

# PROTEÍNA SECUNDÁRIA NO MÚSCULO DE RATOS EXERCITADOS QUE RECEBERAM SUPLEMENTO DE CREATINA

SECONDARY PROTEIN IN THE MUSCLE OF EXERCISED RATS THAT RECEIVED CREATINE SUPPLEMENTATION

PROTEÍNA SECUNDARIA EN EL MÚSCULO DE RATONES EJERCITADOS QUE RECIBIERON SUPLEMENTO DE CREATINA

Diego Pereira Jerônimo<sup>1,2,3</sup>   
(Profissional de Educação Física)  
Renato Aparecido de Souza<sup>4</sup>   
(Fisioterapeuta)  
Humberto Lameira Miranda<sup>5</sup>   
(Profissional de Educação Física)  
Wellington Ribeiro<sup>2</sup>   
(Farmacêutico)

1. Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Faculdade de Educação Física, Campinas, SP, Brasil.
2. Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Instituto de Desenvolvimento e Pesquisa (IP&D), Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, São José dos Campos, SP, Brasil.
3. Faculdades Integradas (ASMEC), Ouro Fino, MG, Brasil.
4. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais. Grupo de Pesquisa em Ciências da Saúde (GEP-CS), Muzambinho, MG, Brasil.
5. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) - Escola de Educação Física e Desportos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

## Correspondência:

Diego Pereira Jerônimo.  
Faculdades Integradas (ASMEC).  
Av. Prof. Dr. Antônio Eufrásio de Toledo, 100, Ouro Fino, MG, Brasil.  
37572-000.  
diego-jeronimo@hotmail.com

## RESUMO

**Introdução:** Atualmente, não há clareza no que diz respeito ao uso da técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) para análise do efeito da suplementação de creatina (Cr) sobre as estruturas secundárias da proteína do tecido muscular esquelético submetido a exercício. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar as características espectrais do músculo tibial anterior de ratos submetidos a exercício em piscina e à suplementação com Cr. **Métodos:** Experimento 1. Em primeiro lugar, foi realizada uma experiência para assegurar que a FT-IR seria capaz de detectar a variação nas estruturas secundárias da proteína do tecido muscular esquelético no grupo de ratos sedentários (SED) e no grupo de ratos que só receberam suplemento de creatina (CRE). Experimento 2. Em seguida, foi examinado o efeito do exercício físico sobre as características espectrais do tecido muscular, especialmente quando comparado com os grupos sem prática de exercício. **Resultados:** Foi possível verificar que os picos centrados em 1658 cm<sup>-1</sup> (amida I) e 1546 cm<sup>-1</sup> (amida II) são espectros característicos e indicados como marcadores do teor proteico. **Conclusão:** Assim sendo, a técnica de espectroscopia de FT-IR mostrou ser capaz de monitorar as variações nas estruturas secundárias da proteína do tecido muscular esquelético tanto em animais que receberam suplementos, quanto nos que foram submetidos a exercício e ambos os casos conciliados. Além disso, a técnica FT-IR provou ser um método viável para a avaliação não destrutiva de estruturas proteicas no músculo esquelético. **Nível de evidência II, Investigação dos resultados do tratamento.**

**Descritores:** Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier; Biotecnologia; Creatina; Suplementos nutricionais.

## ABSTRACT

**Introduction:** Currently there is a lack of clarity around the use of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy to analyze the effect of creatine (Cr) supplementation on the secondary structures of skeletal muscle tissue protein subjected to exercise. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the spectral characteristics of the tibialis anterior muscle in rats subjected to exercise in a pool and to Cr supplementation. **Methods:** Experiment 1. First, an experiment was conducted to ensure that FT-IR would be able to detect change in the secondary structures of skeletal muscle tissue protein in the group of sedentary rats (SED) and in the group of rats that received creatine supplementation (CRE). Experiment 2. Next, the effect of physical exercise on the spectral characteristics of muscle tissue, especially when compared to the groups without exercise practice, was examined. **Results:** It was possible to verify that the peaks centered on 1658 cm<sup>-1</sup> (amide I) and 1546 cm<sup>-1</sup> (amide II) are characteristic spectra and indicated as markers of protein content. **Conclusion:** Thus, FT-IR spectroscopy proved to be able to monitor changes in secondary structures of skeletal muscle protein in both animals that received supplements and in those subjected to exercise and both cases reconciled. Furthermore, the FT-IR technique proved to be a viable method for the nondestructive evaluation of skeletal muscle protein structures. **Level of evidence II, Investigation of treatment results.**

