



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DANIELE APARECIDA MAIA CLETO

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS  
X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF) PARA ANÁLISE DE  
AMOSTRAS DE SALIVA E PLASMA DE ATLETAS PRÉ E  
PÓS ESFORÇO FÍSICO**

---

Londrina  
2017

DANIELE APARECIDA MAIA CLETO

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS  
X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF) PARA ANÁLISE DE  
AMOSTRAS DE SALIVA E PLASMA DE ATLETAS PRÉ E  
PÓS ESFORÇO FÍSICO**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Física.

Orientador: Prof. Dr. Avacir Casanova Andrello

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Cleto, Daniele Aparecida Maia.

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF) PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SALIVA E PLASMA DE ATLETAS PRÉ E PÓS ESFORÇO FÍSICO / Daniele Aparecida Maia Cleto. - Londrina, 2017.  
117 f. : il.

Orientador: Avacir Casanova Andrello.

Tese (Doutorado em Física) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Física, 2017.

Inclui bibliografia.

1. TXRF, Saliva, Plasma - Tese. I. Andrello, Avacir Casanova . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

DANIELE APARECIDA MAIA CLETO

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS  
X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF) PARA ANÁLISE DE  
AMOSTRAS DE SALIVA E PLASMA DE ATLETAS PRÉ E  
PÓS ESFORÇO FÍSICO**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Física.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Avacir Casanova Andrello  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Appoloni  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dra. Solange de Paula Ramos  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Fábio Melquiades  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Eduardo Inocente Jussiani  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 21 de Dezembro de 2017.

*A Deus, por ter aberto as portas e mostrado o caminho. A meus familiares e a todos que me ajudaram a chegar aqui ...a meu pai que se foi, deixando para trás um imenso vazio onde antes contávamos com uma presença marcante, firme e segura. As saudades ainda são grandes, marca a falta física de um sorriso, um afago, uma palavra. Foi, contudo, no meio dessa ausência que compreendi a dimensão do ser eterno, da porção que fica e que, apesar de invisível, é sensível e vive dentro de nós. Por isso, mesmo que hoje algumas lágrimas se vertam ante a falta de seu abraço, essas não serão suficientes para apagar a certeza de estarmos juntos a dividir toda a emoção deste momento.*

*Hoje, neste dia tão importante, te sinto presente, dentro de mim, feliz por nossa vitória.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Avacir Casanova Andrello, pois sem ele a qualidade deste trabalho e a formação desta doutoranda estariam comprometidas. Agradeço pela dedicação, por ter me aceitado como aluna de doutorado e pela paciência.

Gostaria de agradecer a minha mãe pelo apoio que me deu durante toda minha jornada. Aos meus irmãos (Beto, Rodrigo, Carlos) e minha irmã Eliane, e todos os meus sobrinhos.

Gostaria de agradecer a minha prima Cristiane pelo apoio físico e mental, por ter me ajudado nos momentos bons e nos mais difíceis durante toda a minha jornada.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Appoloni e ao Prof. Dr. Fabio Melquiades por aceitarem participar sem hesitar da composição da banca examinadora de qualificação, ajudando na melhora do andamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Inocente, a Prof. Dra. Solange de Paula e novamente ao Prof. Appoloni e Prof. Fabio por aceitarem a participar da banca examinadora deste trabalho.

A Prof. Solange pela disponibilidade das amostras de saliva e ajuda nas análises.

Ao Laboratório de Física Nuclear Aplicada (LFNA) pela utilização do espaço físico e da infraestrutura para a obtenção dos espectros de fluorescência. E também a todos que fazem parte dele, pois contribuíram direta e indiretamente com a realização deste trabalho. Especialmente ao Madson, Lucas e Ana Poletto que me ajudaram nas horas que mais precisei.

Agradeço aos meus amigos e amigas que fizeram parte de minha longa jornada.

Agradeço a Jesus Cristo pelo amor que me faz querer viver melhor cada dia.

*“A vida é uma folha em branco  
multicolorida ....*

*Nós como lápis vamos desenhando, escrevendo, riscando, rabiscando, quebrando a ponta,  
apontando nossa ponta, vamos gastando os traços, circulando.*

*Alguns lápis vivem só de rabisco , outros criam belezas fascinantes, o certo é que ao  
final da folha, no fim do lápis, o que resta, ou melhor, o que fica, é tudo que foi escrito,  
tudo que foi desenhado. O que fica é a obra.  
A obra é o que fica do lápis”.*

**Eduardo Colamego**

CLETO, Daniele Ap<sup>a</sup> M. **APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF) PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PLASMA E SANGUE DE ATLETAS PRÉ E PÓS ESFORÇO FÍSICO.** 2017. 117. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

Parâmetros salivares e sanguíneos fornecem diferentes dados sobre a assimilação do programa de treinamento e possibilitam o entendimento das adaptações do organismo à prática esportiva. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi quantificar e comparar as alterações das concentrações dos elementos químicos presentes na saliva e plasma utilizando a técnica (TRXF), em resposta à simulação de jogo de futsal de atletas que disputaram a série prata do campeonato de futsal (segunda divisão do campeonato paranaense) e também em resposta à fase preparatória para competições de alto nível em atletas de jiu jitsu. Participaram do estudo treze atletas experientes de futsal ( $26,4 \pm 7,8$  anos de idade;  $71,4 \pm 7,2$  Kg e  $1,75 \pm 0,06$  m) e 12 atletas de jiu jitsu de faixa roxa, marrom e preta entre (23 a 25 anos de idade; 79,06 Kg e 1,76 m). Os atletas de futsal foram submetidos a coletas salivares e sanguíneas em dois momentos: 1) antes da simulação do jogo (pré) e 2) após a simulação do jogo (pós), os atletas de jiu jitsu foram submetidos em três momentos: em jejum (pré), 2) após quatro semanas de treino (pós 1) e 3) após oito semanas de treino (pós 2). Os elementos químicos identificados nas amostras de saliva e plasma foram P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Se, Rb, Hg e Pb. Embora tenham sido identificados vários elementos nas amostras analisadas, nem todos os elementos são encontrados em algumas amostras de saliva e plasma dos indivíduos em estudo. As concentrações dos elementos na saliva e sangue (futsal) foram maiores no momento (pré) se comparado ao momento (pós) e as concentrações dos elementos na saliva (jiu jitsu) foram maiores no momento (pré), uma diminuição no momento (pós 1) e um aumento no momento (pós 2).

**Palavras-chaves:** Fluorescência de Raios X por Reflexão Total, Saliva, Plasma.



CLETO, Daniele Ap<sup>a</sup> M. **APPLICATION OF X-RAY FLUORESCENCE TECHNIQUE BY TOTAL REFLECTION (TXRF) FOR ANALYSIS OF SALIVA AND PLASMA SAMPLES OF ATHLETES BEFORE AND AFTER PHYSICAL EFFORT**. 2017. 117. Tese (PhD Thesis in Physics) - Universidad Estadual de Londrina, Londrina/PR, 2017.

### ABSTRACT

Salivary and blood parameters provide different data about the assimilation of the training program and allow the understanding of the adaptations of the organism to the sport practice. In this way, the objective of this paper is to quantify and compare the changes in the concentrations of chemical elements present in saliva and plasma of Futsal and Jiu-Jitsu athletes. Using the technique (TRXF), this comparison is made through the Futsal game simulation of athletes who competed in the second league (silver series) of the championship of Futsal of Paraná and the preparatory phase for high-level competitions in athletes of Jiu-Jitsu. Under study, they were thirteen experienced Futsal athletes ( $26.4 \pm 7.8$  years old,  $71.4 \pm 7.2$  kg and  $1.75 \pm 0.06$  m) and twelve Jiu-Jitsu athletes with purple, brown and yellow belts (23 the 25 years old, 79,06 kg and 1.76 m). The Futsal athletes were submitted to salivary and plasma collections in two stages: 1) before the game simulation (pré) e 2) after the game simulation (pós). The Jiu-Jitsu athletes were submitted in three stages: during the fasting (pré), 2) after four weeks of training (pós 1) and 3) after eight weeks of training (pós 2). The chemical elements identified in the saliva and plasma samples were P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Se, Rb, Hg and Pb. Although several elements were identified in the analyzed samples, not all elements were found in some saliva and plasma samples from the individuals under study. The concentrations of the elements in the saliva and plasma (Futsal) were higher in the stage (pré) when compared to the stage (pós) and the concentrations of the elements in the saliva (Jiu-Jitsu) were higher in the stage (pre), a decrease in the stage (pós) and an increase in the stage (pós 2).

