclerosis. Raman spectroscopy of atherosclerosis. *J Cardiovasc Risk* 2002;9:255-61.
26. Pilotto S, Pacheco MT, Silveira L Jr, Villaverde AB, Zangaro RA. Analysis of near-infrared Raman spectroscopy as a new technique for a transcutaneous non-invasive diagnosis of blood components. *Lasers Med Sci* 2001;16:2-9.