**Keywords:** Spectroscopy, Fourier transform infrared; Biotechnology; Creatine; Dietary supplements.

## RESUMEN

**Introducción:** Actualmente, no hay claridad en lo que se refiere al uso de la técnica de espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) para análisis del efecto de la suplementación de creatina (Cr) sobre las estructuras secundarias de la proteína del tejido muscular esquelético sometido a ejercicio. **Objetivos:** El objetivo de este estudio fue evaluar las características espectrales del músculo tibial anterior de ratones sometidos a ejercicio en piscina y a la suplementación con Cr. **Métodos:** Experimento 1. En primer lugar, fue realizada una experiencia para asegurar que la FT-IR sería capaz de detectar la variación en las estructuras secundarias de la proteína del tejido muscular esquelético en el grupo de ratones sedentarios (SED) y el grupo de ratones que sólo recibieron suplemento de creatina (CRE). Experimento 2. A continuación, fue examinado el efecto del ejercicio físico sobre las características espectrales del tejido muscular, especialmente cuando comparado con los grupos sin práctica de ejercicio. **Resultados:** Fue posible



verificar que los picos centrados en  $1658\text{ cm}^{-1}$  (amida I) y  $1546\text{ cm}^{-1}$  (amida II) son espectros característicos e indicados como marcadores del tenor proteico. Conclusión: Siendo así, la técnica de espectroscopia de FT-IR mostró ser capaz de monitorizar las variaciones en las estructuras secundarias de la proteína del tejido muscular esquelético, tanto en animales que recibieron suplementos, como en los que fueron sometidos a ejercicio y ambos casos conciliados. Además, la técnica FT-IR probó ser un método viable para la evaluación no destructiva de las estructuras proteicas en el músculo esquelético. **Nivel de evidencia II, Investigación de los resultados del tratamiento.**

**Descriptor:** Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier; Biotecnología; Creatina; Suplementos dietéticos.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1517-869220212702145670pt>

Artigo recebido em 05/02/2015 aprovado em 11/11/2020

## INTRODUÇÃO

A Creatina (Cr) é um composto orgânico sintetizado principalmente no fígado e rins a partir dos aminoácidos glicina, arginina e metionina<sup>1</sup> e desempenha um papel importante no fornecimento de energia rápida durante a contração muscular envolvendo a transferência de um grupo fosfato a partir da phosphorylcreatine (PCr) para ADP, regenerando ATP através de uma reação reversível catalisada pela fosfocreatina quinase (PCK).<sup>2,3</sup> Fisiologicamente, a Cr é utilizada predominantemente por tecidos com alta demanda de energia.<sup>4,2</sup> O principal local de armazenamento de Cr é o tecido muscular esquelético que corresponde a cerca de 95% do total de Cr do corpo. Inserida no contexto esportivo desde a década de 90 a suplementação de Cr tornou-se um recurso ergogênico que auxilia o aumento da performance em exercícios físicos.<sup>5,6</sup>

Diferentes métodos têm sido empregados para avaliar a concentração de Cr no tecido muscular esquelético.<sup>6,7</sup> Algumas técnicas diretas incluem biópsia muscular, ressonância magnética nuclear (1H e 31P-MRS).

Nos últimos anos, a técnica Transformada de Fourier (FT-IR) tem sido utilizada em prognósticos e diagnósticos de doenças e modelos experimentais de sistemas biológicos.<sup>8,9</sup> FT-IR permite medir a frequência e intensidade em que uma dada amostra absorve a radiação infravermelha, proporcionando a identificação de grupos funcionais como carboxila, amina, carbonato, hidroxila entre outros.<sup>10</sup> Ao longo dos últimos 15 anos, a utilização desta técnica de espectroscopia vibracional na ciência do esporte tem aumentado exponencialmente.<sup>11</sup> Sua utilidade como uma ferramenta para fornecer novas perspectivas sobre a heterogeneidade e regulação do metabolismo do tecido muscular esquelético.<sup>9,11</sup> Até o presente momento não foi encontrado qualquer estudo relacionando a técnica de FT-IR, suplementação de Cr sobre as estruturas secundárias da proteína do tecido muscular esquelético submetido a exercício. No entanto, estudos recentes vêm utilizando a técnica de FT-IR para verificar a estabilidade estrutural de proteínas, suas estruturas secundárias, alterações conformacionais, entre outras.<sup>12,13,14</sup>

Assim, devido a falta de informações e clareza na utilização de FT-IR para análise do efeito da suplementação de Cr sobre as estruturas secundárias da proteína do tecido muscular esquelético submetido a exercício, o objetivo deste estudo foi avaliar as características espectrais do músculo tibial anterior de ratos submetidos a condições de exercício em piscina e suplementação com Cr.

## MÉTODOS

Os experimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal aprovado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade do Vale do Paraíba (nº A36/CEP/2008).