**Keywords:** X-ray Fluorescence by Total Reflection, Saliva, Plasma.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	20
3	REVISÃO NA LITERATURA .....	21
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	25
4.1	RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA .....	25
4.2	PRODUÇÃO DE RAIOS X .....	26
4.2.1	EFEITO FOTOELÉTRICO .....	28
4.2.2	ESPALHAMENTO COMPTON .....	29
4.2.3	ESPALHAMENTO RAYLEIGH .....	31
4.3	FUNDAMENTOS DA FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X .....	32
4.3.1	EXCITAÇÃO DOS ELEMENTOS .....	34
4.3.2	LINHAS ESPECTRAIS .....	35
4.4	FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X .....	37
4.4.1	DETECÇÃO E MEDIDAS DOS RAIOS X .....	40
4.4.2	EQUAÇÃO FUNDAMENTAL PARA FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X .....	42
4.5	LLD - LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO.....	43
4.6	TXRF- FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL .....	44
5	TESTES ESTATÍSTICOS .....	48
5.1	TESTES DE NORMALIDADE .....	48
5.1.1	TESTE DE SHAPIRO-WILK.....	49
5.1.2	DISTRIBUIÇÃO LOGNORMAL .....	49
5.2	TESTE T DE AMOSTRAS PAREADAS.....	50
5.3	CORRELAÇÃO.....	50
6	MATERIAIS E MÉTODOS .....	53
6.1	DISCO DE ACRÍLICO UTILIZADO.....	53
6.2	COLETA DAS AMOSTRAS.....	54
6.2.1	COLETAS DAS AMOSTRAS DE SALIVA E SANGUE DOS ATLETAS DE FUTSAL .....	54

6.2.2	COLETA DAS AMOSTRAS DE SALIVA DOS ATLETAS DE JIU JITSU .....	56
6.3	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	57
6.4	AMOSTRAS CERTIFICADAS DE ÁGUA .....	58
6.5	SISTEMA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF) ....	58
6.5	MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL .....	60
7	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
7.1	ELEMENTOS MEDIDOS .....	61
7.2	AMOSTRAS CERTIFICADAS NIST 1640E .....	61
7.3	AMOSTRAS DE SALIVA DOS ATLETAS DE FUTSAL.....	66
7.4	AMOSTRAS DE PLASMA DOS ATLETAS DE FUTSAL.....	66
7.4.1	CORRELAÇÃO SALIVA E PLASMA (PRÉ E PÓS) .....	71
7.4.2	CORRELAÇÃO SALIVA E PLASMA (PRÉ) .....	72
7.4.3	CORRELAÇÃO SALIVA E PLASMA (PÓS).....	76
7.4.4	CORRELAÇÃO PLASMA (PRÉ E PÓS) COM MEDIADORES INFLAMATÓRIOS .....	80
7.5	AMOSTRAS DE SALIVA DOS ATLETAS DE JIU JITSU .....	82
7.5.1	PSE- PERCEPÇÃO SUBJETIVA DE ESFORÇO .....	89
	CONCLUSÃO.....	94
	REFERÊNCIAS .....	94
	APÊNDICE A1- CONCENTRAÇÕES ELEMENTARES NAS SALIVAS DOS ATLETAS .....	102
	APÊNDICE A2- DOCUMENTOS DE CONSENTIMENTO AUTORIZADO E AFINS	108
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO FUTSAL .....	109
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO JIU JITSU.....	112

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1- Esquema simplificado de uma onda eletromagnética viajando no espaço. .....	25
Figura 4.2 – Espectro eletromagnético e suas aplicações. ....	26
Figura 4.3 – Representação esquemática da emissão dos raios X característicos. ....	27
Figura 4.4 – Representação esquemática do efeito fotoelétrico. ....	28
Figura 4.5 - Ilustra o esquema do espalhamento Compton. ....	30
Figura 4.6 - Esquema simplificado do espalhamento Rayleigh. ....	32
Figura 4.7 - Etapas básicas da análise por EDXRF. ....	34
Figura 4.8 - Diagrama parcial dos níveis de energia para as linhas espectrais das séries K e L de um elemento. ....	36
Figura 4.9 - Representação esquemática do efeito Auger para um átomo de magnésio. ....	37
Figura 4.10 - Coeficiente de absorção de massa em função da energia, para os elementos cálcio, cobre e urânio. ....	39
Figura 4.11 - Rendimento da fluorescência das camadas K, L e M em função do número atômico. ....	40
Figura 4.12 - Resolução de alguns detectores para os raios X característicos emitidos pela prata. ....	41
Figura 4.13 - Representação esquemática da refração e reflexão de um feixe de radiação monoenergético em função do ângulo crítico de incidência. ....	45
Figura 4.14 - Geometria de excitação/detecção da TXRF, com linhas contínuas representando os raios X incidentes e espalhados, e os tracejados os raios X característicos. ....	46
Figura 6.1 - (a) Disco de acrílico, (b) suporte para deposição das amostras e (c) suporte para secagem e armazenagem das mesmas. ....	54
Figura 6.2 - Apresenta a logística da coleta das amostras de futsal. ....	55
Figura 6.3 - Apresenta a logística da coleta das amostras de jiu jitsu. ....	57
Figura 6.4 - Esquema representativo em ordem de etapas. ....	58
Figura 6.5 - Sistema de TXRF, a) espectrômetro e b) computador. ....	58
Figura 6.6 - Pico do elemento Ni. ....	60
Figura 7.1 - Exemplo de espectros das amostras de saliva (pré e pós) de um atleta de futsal. ....	62

Figura 7.2 - Gráfico referente à comparação das concentrações das amostras de saliva de cada atleta (pré e pós).....	66
Figura 7.3 - Exemplo de espectros das amostras de plasma (pré e pós) de um atleta de futsal... ..	67
Figura 7.4 - Gráfico referente à comparação das concentrações das amostras de plasma (pré e pós) dos atletas de futsal.. ..	70
Figura 7.5 - Gráfico referente ao teste de correlação de Pearson e Spearman das amostras de saliva e plasma (pré), (pré) significa antes da simulação do jogo.. ..	76
Figura 7.6 - Gráfico referente ao teste de correlação de Pearson e Spearman das amostras de saliva e sangue (plasma) (pós), (pós) significa após o jogo. $R^2$ é o coeficiente de determinação, r teste de Pearson e Spearman... ..	75
Figura 7.7 - Exemplo de espectros das amostras de saliva (pré, pós 1 e pós 2) dos atletas de jiu jitsu.....	82
Figura 7.8 - Gráfico referente à comparação das médias das concentrações junto com o desvio padrão das amostras de saliva (pré, pós 1 e pós 2) dos atletas de jiu jitsu.....	89
Figura 7.9 – PSE do treinamento físico e técnico dos atletas de jiu jitsu.....	90
Figura 7.10 – Concentração de cortisol comparada com o elemento Br dos atletas de jiu jitsu.....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Coeficientes de Correlação.....	51
Tabela 6.1 – Referente aos dados da altura, peso e idade dos atletas de futsal.....	55
Tabela 7.1– Concentrações ( $\mu g/L$ ) das amostras certificadas e medidas NIST 1640e.....	61
Tabela 7.2 - Teste de normalidade, (pré) significa antes da simulação do jogo e (pós) significa após a simulação do jogo. P-valor é a probabilidade de significância, W teste de normalidade de Shapiro-Wilk e CV coeficiente de variação dado em porcentagem.....	63
Tabela 7.3 - Teste de normalidade para conjunto de dados lognormais, (pré) significa antes da simulação do jogo e (pós) significa após a simulação do jogo. P-valor é a probabilidade de significância, W teste de normalidade de Shapiro-Wilk. ..	64
Tabela 7.4 - Teste de normalidade para o conjunto de dados das amostras de plasma, (pré) significa antes da simulação do jogo e (pós) significa após a simulação do jogo. P-valor é a probabilidade de significância, W teste de normalidade de Shapiro-Wilk e CV coeficiente de variação dado em porcentagem. ....	68
Tabela 7.5 - Teste de normalidade para conjunto de dados lognormais das amostras de plasma, (pré) significa antes da simulação do jogo e (pós) significa após a simulação do jogo. P-valor é a probabilidade de significância, W teste de normalidade de Shapiro-Wilk.....	69
Tabela 7.6 - Correlação dos elementos identificados com a distância total percorrida pelos atletas e mediadores inflamatórios para atletas de futsal, (pré) significa antes da simulação do jogo e (pós) após a simulação do jogo.....	81
Tabela 7.7 - Teste de normalidade para o conjunto de dados das amostras de saliva dos atletas de jiu jitsu, (pré) significa em jejum, (pós 1) após 4 semanas de treino e (pós 2) após 8 semanas de treino. P-valor é a probabilidade de significância, W teste de normalidade de Shapiro-Wilk e CV coeficiente de variação dado em porcentagem. ....	84
Tabela 8.1 – Comparação das concentrações do presente trabalho com as concentrações da literatura.....	85
Tabela A.1 - Concentrações elementares de saliva (pré) dos elementos medidos em $mg/L$ dos atletas de futsal. Letra A representa os atletas e DP desvio padrão. ....	95

Tabela A.2 - Concentrações elementares de saliva (pós) dos elementos medidos em <i>mg/L</i> das amostras dos atletas de futsal. Letra A representa os atletas e DP desvio padrão.....	96
Tabela A.3 - Concentrações elementares de sangue plasma (pré) dos elementos medidos em <i>mg/L</i> . Letra A representa os atletas e DP desvio padrão.....	97
Tabela A.4 - Concentrações elementares de plasma (pós) dos elementos medidos em <i>mg/L</i> . Letra A representa os atletas e DP desvio padrão.....	98
Tabela A.5 - Concentrações elementares de saliva (pré) dos elementos medidos em <i>mg/L</i> . Letra A representa os atletas de jiu jitsu e DP desvio padrão .....	99
Tabela A.6 - Concentrações elementares de saliva (pós 1) dos elementos medidos em <i>mg/l</i> . Letra A representa os atletas de jiu jitsu e DP desvio padrão .....	99
Tabela A.7 - Concentrações elementares de saliva (pós 2) dos elementos medidos em <i>mg/L</i> . Letra A representa os atletas de jiu jitsu e DP desvio padrão. ....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

XRF – X-Ray Fluorescence = Fluorescência de raios X

EDXRF – Energy Dispersive X-Ray Fluorescence = Fluorescência de raios X por dispersão em energia

WDXRF – Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence = Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda

TXRF – Total Reflection X-Ray Fluorescence = Fluorescência de raios X por reflexão total

$\mu$ EDXRF – microfluorescência de raios X

PXRF – Portable X-Ray Fluorescence = Fluorescência de raios X portátil

ppb – Parte por bilhão

AXIL – Analysis of X-ray Spectra by Iterative Least Squares Fitting

FWHM – Full Width at Half Maximum = Largura total a meia altura máxima

LLD – Lower Limits Detection = Limite mínimo de detecção

cps – Contagem por segundo

$\sigma_B$  – Desvio padrão da área líquida

LFNA – Laboratório de Física Nuclear Aplicada

UEL – Universidade Estadual de Londrina



## 1 INTRODUÇÃO

O futsal é caracterizado pela grande presença de atividades que demandam muita força e, em especial, muitas ações excêntricas (MOUGIUS, M., 2007). Este tipo de ação muscular implica uma alta magnitude de microtraumas musculares (FRIDEN, J., LIEBER, R.L., 1998) em especial, em atividades intermitentes (THOMPSON, D., et al, 2001 e THOMPSON, D., et al, 1999). Muitos estudos mostram que o exercício provoca alterações agudas e crônicas no sistema imune (GLEESON, M., 2007), que são dependentes do tipo, intensidade e volume do mesmo (SHEPARD *et al.*, 1994).