### Experimento 1

Foram utilizados dezoito ratos Wistar machos, com peso de  $270,14 \pm 10,76\text{g}$  que foram mantidos em um ciclo claro/escuro em ambiente com temperatura controlada durante todo o estudo, no Biotério do

Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica (IP & D, UNIVAP, São José dos Campos – SP, Brasil). Os ratos permaneceram durante todo o estudo em gaiolas individuais e aleatoriamente foram separados os grupos, suplementados com Creatina (CRE n=9), grupo sedentário (SED n=9) animais que não receberam suplementação de Cr ou realizaram exercício físico.

### Protocolo de Alimentação e Suplementação

Os animais foram alimentados ad libitum ração padrão (Labcil, Nutri Forte, Uberaba, MG, Brasil) e água. Os animais receberam a suplementação de Cr por gavagem (Creatina micronizada, Integral Médica, Embu-Guaçu, SP, Brasil) a uma dose de  $5\text{g/Kg/dia}^{-1}$  durante 1 semana (fase de Carga) e  $1\text{g/Kg/dia}^{-1}$  durante 8 semanas após a fase de carregamento (fase de Manutenção). Considerando-se que uma dose diária de 300 mg de Cr por quilograma de peso corporal é rotineiramente utilizado em outros estudos com animais<sup>15,16</sup> e é equivalente a dose utilizada de  $20\text{g/dia}^{-1}$  em uma pessoa de 70 kg, produzindo os efeitos máximos em 5 dias, assim sendo o regime de suplementação adotado no presente estudo deve ser considerado supra fisiológico.

### Extração da amostra de Músculo

Os animais foram anestesiados com administração intramuscular de  $40\text{mg/Kg}^{-1}$  de xilazina HCl (Xilazina 2%, 50 mL; Syntec do Brasil Ltda., SP, Brasil) e  $50\text{mg/Kg}^{-1}$  de ketamina HCl (Ketamina 10%, 50mL; Syntec do Brasil Ltda., SP, Brasil) e eutanasiados, com injeção intracardíaca de solução KCl (Cloreto de Potássio 10%, Laboratório Ariston Ltda., SP, Brasil). Posteriormente o músculo tibial anterior direito foi extraído, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e guardado a  $-80^\circ\text{C}$  até o estudo com espectroscopia FT-IR.

### Preparação do Músculo para Estudo Espectroscopia FT-IR

As amostras dos músculos congelados foram liofilizadas em equipamento de alto vácuo (Eppendorf do Brasil, São Paulo, Brasil) durante 8 horas, a fim de remover a água a seco. As amostras secas foram então moída num nitrogen-cooled colloid mil (SpexIndustries, Metuchen, Nj, EUA) para obtenção do pó do tecido. Este pó foi misturado com tecido seco brometo de potássio (KBr) num almofariz (numa proporção de 0,5mg: 150mg) e ressecado no liofilizador durante 18h para remover todos os vestígios de água restante. A mistura foi comprimida em um disco fino de KBr sob uma pressão de  $\sim 100\text{kg/cm}^{-2}$  durante 6 min em um molde evacuado produzindo um disco transparente para uso no espectrômetro FT-IR.<sup>17</sup>

### FT-IR espectroscopia

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando um espectro de Perkin-Elmer um espectrômetro FT-IR (Perkin-Elmer Inc., Boston, MA, EUA), equipado com um detector TGS-MIR. O espectro de interferência de ar e o disco de KBr transparente foi gravado em conjunto, como plano de fundo e subtraído automaticamente pelo uso do software (Spectrum One Software).

Os espectros da amostra dos músculos foram registrados a temperatura ambiente, na região de frequência de  $4000$  a  $900\text{ cm}^{-1}$ . Cada

interferograma foi recolhido com 50 digitalizações 4 resolução  $\text{cm}^{-1}$ . Três amostras diferentes foram digitalizadas sob as mesmas condições, todos os quais resultaram em espectros idênticos, sendo a média dos três espectros utilizados na análise estatística. Para remover o ruído, os espectros foram primeiro analisados com ninepoint Savitzky-Golay função suave. Na determinação dos valores médios para a área da banda, foram considerados os espectros pertencentes a cada um dos grupos. Sendo calculados a partir da suavização, de linha de base dos espectros, corrigidas e normalizadas em relação à região da banda de amida I ( $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ ) e amida II ( $1600 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ ) utilizando o software Origin 8.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, EUA).<sup>18</sup>

## Experimento 2

Uma vez que foi demonstrado que o protocolo de suplementação proposto com Cr promoveu variação nas estruturas secundárias da proteína do tecido muscular esquelético e a técnica de espectroscopia FT-IR teve eficácia em detectar esta variação. Um segundo experimento foi realizado para avaliar os efeitos de um protocolo de alta intensidade de exercício conciliado a suplementação de Cr utilizando a técnica de espectroscopia FT-IR. Neste protocolo foram utilizados trinta e seis ratos Wistar machos, com peso de  $251,32 \pm 3,54 \text{ g}$ , mantidos nas mesmas condições como anteriormente descritos para experimento 1.

## Protocolo de Exercício

Os animais foram divididos em grupo somente exercitado (EXE) e grupo exercitado e suplementado com Cr (CRE+EXE), onde foram submetidos a um protocolo de natação onde ocorreu o período de adaptação (30 minutos diários sem carga, durante cinco dias consecutivos), a fim de diminuir os fatores relacionados ao estresse promovido pelo exercício de natação.<sup>19</sup> Durante este período, a Cr não foi administrada, após a fase de adaptação os animais foram individualmente submetidos ao teste de carga máxima (MLT).<sup>20</sup> As células de carga (contendo chumbada de pesca) foram utilizadas com pesos correspondentes a 1, 2, 3%, etc da massa do rato, onde foram aumentados em intervalos de 3min. As células de carga foram fixadas á cauda do animal até que a carga máxima de trabalho fosse atingida, o qual foi determinado no momento em que o animal se tornou esgotado (incapaz de permanecer na superfície após cerca de 8 a 10s).

Este teste permitiu o ajuste correto de 80% da carga máxima para adequação do protocolo de exercício físico, este protocolo foi adotado devido a promoção de intensidade mais vigorosa quando em comparação com protocolos de natação individual.<sup>19</sup> O treinamento ocorreu cinco vezes por semana com sessões diárias de 30 minutos durante toda a duração das oito semanas. O protocolo de natação foi realizado em um tanque de amianto com capacidade de 250 litros de água mantida a  $34 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura. Após o período experimental, um novo MLT foi realizado para verificar os efeitos da suplementação de Cr em regime de treinamento. Neste momento os animais do grupo SED também realizaram a MLT para servir como grupo de controle.

## Análise Estatística

Foi utilizado ANOVA de uma via para analisar a área da banda de picos  $1656 \text{ cm}^{-1}$  (amida I), relativa à ligação C=O e  $1546 \text{ cm}^{-1}$  (amida II) relativa às ligações NH/CN, estas estruturas estão correlacionada com conteúdo proteico onde podemos monitorar alterações na estrutura tecidual gerada após o protocolo de exercícios.<sup>13</sup> Quando necessário foi utilizado análise teste de Tukey-Kramer para determinar a localização de diferenças significativas. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS (versão 17.0), os resultados foram registrados com média e desvio padrão (média  $\pm$  DP), sendo os valores de  $p < 0,05$  considerados como estatisticamente significativos.

## RESULTADOS

### Experimento 1

A Figura 1 mostra o espectro FT-IR proeminentes das bandas vibracionais relacionadas aos grupos SED e CRE, este espectro típico mostrou as principais bandas FT-IR caracterizado por duas regiões distintas: (A), indicando bandas atribuídas a ligação NH vibrações de alongamento ( $\sim 3000$  a  $3500 \text{ cm}^{-1}$ ) e as bandas (B) indicando ligações CH e CHO vibrações de alongamento ( $\sim 900$  a  $1800 \text{ cm}^{-1}$ ).

A Figura 2 mostra os espectros dos grupos CRE e SED sobrepostos, podemos observar que os espectros dos grupos exibem picos característicos centrados em  $1546$  e  $1656 \text{ cm}^{-1}$ , porém as intensidades do sinal FT-IR evidenciam diferenças importantes entre os dois grupos experimentais. Uma vez que a ligação C=O ( $1615 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ) pico amida I e as ligações de NH/CN ( $1500 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ ) pico amida II são sensíveis à conformação, estas bandas são muito úteis para a determinação de estruturas secundárias da proteína, sendo os resultados obtidos consistentes com resultados de pesquisas anteriores.<sup>2,8,12</sup>

A estimativa quantitativa da estrutura secundária da proteína baseia-se no pressuposto de que qualquer proteína pode ser considerado como a soma de um derivado linear de elementos estruturais, e a porcentagem de cada elemento é apenas relacionada com a intensidade espectral.<sup>8,13</sup>