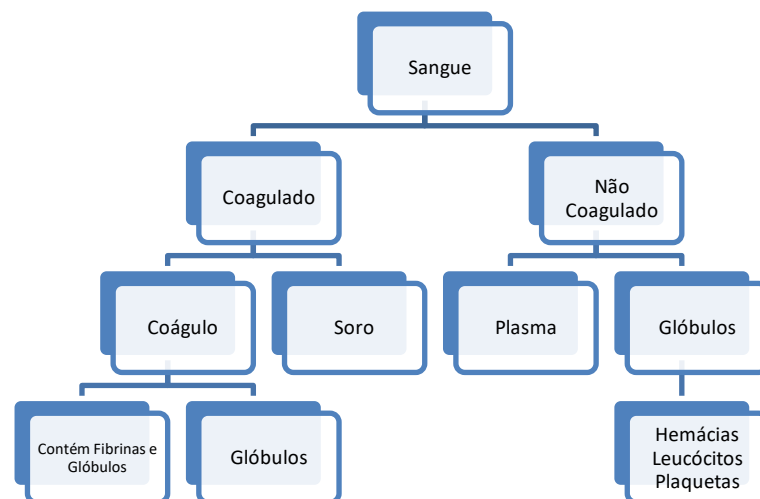
O jiu jitsu é uma modalidade de luta com predomínio de ações de contração isométrica de alta intensidade e natureza intermitente, e com alta demanda anaeróbica durante os momentos de ataque, contra-ataque e defesa (ANDREATO, FRANCHINI et al. 2013; DA SILVA, IDE et al. 2014; ANDREATO, JULIO et al. 2015). O metabolismo aeróbico também é um componente importante, uma vez que é necessário para manter a alta intensidade de ações de luta e promover a rápida recuperação do metabolismo energético nos momentos de pausa e ações de baixa intensidade (DA SILVA, IDE et al. 2014). O treinamento físico de intensidade moderada melhora os sistemas de defesa do organismo, enquanto o mais intenso causa imunossupressão temporária (ANGELI *et al.*, 2004; DA NOBREGA *et al.*, 2005).

Monitorar atletas ao longo de treinos e competições é importante para evitar infecções e inflamações decorrentes dos treinos. Entretanto, um inconveniente para a avaliação de atletas é que na maioria das vezes é necessário à coleta de amostras de sangue venoso, o que para muitos indivíduos é um procedimento desconfortável. Para minimizar o desconforto dos atletas, vem sendo comum a utilização da saliva para as análises bioquímicas e imunológicas utilizada como alternativa ao sangue (FARIA. M. A. C. e Costa. K. A.; 2013). Sua coleta é não invasiva e por não apresentar riscos durante a mesma, torna seu manejo muito mais seguro (GRÖSCHL, 2008; KAUFMAN & LAMSTER 2002). Neste sentido, a pesquisa tem crescido muito nos últimos anos e vem sendo utilizada para a identificação de elementos químicos em materiais biológicos.

A saliva é um dos fluidos biológicos mais complexos, versáteis e importantes para o corpo humano, sendo eficaz na preservação da saúde bucal

facilitando a mastigação, digestão dos alimentos e na lubrificação da estrutura da boca e orofaringe. Desempenha outras funções tais como, defesa local e sistêmica da cavidade bucal, da região da orofaringe e do trato gastrointestinal superior. (LIMA, F. O. de; RAMALHO, M. J. P.; RUMMLER, M. do C. O. e RODRIGUEZ, T. T., 2008). Possui concentrações mensuráveis de alguns metabólitos (ureia, ácido úrico, lactato), enzimas ( $\alpha$ -amilase) e imunoglobulina A (IgA) que podem ser utilizados para avaliar o estresse metabólico, psicológico e o sistema imune do atleta (CHICHARRO *et al.*, 1994; NIEMAN *et al.*, 2002). O organismo produz uma quantidade total de aproximadamente 1 a 1,5 L de saliva ao dia. (MÖLLER, P. *et al.*, 2003)

O sangue é uma suspensão de células (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) em um líquido complexo, chamado plasma, constituído por água, sais minerais, vitaminas, proteínas, glicídios e lipídios. Fora do organismo, o sangue coagula e libera uma fase líquida chamada soro. O soro difere do plasma por não conter fibrinogênio, proteína que ajuda na coagulação sanguínea (ABURAYA, J.H., 2005). Na centrifugação do sangue total separam-se os glóbulos do plasma, como mostra o esquema abaixo. O volume total do sangue é de aproximadamente 5,5 L para o homem e 4,8 L para a mulher.



A avaliação de atletas através de biomarcadores pode contribuir para a compreensão das respostas imunológicas resultantes de uma única sessão de exercício ou do treinamento físico realizado em longo prazo, podendo também auxiliar na ampliação do conhecimento científico e na adequação da prescrição individualizada do esforço, diminuindo o risco de lesões e infecções decorrentes do

treinamento intenso. O crescente interesse nos efeitos dos fluidos biológicos (saliva e sangue) no organismo humano gerou uma procura por medidas cada vez mais confiáveis e precisas, o que evidenciou a necessidade de técnicas analíticas mais eficazes.

Essa investigação pode ser realizada por uma variedade de técnicas e métodos analíticos de caracterização (ICP-MS, INAA, PIXE, ICP-AES, AAS, XRF, PXRF e TXRF). A Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) vem sendo utilizada principalmente na análise de elementos traço na faixa de  $ng.g^{-1}$  em amostras líquidas da ordem de  $\mu L$ , em pesquisas relacionadas ao monitoramento ambiental, biomedicina. (CLETO, D. A. M.; 2013). A grande vantagem da TXRF sobre outras técnicas é que ela consiste em uma análise rápida, multielementar, preparação simplificada da amostra, baixo custo de execução (quando comparada com as demais), preserva a integridade física das amostras e uma determinação de vários elementos químicos da amostra a ser analisada na ordem de grandeza de ppb. É uma técnica bem adequada para estudar concentrações de elementos traços em amostras biomédicas, pois se pode observar contaminação de elementos pesados com o uso da espectroscopia de raios X. (KUBALA-K, A. BRAZIEWICZ, J., PAJEK, M., 2004).

Baseado em tudo que foi exposto aqui, pode-se perceber a importância da identificação dos elementos químicos na saliva e no plasma. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi determinar e fazer a comparação das concentrações dos elementos químicos presentes na saliva e no plasma dos atletas de futsal e jiu jitsu no momento (pré e pós) esforço físico.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é aplicar a metodologia de fluorescência de raios X por reflexão total nas análises de amostras de saliva e plasma e obter uma correlação dos dados a fim de corroborar o uso da saliva como amostra para diagnóstico. Objetivo secundário foi de quantificar a concentração de elementos químicos nas amostras de saliva e sangue de atletas de futsal e investigar os níveis de minerais e elementos traços em amostras de saliva de atletas de Jiu-jitsu após um período de treinamento intenso, seguido por um período de carga baixa.

### 3 REVISÃO NA LITERATURA

CLETO, D.A.M. et al (2016) utilizaram a técnica fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) nas análises das amostras de saliva coletada na saída do ducto da glândula parótida e no sulco entre os dentes 46 e 47 de sete indivíduos escolhidos aleatoriamente. Com o uso da técnica TXRF o objetivo do trabalho foi de avaliar qualitativamente os resultados obtidos. Os elementos químicos identificados nas amostras de saliva e sulco gengival foram P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Rb, e Pb. Embora tenham sido identificados vários elementos nas amostras analisadas, nem todos os elementos são encontrados nos espectros nas amostras de saliva dos indivíduos em estudo. Comparando os resultados qualitativos obtidos para as amostras de saliva e sulco, pode-se observar que nas amostras de saliva coletadas no sulco foi possível identificar alguns elementos não encontrados nas amostras de saliva coletados na glândula parótida. Portanto, a análise utilizada é satisfatória para identificar elementos na saliva da glândula e do sulco gengival. A TXRF apresentou-se como uma boa técnica de análise de amostras de saliva.

GAMA, E.M et al (2017) analisaram 15 elementos inorgânicos (P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, As, Rb, Sr e Pb) através do método de análise direta em amostras de cervejas pela técnica (TXRF). A análise direta foi comparada com o procedimento de digestão ácida para avaliar o efeito matriz e os resultados foram satisfatórios. A avaliação da acurácia e precisão foram realizadas através da análise de dois materiais de referência certificados de águas naturais e residuais. Para a maioria dos elementos, foram alcançados resultados bons entre o valor certificado e o valor medido no CRM's. O método foi aplicado a 30 amostras de cerveja coletadas em várias regiões do Brasil. Os intervalos de concentrações em *mg/L* para os analitos estudados foram: P: (37,40-140,85); S (10,32-50,73); Cl (82,74-281,7); K (183,8-418,5); Ca (9,82-96,0); Mn (0,06-1,42); Fe (0,07-1,57); Ni (<LLD-1,13); Cu (<LLD-0,32); Zn (0,02-1,98); Como (<LLD-0,10); Br (0,01-2,04); Rb (<LLD-0,52); Sr (<LLD-0,41) e Pb (<LLD-0,18). Algumas amostras de cerveja mostraram concentrações de As e Pb acima dos níveis estabelecidos pela legislação brasileira. O método desenvolvido é simples, rápido, consome baixas quantidades de reagentes e permite a determinação de um grande número de analitos simultaneamente.