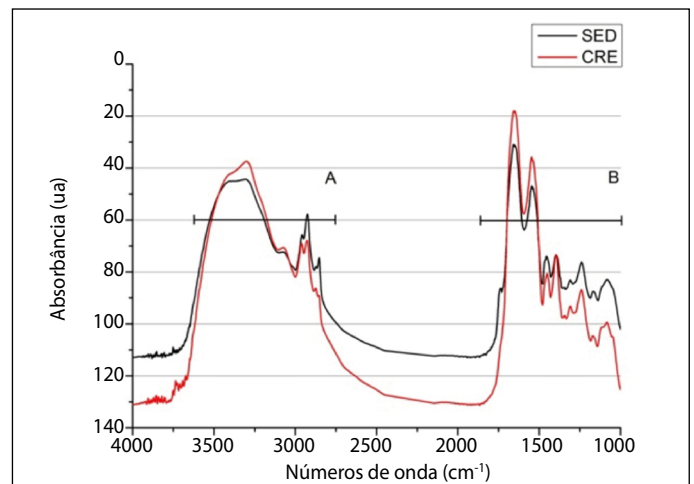


Figura 1. Espectro de vibração proeminente bandas (A) NH alongamento vibrações ( $\sim 3000$ - $3500 \text{ CM}21$ ) e (B) relacionadas com a amida I e II, CH CHO e alongamento vibrações ( $\sim 900$ - $1800 \text{ CM}21$ ).

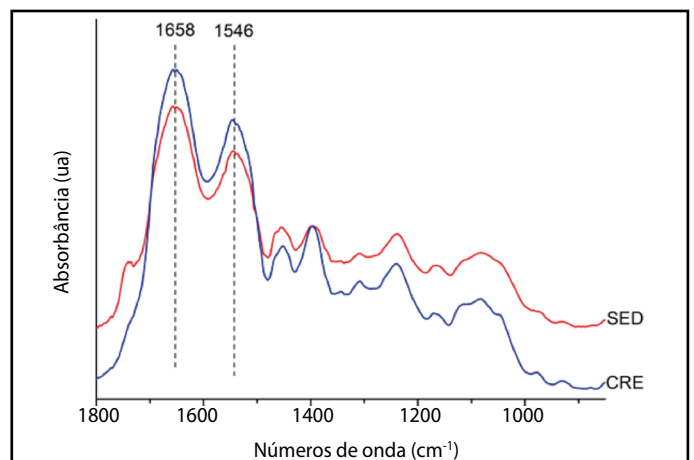


Figura 2. Os espectros FT-IR do tecido muscular esquelético do grupo Cr-suplementados (azul) e sedentários (vermelho) na região  $1800$ - $900 \text{ CM}21$ . As linhas verticais mostram a correspondência entre as linhas de assinatura referentes à Amida I e II correspondentes no espectro de tecido do músculo esquelético.

A análise estatística ANOVA seguida de Tukey pós-teste indicaram que os animais que receberam suplementação de Cr (CRE) mostrou uma área de maior banda do FT-IR centradas em 1546 e 1656  $\text{cm}^{-1}$

## Experimento 2

A Figura 3 mostra os espectros sobrepostos dos grupos CRE, SED, EXE e CRE+EXE, assim os espectros do músculo tibial dos ratos demonstra a frequência de vibração das bandas 1546 e 1656  $\text{cm}^{-1}$  sensíveis a conformação NH/CN e C=O respectivamente, determinando de estruturas secundárias da proteína.<sup>2,13</sup> (BOZKURT et. al., 2010; KONG e YU, 2007). As diferenças nas áreas das bandas FT-IR centradas entre os grupos experimentais, animais dos grupos CRE+EXE apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na banda 1546  $\text{cm}^{-1}$  em quando comparado com SED, CRE e EXE. (Figura 4A)

Além disso, na figura 4B podemos verificar que houve diferença significativa na banda 1656  $\text{cm}^{-1}$  ente os CRE+EXE e EXE ( $p < 0,05$ ) e entre CRE e SED ( $p < 0,05$ ), apresentando os efeitos da suplementação e o regime de treinamento. Foi observada diferença significativa entre os grupos exercitados após o período experimental.

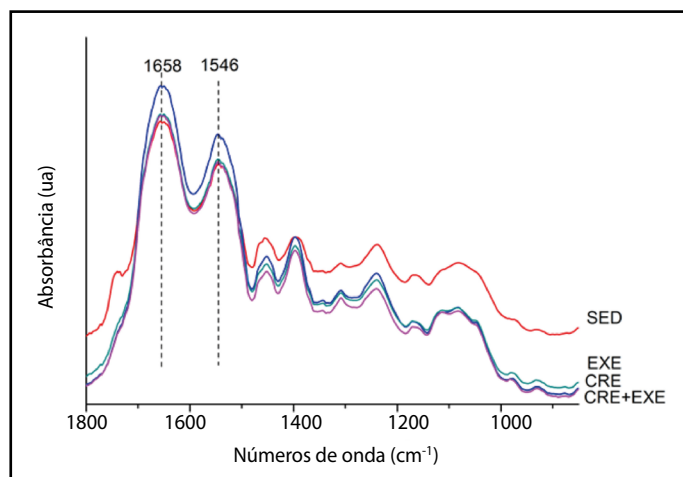
## DISCUSSÃO

O conteúdo normal de Cr total no músculo esquelético, é de  $\pm 120 \text{mmol/Kg}^{-1}$  de peso seco.<sup>20,21</sup> Em sua pesquisa Harris et. al., (1992) com suplementação de Cr, indicou um conteúdo de 155-160  $\text{mmol/Kg}^{-1}$  de peso seco podendo representar o limite máximo para o