ARAÚJO, L. De A. (2016) avaliaram os níveis séricos de ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn) e o estado nutricional de portadoras de câncer de mama. O estudo foi realizado em 38 portadoras de câncer de mama em tratamento oncológico e em 37 mulheres saudáveis. Foram coletadas amostras de sangue de ambos os grupos e de parâmetros antropométricos e aplicada a Avaliação Subjetiva Global produzida pelo paciente (ASG-PPP) no grupo com neoplasia. A determinação sérica dos microelementos foi realizada por fluorescência de raios X por reflexão total com radiação síncroton (SR-TXRF). O Fe sérico foi mais elevado nas mulheres com câncer de mama ( $1,72 \pm 1,15$  mg/L) do que nas mulheres sem câncer ( $1,17 \pm 0,48$  mg/L;  $p=0,004$ ). De acordo com a circunferência muscular do braço (CMB), foi observada maior prevalência de mulheres eutróficas (60,5%) que, paralelamente, apresentaram nível sérico de ferro abaixo da média ( $p=0,011$ ). Não houve diferenças significativas quanto aos teores séricos de Cu entre pacientes com neoplasias mamárias e saudáveis ( $1,44 \pm 0,30$  e  $1,45 \pm 0,39$ , respectivamente), todavia foi observado teores de Zn sérico mais elevados em pacientes do grupo de estudo quando comparados com pacientes saudáveis ( $1,11 \pm 0,33$  versus  $0,91 \pm 0,24$ , respectivamente). Nenhum outro parâmetro antropométrico teve correlação significativa com o Fe, Zn e Cu séricos. Segundo o IMC, 78,9%, 18,4% e 2,6% do grupo de estudo encontraram-se, respectivamente, com sobrepeso/obesidade, eutrofia e desnutrição.

ABRAHAM, J. A. et al (2014) analisaram mudanças na concentração elementar de metais nos fluidos orais de um estudo indireto a partir da corrosão de implantes dentários. A degradação da superfície do implante libera material para o meio, que, dependendo das concentrações, pode representar risco tóxico, mau funcionamento orgânico, dor, rejeição e assim por diante. Para avaliar este processo, as concentrações de metais representativos como Ti, Al e V em saliva e fluidos gengivais foram analisadas por meio da técnica (SR-TXRF). Os resultados obtidos mostram que os íons Ti apresentaram um comportamento diferente nos fluidos orais, revelando maiores concentrações no fluido da fenda gengival do que na saliva. Por outro lado, V e Al não mostraram diferenças significativas em relação aos níveis normais nos fluidos orais. A liberação de metal é discutida sob considerações mecânicas e químicas, levando em consideração o ambiente oral do implante.

PINTO, N. G. V. et al (2010) analisaram as possíveis alterações causadas por processos de irradiação na concentração de elementos-traço em amostras de sangue humano pela técnica de fluorescência de raios X por reflexão total usando radiação síncrotron (SR-TXRF). As amostras de sangue foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo foi irradiado com doses de 1.500, 2.500 e 3.000 cGy, utilizando o irradiador Gammacell 220 Excel, e o segundo foi irradiado com doses que variaram de 2 cGy a 100 cGy, utilizando uma bomba de cobalto Theratron 780 C do Inca, Rio de Janeiro. Todas as amostras de sangue total, plasma e matriz celular foram então liofilizadas e, em seguida, passaram pelo procedimento padrão de digestão. Todas as medidas foram realizadas na linha de fluorescência de raios X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, Brasil. Não se verificou variação significativa na concentração de Ca e, em contrapartida, o K foi o único elemento que sofreu alterações significativas para todas as amostras analisadas em função da dose. A concentração de Fe diminuiu apenas para as amostras de sangue total e plasma. A concentração de Zn apresentou uma diminuição significativa somente para as amostras de sangue total.

ABRAHAM, J. A. et al (2010), estudaram trinta indivíduos separados por dois grupos: quinze fumantes e quinze não fumantes (grupo controle). As amostras de saliva foram medidas pela técnica TXRF utilizando radiação síncrotron e foram realizadas no (LNLS em Campinas). Os elementos químicos encontrados nas amostras foram: P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, e Zn. O sistema consistiu de um detector de Si(Li) e foram irradiadas por um tempo de 300 s para cada amostra a análise foi realizada pelo pacote Axil. As amostras de saliva foram extraídas a partir da parte inferior da boca e o sulco gengival dos dentes frontais superiores. Os resultados dos espectros pertencentes ao grupo dos fumantes demonstraram que o fumo afeta a composição mineral dos fluidos com relação aos valores referentes ao grupo de controle.

TARSOLY, G.; ÓVÁRI, M.; ZÁRAY, GY. (2010), analisaram a determinação de flúor em água, utilizando o espectrômetro TXRF Wobistrax localizado em Viena na Áustria, com o sistema sendo operado a 30 kV e 30 mA com um tempo de irradiação em cada amostra de 500s. As amostras foram pipetadas sobre substrato de quartzo e todas as medidas foram realizadas 12 vezes. Os seguintes parâmetros foram investigados: limite de detecção, intervalo de linearidade, quantidade de amostra, precisão de medição e o efeito da matriz

causada pelo cloro, bromo, iodo e sulfato. Os resultados obtidos mostraram que o uso da técnica TXRF pode ser utilizado para a determinação do flúor.

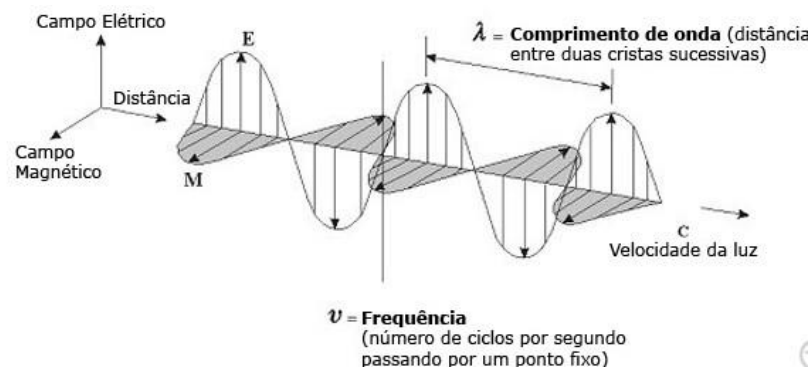


## 4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 4.1 RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA

Radiação é o termo dado à propagação de energia eletromagnética emitida por qualquer corpo que possua temperatura acima de zero absoluto (0 K). Assim, todo corpo com temperatura acima de zero pode ser considerado como uma fonte de energia eletromagnética (EISBERG, R.; RESNICK, R., 1979). Por meio desta definição, é possível concluir que todos os seres humanos emitem e vivem sob ação de radiação, como por exemplo, a radiação solar.

Compreender as propriedades da onda eletromagnética é necessário para entender as suas funções biológicas e aplicações clínico-laboratoriais e econômicas. A Figura 4.1 mostra um esquema simplificado de uma onda eletromagnética se propagando no espaço.



**Figura 4.1- Esquema simplificado de uma onda eletromagnética viajando no espaço.**

Fonte: HEU (2016)

A energia eletromagnética pode ser ordenada de maneira contínua em função de seu comprimento de onda ou de sua frequência, desse modo é possível discriminar o "espectro eletromagnético" em função de sua energia (EISBERG, R.; RESNICK, R., 1979). A Figura 4.2 ilustra o espectro eletromagnético e suas aplicações.

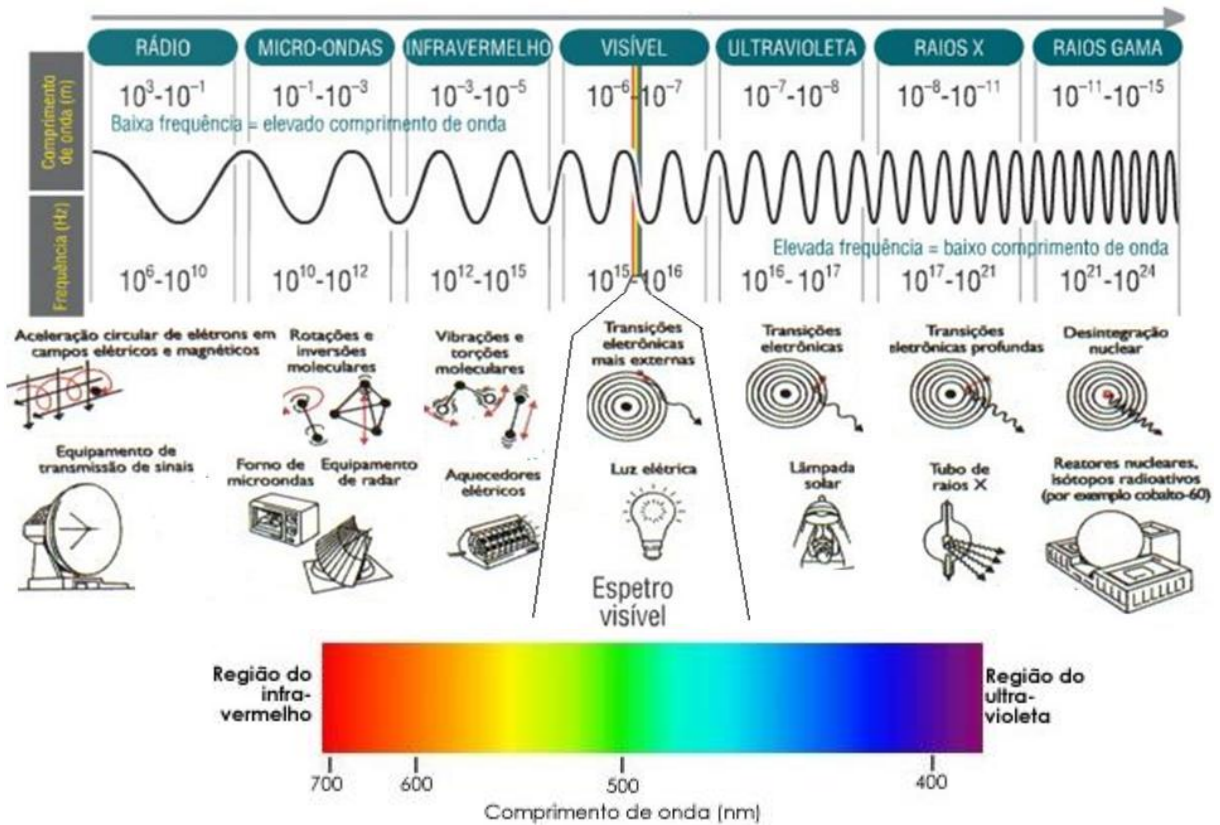


Figura 4.2 – Espectro eletromagnético e suas aplicações.

Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/10823194/>

## 4.2 PRODUÇÃO DE RAIOS X

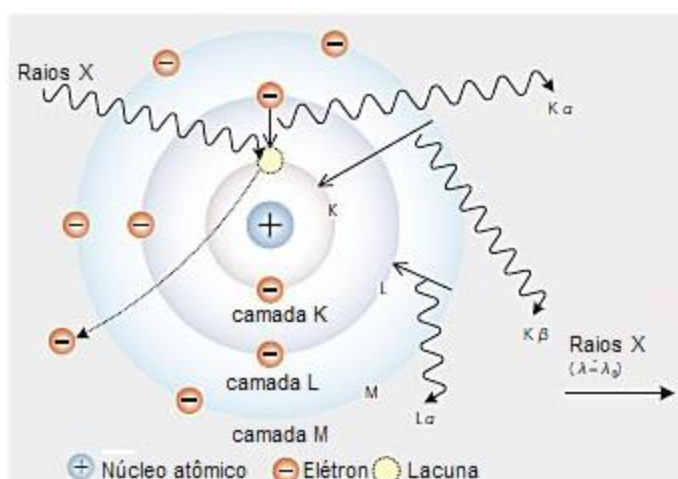
Os raios X foram descobertos acidentalmente pelo alemão Wilhelm Conrad Rontgen por meio de experimentos de raios catódicos no ano de 1895. Ele observou que a incidência de raios catódicos (feixe de elétrons) em um alvo sólido produzia uma radiação mais penetrante do que a luz visível. Os raios X são gerados através de dois processos que ocorrem no nível atômico: *Bremsstrahlung* e raios X característicos. *Bremsstrahlung* ocorre quando elétrons em alta energia são acelerados por uma diferença de potencial e sofrem uma colisão com o alvo. Esses elétrons são desacelerados e emitem um espectro contínuo de radiação eletromagnética.

Uma maneira prática de se obter raios X é com o uso de um tubo de raios catódicos, porém um dispositivo conhecido como tubo de Coolidge é mais frequentemente usado na produção de raios X. O tubo de Coolidge, também

conhecido como tubo de raios X consiste basicamente de um invólucro de vidro com seu interior evacuado que permite acelerar os elétrons. Em seus extremos há um cátodo e um ânodo, os quais são submetidos a uma diferença de potencial. O cátodo geralmente feito de tungstênio sofre aquecimento e emite elétrons por efeito termiônico. Os elétrons são, então, acelerados em direção ao ânodo, pela diferença de potencial atribuída entre o cátodo e o ânodo. A colisão dos elétrons com os átomos que constituem o ânodo provoca o freamento dos elétrons e assim emitem espectro contínuo de raios X.

Os raios X característicos são produzidos através das transições eletrônicas dos elétrons. O elétron acelerado ioniza o átomo nos níveis mais internos (K ou L), deixando uma vacância. A desexcitação ocorre quando um elétron de um nível mais externo preenche essa vacância e emite um raio X de energia igual a diferença de energia de ligação entre os dois níveis.

A Figura 4.3 ilustra o esquema da emissão dos raios X característicos quando a vacância está na camada K e são preenchidos por um elétron proveniente da camada L, os raios X emitidos são chamados de  $K_{\alpha}$ . Se o elétron transita da camada M para a camada K, os raios X emitidos são chamados de  $K_{\beta}$  e se a vacância estiver na camada L e for preenchida pelo elétron proveniente da camada M, os raios X são chamados de  $L_{\alpha}$  e se sair do nível N será  $L_{\beta}$  e assim sucessivamente.



**Figura 4.3 – Representação esquemática da emissão dos raios X característicos.**

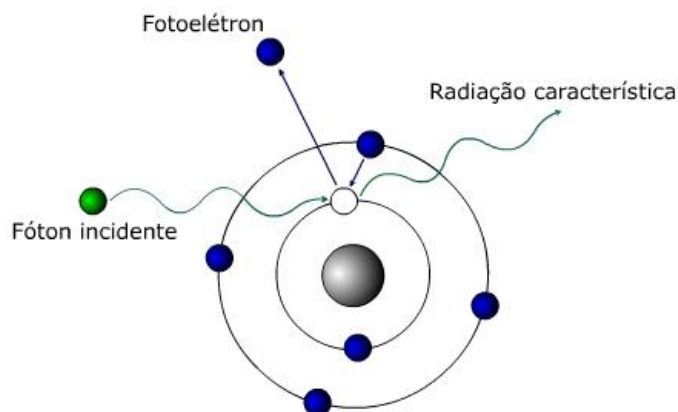
Fonte: [http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/elemental/raios\\_x](http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/elemental/raios_x)

### 4.2.1 EFEITO FOTOELÉTRICO

O físico alemão Rudolf Heinrich Hertz por volta de 1886 e 1887, realizou experiências que, pela primeira vez, confirmaram a existência de ondas eletromagnéticas e a teoria de Maxwell sobre a propagação de luz. O fenômeno do efeito fotoelétrico consiste na liberação de elétrons pela superfície de um metal, após a absorção da energia proveniente da radiação eletromagnética incidente sobre ele, de tal modo que a energia total da radiação é parcialmente transformada em energia cinética dos elétrons expelidos. A equação 4.1 mostra a energia cinética dos fotoelétrons.

$$E_k = h\nu - W \quad (4.1)$$

onde  $h\nu$  é a energia do fóton incidente,  $h$  é a constante Planck,  $\nu$  a frequência do fóton incidente e  $W$  é a função trabalho. Assim descrito pela equação, o elétron ejetado terá uma energia igual à diferença entre a energia do fóton incidente e a energia de ligação do próprio elétron na eletrosfera (GRIEKEN, 2002). A Figura 4.4 mostra um esquema simplificado do efeito fotoelétrico.



**Figura 4.4 – Representação esquemática do efeito fotoelétrico.**

Fonte: [efeitofotoeletricoecompton.webnode.com.br/explica](http://efeitofotoeletricoecompton.webnode.com.br/explica)

A probabilidade de produzir o efeito fotoelétrico na camada K é dada pela secção de choque segundo a equação 4.2. A probabilidade para a ocorrência da ejeção dos fotoelétrons é maior para a camada K.

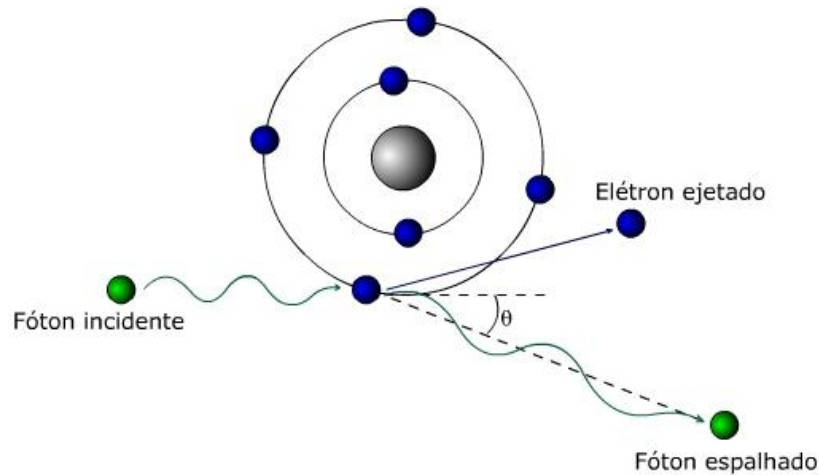
$$\sigma_F = \frac{8\pi}{3} \left( \frac{e^2}{m_0 c^2} \right)^2 Z^2 \alpha^4 4\sqrt{2} \left( \frac{m_0 c^2}{h\nu} \right)^{7/2} \quad (4.2)$$

sendo  $m_0 c^2$  a energia de repouso do elétron e  $\alpha = 1/137$  a constante de estrutura fina.

#### 4.2.2 ESPALHAMENTO COMPTON

O espalhamento Compton ou efeito Compton foi observado pelo físico americano Arthur Holly Compton em 1923. Compton observou que a radiação espalhada sofria um deslocamento em seu comprimento de onda com relação à radiação incidente. Ele fez com que um feixe de raios X de comprimento de onda  $\lambda$  incidisse sobre um alvo de grafite. Mediu-se a intensidade dos raios X espalhados como função de seu comprimento de onda, para vários ângulos de espalhamento.