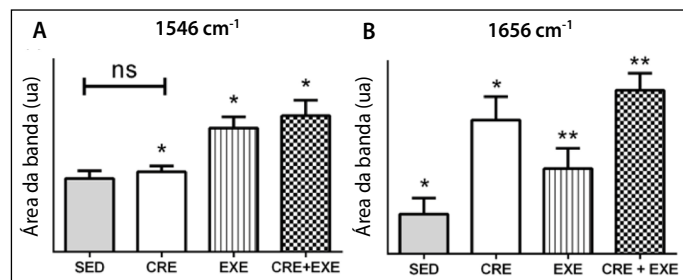
armazenamento de Cr no tecido muscular esquelético. As fibras de contração rápida (por exemplo, tibial anterior) possuem maior concentração e sensibilidade a suplementação de Cr quando comparados com fibras de contração lenta.<sup>2,22</sup>

Em nossa compreensão, esta é a primeira vez que foi monitorada a ação da suplementação de Cr conciliado ao exercício físico através da técnica de espectroscopia FT-IR. Tendo como ponto de partida do presente estudo identificar nos espectros dos grupos SED e CRE os picos característicos dos grupamentos amida I e amida II, região espectral característica para análise de proteínas secundárias.<sup>18,13</sup> Como mostrado na figura 2, o espectro dos grupos SED e CRE caracterizado por dois picos distintos, que foram consistentes com outros resultados encontrados resultados.<sup>18</sup> Assim, a partir dos dados do experimento 1 podemos identificar que as bandas centrada em 1546 e 1658  $\text{cm}^{-1}$ , possibilitando utilizar as bandas como marcador da caracterização de estruturas secundárias da proteína no tecido muscular esquelético. É importante notar nas figuras 2 e 3 que o espectro de FT-IR do músculo esquelético é composto por várias bandas provenientes de outros grupos funcionais de várias macromoléculas: carboidratos, lipídeos e proteínas, assim como estudo em que caracterizou a detecção de Cr no tecido muscular de ratos utilizando espectroscopia FT-IR, característico nas bandas de amida III em 1396 e 1308  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>2,14,11,23</sup>

As principais bandas atribuídas a FT-IR são demonstradas na tela 1, considerando a banda localizada em 1546  $\text{cm}^{-1}$  se sobrepõe com N-H bend, C-N stretch, de alongamento devido ao conteúdo proteico, a banda localizada em 1658  $\text{cm}^{-1}$  foi considerado o marcador o marcador mais sensível correlacionado ao conteúdo proteico em relação



**Figura 3.** Os espectros FT-IR do tecido muscular esquelético do grupo Cr-suplementado (azul), sedentarismo (vermelho), exercida (verde), e Cr completados e exercidas (rosa), na região da região 1800-900  $\text{CM}^{-1}$ . As linhas verticais mostram a correspondência entre as linhas de assinatura Amida I e II correspondentes no espectro de tecido muscular esquelético.



**Figura 4.** Médias e desvios padrão de área integrada das bandas de FT-IR centradas em 1546 Amida II (A) e 1656 Amida I (B) regiões espectrais dos tecido muscular dos animais que receberam a suplementação com creatina (CRE); não receberam a suplementação de Cr nem realizaram exercício físico (SED), exercitado (EXE), Cr-completados e exercidas (CRE + EXE). Em (a), " \* " indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos contra CRE, EXE e CRE + EXE, n.s. indica que não existe diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Em (b) " \* " e " \*\* " indicam uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos assinados.

**Tabela 1.** Atribuição de banda geral de espectro de FT-IR do músculo esquelético.

| Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Definição da atribuição espectral   |
|-------------------------------------|---|
| 3307                                | Principalmente alongamento N-H (amida A) de grupos amida de proteínas, com a pequena contribuição do alongamento O-H de polissacarídeos e ligações H intermoleculares                     |
| 3012                                | Olefinico = vibração de alongamento de CH: lípides insaturados, ésteres de colesterol   |
| 2962                                | Alongamento assimétrico de CH3: lípides, cadeias laterais de proteínas, com alguma contribuição de carboidratos e ácidos nucleicos  |
| 2929                                | Alongamento assimétrico de CH2: principalmente lípides, com alguma contribuição de proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos  |
| 2874                                | Alongamento simétrico de CH3: cadeias laterais de proteínas, lípides, com alguma contribuição de carboidratos e ácidos nucleicos  |
| 2855                                | Alongamento simétrico de CH3: principalmente cadeias laterais de proteínas, lípides, com alguma contribuição de carboidratos e ácidos nucleicos   |
| 1656                                | Amida I (estiramento de proteína C=O)   |
| 1540                                | Amida II (curvatura N-H, alongamento C-N da proteína)   |
| 1452                                | Curvatura de CH2: lípides   |
| 1392                                | Alongamento simétrico de COO-: ácidos graxos  |
| 1261                                | Alongamento simétrico de PO2-, não ligado a hidrogênio: principalmente ácidos nucleicos com a pequena contribuição de fosfolípides  |
| 1236                                | Alongamento de sulfato de proteoglicanos, vibração de amida de colágeno III com mistura significativa com vibração de agitação de CH2 da estrutura de glicina e cadeia lateral de prolina |
| 1170                                | Alongamento assimétrico de CO-O-C: fosfolípides, triglicérides e ésteres de colesterol  |
| 1080                                | Alongamento simétrico de PO2-: ácidos nucleicos e fosfolípides. Estiramento de C-O: glicogênio, polissacarídeos, glicolipídeos  |
| 976                                 | Alongamento de C-N-C: ácidos nucleicos, ribose-fosfato da cadeia principal de vibrações de RNA  |



a suplementação de Cr, uma vez que as bandas de amida I e amida II estão localizadas em uma região livre de interferência, facilitando assim a identificação da proteína.<sup>18,24</sup>

Uma vez que a intensidade do sinal FT-IR é diretamente proporcional à concentração presente de marcadores no tecido do músculo esquelético podemos determinar que houve uma alteração significativa nas proteínas secundárias após o protocolo experimental EXE e CRE+EXE. Considerando-se que a suplementação de Cr promove o aumento da hidratação celular e assim estimulando a síntese proteica ou diminui a degradação de proteínas<sup>25</sup> e estas alterações estruturais foram características nos espectros FT-IR, é possível inferir que a suplementação com Cr (grupo CRE) promoveu um aumento no conteúdo proteico e quando conciliado a suplementação o exercício físico (grupo CRE+EXE) potencializou a intensidade do sinal do espectro que indica alteração positiva na concentração de proteínas secundárias do tecido muscular estriado esquelético.

No entanto, no presente estudo, podemos visualizar que no grupo EXE mostrou uma maior intensidade na banda de amida II (1546 cm<sup>-1</sup>), em relação aos grupos CRE e SED, corroborando assim com a eficácia do exercício físico.

Utilizando outras técnicas de análise, estudos em seres humanos e animais demonstraram que a suplementação de Cr pode aumentar o conteúdo intracelular deste produto,<sup>17</sup> assim favorecendo o conteúdo proteína ou por sua síntese ou retardando sua depleção.<sup>10,26</sup>

## CONCLUSÃO

Foi demonstrado que a técnica de espectroscopia FT-IR utilizada nas banda de amida I (1656 cm<sup>-1</sup>) e amida II (1546 cm<sup>-1</sup>) é capaz de monitorar o conteúdo proteico secundária no tecido muscular de ratos sedentários, suplementados com Cr e submetidos ao treinamento físico. Se confirmado por técnica consideradas padrão-ouro, espectroscopia FT-IR pode ser outra maneira de explicar o efeito da suplementação de Cr conciliado ao exercício físico sobre o tecido muscular esquelético.

---

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

---

---

**CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:** Cada autor contribuiu individual e significativamente para o desenvolvimento deste artigo. DPJ: coleta geral de dados, elaboração da planilha Excel com inclusão dos dados, tradução do resumo para inglês e português e preparação do formato e envio do artigo; DPJ e HLM: análise estatística e apresentação das tabelas; DPJ e RAS: tradução do trabalho para o inglês; WR: revisão crítica do artigo.