Este tipo de espalhamento resulta numa perda de energia por parte da radiação incidente para um elétron orbital. O elétron, se receber energia suficiente para superar a energia de ligação ao átomo, é ejetado, entretanto neste fenômeno o fóton não perde toda a sua energia, apenas parte dela, resultando então em um “novo” fóton espalhado numa direção de acordo com a interação com o elétron orbital e com uma energia menor do que a inicial. A Figura 4.5 ilustra o espalhamento Compton para um fóton de energia  $h\nu$  e comprimento de onda  $\lambda$  que ao colidir com um elétron pouco ligado em repouso é espalhado em um ângulo  $\phi$  e com comprimento  $\lambda'$ . O elétron é espalhado com um ângulo de  $\theta$ .



**Figura 4.5 - Ilustra o esquema do espalhamento Compton.**

Fonte: [efeitofotoeletricoecompton.webnode.com.br/explica](http://efeitofotoeletricoecompton.webnode.com.br/explica)

A expressão que relaciona a transferência de energia e o ângulo de espalhamento para qualquer interação pode ser derivada através das equações da conservação de energia e momento dada na equação 4.3.

$$\frac{c}{\nu'} = \frac{c}{\nu} = \lambda' - \lambda = \frac{h}{m_0 c^2} (1 - \cos \phi) \quad (4.3)$$

rearranjando a equação 4.3 e definindo  $\alpha = \frac{h\nu}{m_0 c^2}$ , tem-se a equação 4.4 expressa em termos da frequência do fóton.

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \alpha(1 - \cos \phi)} \quad (4.4)$$

A energia cinética do elétron ejetado é dada por:

$$T = h\nu \frac{\alpha(1 - \cos \phi)}{1 + \alpha(1 - \cos \phi)} \quad (4.5)$$

Ou obtida através do ângulo de espalhamento do elétron:

$$T = h\nu \left[ \frac{2\alpha}{1 + 2\alpha + (1 + \alpha)^2 \operatorname{tg}^2 \theta} \right] \quad (4.6)$$

sendo que as relações entre os ângulos de espalhamento do fóton e do elétron são dadas por  $\cos \phi = 1 - \frac{2}{1 + (1 + \alpha)^2 \operatorname{tg}^2 \theta}$  e  $\cot g \theta = (1 + \alpha) \operatorname{tg} \left( \frac{\phi}{2} \right)$ .

A secção de choque do elétron para os fótons espalhados com um ângulo sólido de  $d\Omega$  em uma direção  $\phi$  foi calculada por Klein e Nishima, sendo dada pela equação 4.7.

$$\frac{d\sigma_{KN}}{d\Omega} = \frac{r_0^2}{2} \left( \frac{h\nu'}{h\nu} \right) \left( \frac{h\nu}{h\nu'} + \frac{h\nu'}{h\nu} - \operatorname{sen}^2 \phi \right) \quad (4.7)$$

Substituindo a equação 4.4 na equação 4.7, tem-se a equação 4.8:

$$\frac{d\sigma_{KN}}{d\Omega} = \frac{r_0^2}{2} \left[ \frac{1}{1 + \alpha(1 - \cos \phi)^2} \left( 1 + \cos^2 \phi + \frac{\alpha^2(1 - \cos \phi)}{1 + \alpha(1 - \cos \phi)} \right) \right] \quad (4.8)$$

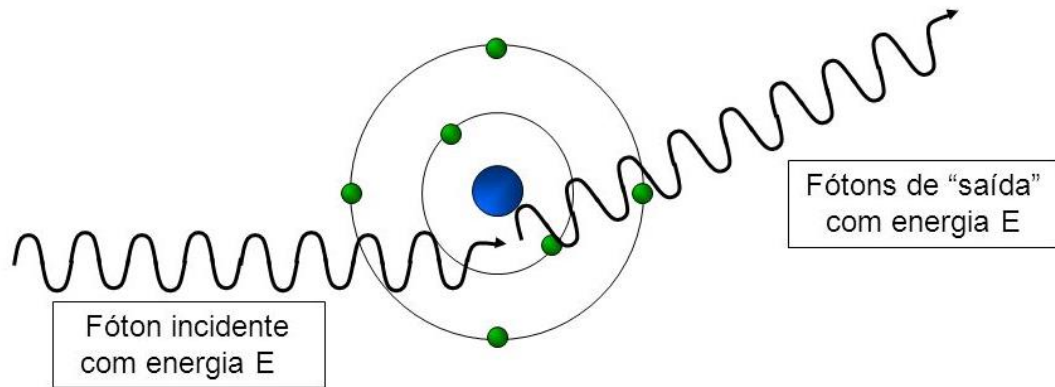
Para baixas energias dos fótons  $\alpha \ll 1$  a equação 4.8 descreve a secção de choque para o espalhamento Thomson. Realizando a integral da equação 4.8 encontra-se a secção de choque total do espalhamento Compton.

$$\sigma_{KN} = 2\pi r_0^2 \left[ \frac{1 + \alpha}{\alpha^2} \left( \frac{2(1 + \alpha)}{1 + 2\alpha} - \frac{\ln(1 + 2\alpha)}{\alpha} \right) + \frac{\ln(1 + 2\alpha)}{2\alpha} - \frac{1 + 3\alpha}{(1 + 2\alpha)^2} \right] \quad (4.9)$$

### 4.2.3 ESPALHAMENTO RAYLEIGH

O espalhamento Rayleigh, proposto inicialmente por Lord Rayleigh em 1871, consiste num espalhamento elástico e coerente, do feixe de fótons pela colisão com os elétrons pertencentes à eletrosfera atômica do material, ocorrendo uma mudança de sua trajetória sem perda de energia. A Figura 4.6 ilustra o esquema do espalhamento. Por ser uma colisão elástica, fótons são espalhados

com a mesma energia com que colidiram com os elétrons ligados, os quais permanecem ligados. Portanto a energia dos fótons é conservada após a colisão, não havendo transferência de energia dos fótons para os elétrons.



**Figura 4.6** - Esquema simplificado do espalhamento Rayleigh.

Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/11774338/>

A secção de choque diferencial para o espalhamento Rayleigh, para energias não relativísticas  $h\nu \ll m_0c^2$  é expressa pela equação:

$$d\sigma_R(E) = r_0 |f_\theta|^2 \left( \frac{1 + \cos^2 \theta}{2} \right) d\Omega \quad (4.9)$$

sendo  $r_0 = e^2/m_0c^2$  corresponde ao raio clássico do elétron,  $f_\theta$  é o fator de espalhamento atômico que leva em consideração a distribuição de carga da nuvem eletrônica e  $d\Omega$  é o ângulo sólido para o ângulo de difusão  $\theta$ .

### 4.3 FUNDAMENTOS DA FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

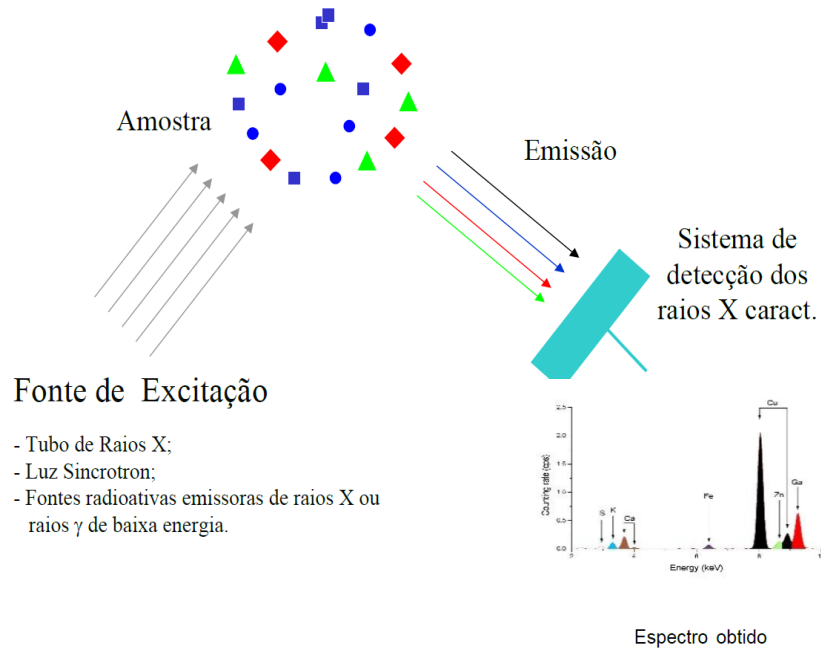
A técnica analítica por Fluorescência de Raios X (*XRF – X Ray Fluorescence*) permite uma rápida análise multielementar quantitativa ou semiquantitativa de líquidos, suspensões, sólidos e contaminações. Esta técnica tem a capacidade de detectar uma ampla faixa de elementos químicos presentes em diferentes tipos de amostras de interesse nas mais variadas áreas de pesquisa científica.



Cada elemento químico possui um espectro de raios X característicos. Um raio X característico é gerado por um átomo excitado que volta ao estado fundamental através da transição de um elétron de um estado de energia mais alto para a vacância em uma camada mais interna. Essa transição é acompanhada da emissão de um fóton com energia igual à diferença de energia entre os estados final e inicial do elétron transferido.

Quando uma amostra é excitada por um feixe primário de raios X, os elementos excitados presentes na amostra emitem linhas espectrais com energias características do elemento (NASCIMENTO FILHO, V. F., 1999). A fluorescência emitida pela amostra (feixe secundário) é detectada e “classificada” de acordo com sua energia.