---

## REFERÊNCIAS

1. Bemben, M. G., and H. S. Lamont HS. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. *Sports Med.* 2005;35(2):107–125, 2005.
2. Jerônimo, DDP, De Souza, RA, Da Silva, FF, Camargo, GL, Miranda, ML, Xavier, M, et al. Sakame, KK, Ribeiro, W. Detection of Creatine in Rat Muscle by FTIR Spectroscopy. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(9):2069-77. *Annals of Biomedical Engineering*, 40(9): 2069-77, 2012. Doi: 10.1007/s10439-012-0549-9.
3. Walker, J. B. Creatine: biosynthesis, regulation and function. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Bio.* 1979;50(1):177–242., 1979.
4. Greenhaff, P. L. The creatine-phosphocreatine system: there's more than one song in its repertoire. *J. Physiol.* 2001;537(Pt 3):657, 2001.
5. Persky, A. M., and G. A. Brazeau GA. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol. Rev.* 2001;53(2):161–176., 2001.
6. Preen, D, B. Dawson B, C. Goodman C, J. Beilby J, and S. Ching S. Creatine supplementation: a comparison of loading and maintenance protocols on creatine uptake by human skeletal muscle. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 2003;13(1):97–111., 2003.
7. Preen, D. B., B. T. Dawson BT, C. Goodman C, J. Beilby J, and S. Ching S. Comparison of erythrocyte and skeletal muscle creatine accumulation following creatine loading. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 2005;15(1):84–93, 2005.
8. Liu, K. Z., M. H. Shi MH, and H. H. Mantsch HH. Molecular and chemical characterization of blood cells by infrared spectroscopy: a new optical tool in hematology. *Blood Cells Mol. Dis.* 2005; 35(3):404–412., 2005.
9. Naumann, D. *Infrared Spectroscopy in Microbiology.* Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2000.
10. Duerst, M. D. *Spectroscopic Methods of Analysis: Infrared Spectroscopy* Department of Chemistry, University of Wisconsin-River Falls, River Falls, Wisconsin, U.S.A. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 2007. Doi: 10.1081/E-EPT-100200020.
11. Neary, J. P. Application of near infrared spectroscopy to exercise sports science. *Can. J. Appl. Physiol.* 2004;29(4):488–503, 2004.
12. Dong A, Jones LS, Kerwin BA, Krishnan S, Carpenter JF. Secondary structure adsorbed onto aluminum hydroxide: Infrared spectroscopic analysis of proteins from low solution concentrations. *Anal Biochem.* 2006; 351(2): 282–289., 2006.
13. Kong, J., Yu, S. *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures.* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).2007;Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 39(8): 549–559., 2007.
14. Krimm S, Bandekar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv Protein Chem.* 1986; 38: 181–364, 1986.
15. Gagnon, M., M. Maguire M, M. Macdermott M, and A. Bradford A. Effects of creatine loading and depletion on rat skeletal muscle contraction. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2002; 29(10):885–890., 2002.
16. Mcguire, M., A. Bradford A, and M. Macdermott M. Contractile properties of the diaphragm in creatine-fed rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2002;29(9):782–783., 2002.
17. Wang, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 2000;203(1-2):1–60., 2000.
18. Bozkurt, O., M. Severcan M, and F. Severcan F. Diabetes induces compositional, structural and functional alterations on rat skeletal soleus muscle revealed by FTIR spectroscopy: a comparative study with EDL muscle. *Analyst.* 2010; 135(12):3110–3119., 2010. DOI: 10.1039/c0an00542h.
19. Osorio, R. A., J. S. Christofani JS, V. D'almeida V, A. K. Russo AK, and I. C. Picarro IC. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 2003;C 135(1):89–95., 2003.
20. Ipsiroglu, S. O., C. Stromberger C, J. Ilas J, H. Ho' ger H, A. Mu' hl A, and S. Ipsiroglu-Stockler S. Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine monohydrate in various animal species. *Life Sci.* 2001;69(15):1805–1815., 2001.
21. Kreider, R. B. Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. *Mol. Cell. Biochem.* 2003;244(1–2):89–94., 2003.
22. Casey, A., and P. L. Greenhaff PL. Does creatine supplementation play a role in skeletal muscle metabolism and performance? *Am. J. Clin. Nutr.* 2000;27(2 Suppl):607S–617S., 2000.
23. Gallant, M., R. Margaret R, S. Adriana S, R. D. B. Marc RDB, W. David W, Y. Jin Y, et al. J. Robert, and M. G. Kathleen. Focally elevated creatine detected in amyloid precursor protein (app) transgenic mice and Alzheimer disease brain tissue. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A. J. Biol. Chem.* 2006;281(1): 5–8., 2006.
24. Harris, R. C., K. Soderlund K, and E. Hultman E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin. Sci.* 1992;83(3):367–374., 1992.
25. Clark, JF. Creatine and Phosphocreatine: A review of their use in exercise and sport. *Anal Biochem.* 2006;351(2):282-9. *Journal of Athletic Training*, 32: 45-50, 1997.
26. Terjung, R. L., P. Clarkson P, E. R. Eichner ER, P. L. Greenhaff PL, P. J. Hespel PJ, R. G. Israel RG, et al. W. J. Kraemer, R. A. Meyer, L. L. Spriet, M. A. Tarnopolsky, A. J. Wagenmakers, and M. H. Williams. American College of Sports Medicine roundtable. The physiological and effects oral creatine supplementation. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2000;32(3):706–717., 2000.