A XRF consiste na utilização de um feixe de radiação eletromagnética para excitar os elementos químicos que compõem uma determinada amostra, de um determinado tipo de matriz, fazendo com que os mesmos emitam raios X característicos. Uma das principais vantagens da utilização deste método analítico está na possibilidade de utilizar as diferentes variantes da técnica: Fluorescência de Raios X por dispersão por comprimento de onda (*WDXRF - wavelength dispersive X-ray fluorescence*), Fluorescência de Raios X por dispersão em energia (*EDXRF – energy dispersive X-ray fluorescence*) e a sub-variante da EDXRF a fluorescência de raios X por reflexão total (*TXRF*). A análise XRF baseia-se nas seguintes etapas: excitação dos elementos químicos constituintes da amostra, emissão dos raios X característicos dos elementos excitados e por fim, detecção dos raios X característicos emitidos. A Figura 4.7 ilustra o esquema básico para análise por EDXRF.



**Figura 4.7 - Etapas básicas da análise por EDXRF.**

Fonte: PARREIRA (2007).

#### 4.3.1 EXCITAÇÃO DOS ELEMENTOS

Para provocar a emissão dos raios X característicos dos elementos que constituem a amostra, é possível excitar o material a ser analisado de várias formas: partículas aceleradas (elétrons, prótons ou íons), partículas alfa, partículas betas negativas, raios X e raios gama de baixa energia. Quando amostra é excitada, os elétrons das camadas mais internas são ejetados do átomo (efeito fotoelétrico), ficando assim, vacâncias nos níveis eletrônicos mais internos. Para preencher essas vacâncias, elétrons das camadas mais externas realizam um salto quântico. Nesse salto, fótons de energia de ligação igual à diferença de energia entre esses níveis são emitidos. A energia de ligação pode ser calculada de modo aproximado através da equação 4.10.

$$E = \frac{me^4 (Z - b)^2}{8\epsilon_0^2 h^2 n^2} \quad (4.10)$$

onde  $E$  representa energia de ligação eletrônica (joules);  $m$  é a massa de repouso do elétron ( $9,11 \cdot 10^{-31}$  kilogramas);  $e$  é a carga elétrica do elétron ( $1,6 \cdot 10^{-19}$  coulombs);  $Z$  é o número atômico do elemento emissor dos raios X;  $b$  é a constante

de Moseley, com valores iguais a 1 e 7,4, para as camadas K e L, respectivamente;  $\epsilon_0$  é a permissividade elétrica no vácuo ( $8,8534 \cdot 10^{-12}$  coulombs.newton<sup>-1</sup>.metro<sup>-2</sup>);  $h$  é a constante de Planck ( $6,625 \cdot 10^{-34}$  joules.s) e  $n$  é o número quântico principal do nível eletrônico ( $n = 1$  para camada K,  $n = 2$  para camada L, etc.) (NASCIMENTO FILHO, 1999).

Realizando a substituição dos valores das constantes no sistema internacional de unidades na equação 4.10, a energia dos raios X (em joules) é dada por:

$$E = 2,18 \cdot 10^{-18} \frac{(Z-b)^2}{n^2} \quad (4.11)$$

A equação 4.11 pode ser reescrita em termos de eletronsvolts, sendo que  $1 \text{ elétronvolt} = 1 \text{ eV} = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ joules}$ .

$$E = 13,65 \frac{(Z-b)^2}{n^2} \quad (4.12)$$

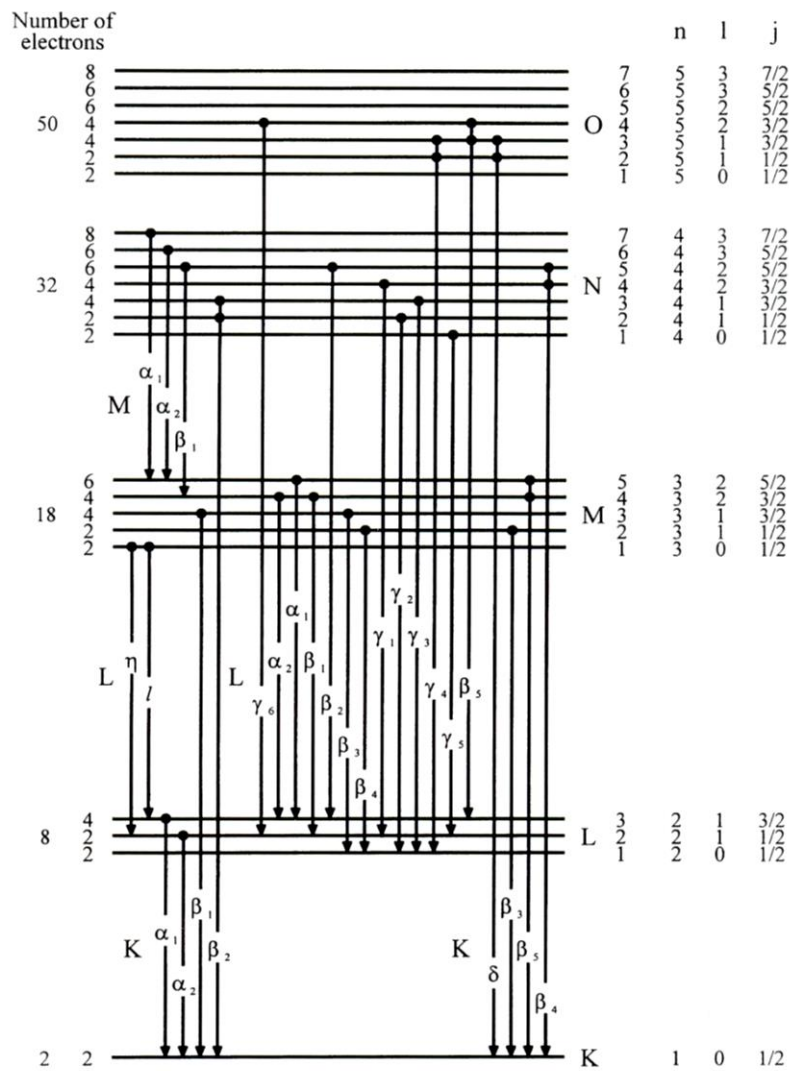
#### 4.3.2 LINHAS ESPECTRAIS

As transições de elétrons entre as camadas eletrônicas estão sujeitas às chamadas regras de seleção da mecânica quântica. Cada estado energético do átomo é caracterizado por uma sequência de números quânticos que dão as informações quânticas do estado. Cada estado quântico é caracterizado pelos seguintes números quânticos:  $n$ ,  $l$ ,  $m_l$ ,  $s$ ,  $m_s$ ,  $j$  e  $m_j$ . Os números quânticos associados a um determinado estado de energia do átomo são:  $n$  número quântico principal, associado às camadas orbitais K, L, M, N..., onde  $n = 1, 2, 3, 4, \dots$ , respectivamente. Este número representa os níveis discretos de energia, por isso pode possuir qualquer número inteiro, como mostrado anteriormente. Já o número quântico  $l = 0, \dots, (n - 1)$ , é conhecido como número quântico de momento angular orbital do elétron, que é associado aos subníveis s, p, d, f, g, ...,  $m_l$  representa o número quântico quanto à componente z do momento angular orbital do elétron,  $s$  é o número quântico de spin intrínseco do elétron, sendo  $m_s = 1/2$  ou  $-1/2$  o número

quântico relacionado com as duas possíveis projeções do spin intrínseco antiparalela ou paralela;  $j = |l - s|, \dots, |l + s|$  é o número quântico de momento angular total devido ao resultado do acoplamento dos números quânticos  $l$  e  $s$  do elétron.

Uma vez que as transições eletrônicas não são aleatórias, são utilizadas as chamadas regras de seleção da mecânica quântica para que a emissão de raios X seja possível. Ou seja, a variação entre o estado inicial e o estado final deve obedecer as seguintes condições.

$$\begin{aligned} \Delta n &\geq 1 \\ \Delta l &\geq \pm 1 \\ \Delta j &= \pm 1 \text{ ou } 0 \end{aligned} \tag{4.13}$$

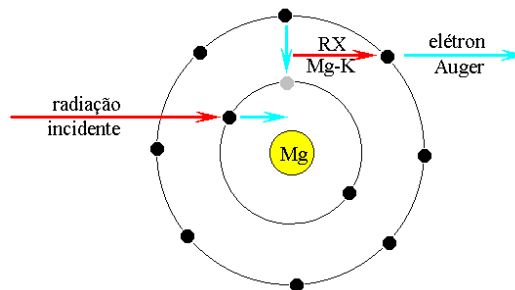


**Figura 4.8 - Diagrama parcial dos níveis de energia para as linhas espectrais das séries K e L de um elemento.**

Fonte: CESAREO (2000)

#### 4.4 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Quando ocorre o efeito fotoelétrico, ejetando um elétron de um determinado estado quântico, pode ocorrer a emissão de raios X ou a ejeção de elétrons do átomo (efeito Auger). O efeito Auger tem uma relevância maior para elementos de baixo número atômico (KNOLL, 1999), a Figura 4.9 ilustra o efeito Auger para um átomo de magnésio.



**Figura 4.9 - Representação esquemática do efeito Auger para um átomo de magnésio.**

Fonte: NASCIMENTO FILHO (1999).

O fenômeno de produção de fluorescência está embasado puramente nos alicerces da mecânica quântica. Assim, a emissão das linhas espectrais dos raios X característicos de um elemento químico qualquer como, por exemplo, a linha  $K_{\alpha_1}$ , depende dos seguintes eventos probabilísticos: a probabilidade dos fótons incidentes ionizarem o átomo na camada  $K$ , a probabilidade da vacância criada na camada  $K$  ser preenchida por um elétron da camada  $L_{III}$  e da probabilidade do fóton  $K_{\alpha_1}$  não ser absorvido pelo próprio átomo e emitir um elétron Auger como mecanismo de desexcitação do átomo.

O primeiro evento probabilístico refere-se ao fato de que os fótons sejam absorvidos pela matéria, mais especificamente pelos seus átomos constituintes e que suas energias sejam transferidas para os elétrons, ocasionando assim a ionização do átomo. A fórmula que indica esse coeficiente de absorção de massa  $\mu$  ( $cm^2 \cdot g^{-1}$ ), o qual corresponde a uma somatória dos coeficientes de

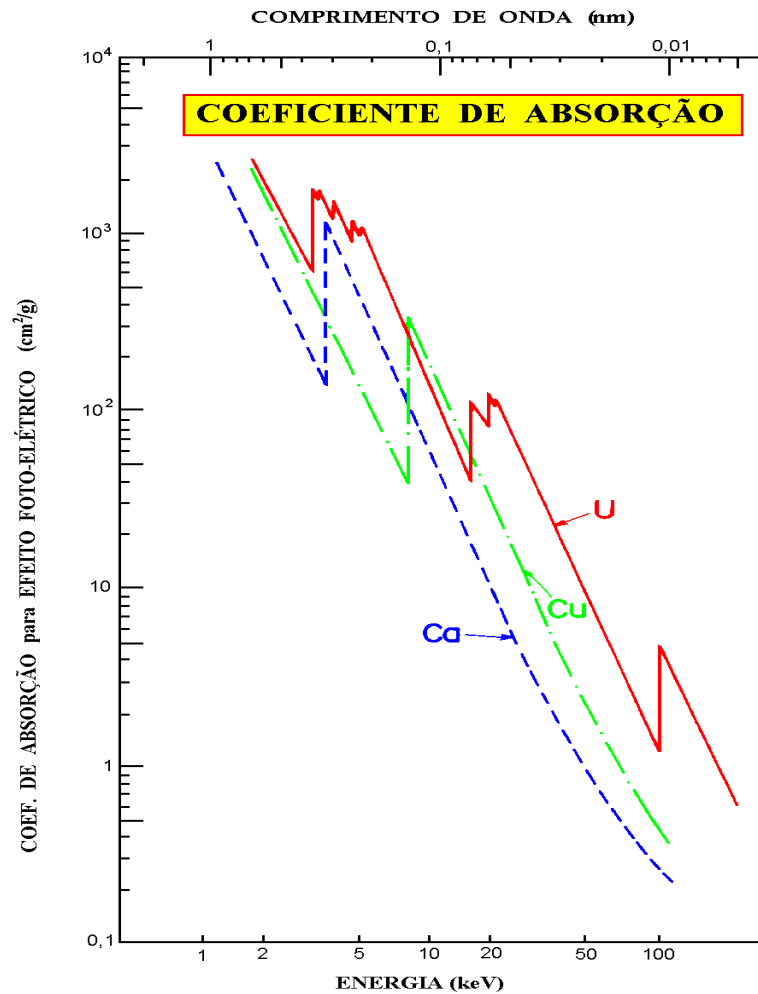
absorção de massa dos efeitos, fotoelétrico, Compton e produção de pares, é dado pela equação 4.14:

$$\mu(E) = \tau(E) + \sigma(E) + \kappa(E) \quad (4.14)$$

onde  $\tau(E)$  é o coeficiente de absorção de massa para o efeito fotoelétrico ( $cm^2 \cdot g^{-1}$ ),  $\sigma(E)$  corresponde ao coeficiente de absorção de massa para o espalhamento Compton ( $cm^2 \cdot g^{-1}$ ) e  $\kappa(E)$  é o coeficiente de absorção de massa para a produção de pares (KAPLAN, 1983).

Para energias menores que 1,02 MeV não há produção de pares, uma vez que esse efeito é gerado apenas em energias maiores que 1,02 MeV. Assim para a fluorescência de raios X o termo  $\kappa(E)$  é nulo. Para o intervalo de energias de excitação de 100 keV a 1,02 MeV o espalhamento Compton é o efeito mais predominante na interação dos fótons com a matéria, portanto para essa faixa de energia o termo dominante no coeficiente de atenuação de massa total é o termo  $\sigma(E)$ . Entretanto, para a fluorescência de raios X que ocorre em uma faixa de energia de excitação até 100 keV, o efeito dominante na absorção de fótons pela matéria é o efeito fotoelétrico.

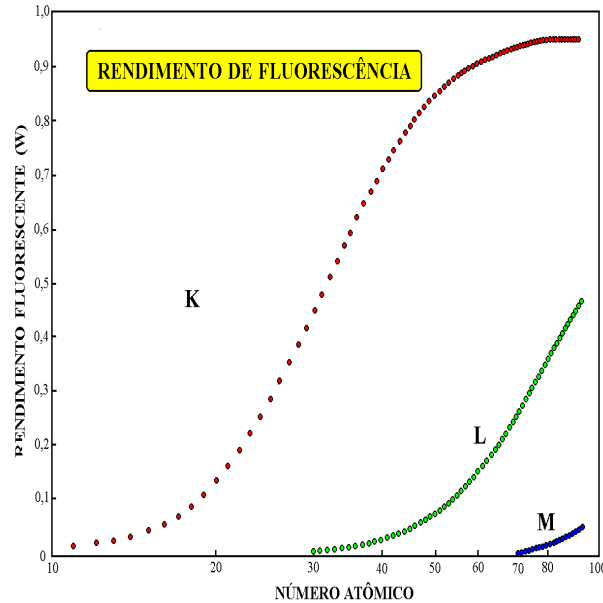
A Figura 4.10 representa a dependência do coeficiente de absorção de massa para o efeito fotoelétrico dos elementos cálcio (Ca), cobre (Cu) e urânio (U). As variações bruscas apresentadas no gráfico são conhecidas como cortes de absorção  $K_{ab}$ . Os valores das energias correspondentes a essas discontinuidades são as energias necessárias para a ionização de cada nível quântico correspondente, ou seja, para que haja a ionização do nível K o feixe de excitação deve possuir uma energia superior ao valor da energia  $K_{ab}$ . A Figura 4.10 deixa bem evidentes os cortes de absorção para o nível quântico K para os elementos Ca e Cu; juntamente com o corte para o nível K, e para os níveis L e M, com 3 sub-níveis e 5 sub-níveis, respectivamente; para o elemento U.



**Figura 4.10 - Coeficiente de absorção de massa em função da energia, para os elementos cálcio, cobre e urânio.**

Fonte: NASCIMENTO FILHO (1999).

O segundo evento probabilístico refere-se à probabilidade de transição que segue a condição da regra de seleção imposta pelas leis da mecânica quântica, sendo responsável, em princípio, pelas intensidades relativas das linhas emitidas dentro de uma mesma série espectral (GRIEKEN; MARKOWICZ, 2002). A Figura 4.11 mostra o comportamento do rendimento da fluorescência de raios X para os níveis quânticos K, L e M em relação ao número atômico.



**Figura 4.11 - Rendimento da fluorescência das camadas K, L e M em função do número atômico.**

Fonte: NASCIMENTO FILHO (1999).

O terceiro evento probabilístico considera a probabilidade de não ocorrer o efeito Auger, esse fenômeno está intimamente relacionada ao rendimento de fluorescência para a camada K de um dado elemento químico  $i$  de interesse, definida pela equação:

$$w_i = \frac{N_i}{N_k} \quad (4.15)$$

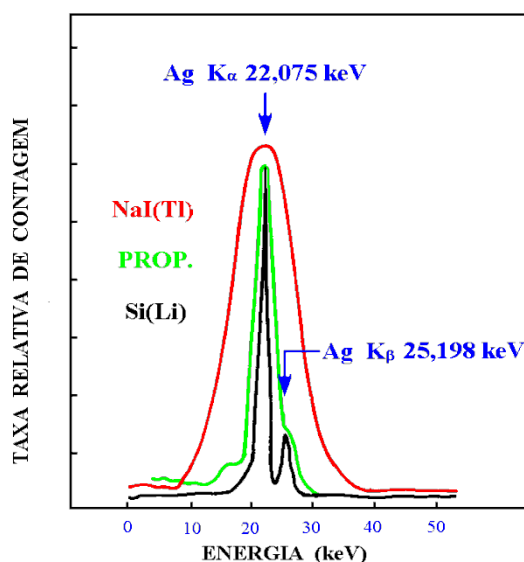
onde  $N_i$  é o número de fótons de raios X característicos que efetivamente são emitidos e conseguem emergir do átomo, e  $N_k$  o número de vacâncias produzidas no nível quântico K. Seguindo o mesmo raciocínio, pode-se determinar o rendimento de fluorescência de raios X que ocorre para os outros níveis quânticos do átomo, sendo o rendimento para os níveis L, M, N,..., mais baixo devido à menor probabilidade de ocorrer fluorescência nestes níveis.

#### 4.4.1 DETECÇÃO E MEDIDAS DOS RAIOS X

Os raios X característicos liberados pelos átomos que compõe a amostra quando atingem o detector geram sinal eletrônico proporcional às energias



dos raios X. Esses sinais são amplificados pela eletrônica conectada ao detector e, o analisador de pulsos multicanal registra esses pulsos e separa de acordo com a quantidade de sinais para cada energia, gerando dessa forma picos de energia em que sua área é proporcional à intensidade dos raios X emitido pelo elemento e, conseqüentemente proporcional a concentração na amostra. Estas informações são enviadas para um microcomputador que processa as informações utilizando softwares específicos. Os espectros de energias gerados pelos softwares mostram as áreas dos picos de modo a informar o operador os elementos identificados juntamente com sua concentração. Deste modo, em um único espectro obtido de uma amostra, podemos verificar a presença de vários elementos, sendo assim uma técnica multielementar e simultânea. Nas análises feitas por XRF, a detecção dos fótons de raios X característicos pode ser realizada pelos seguintes detectores: detector proporcional, detector de cristal cintilador de iodeto de sódio NaI(Tl) e pelos detectores semicondutores de Si(Li), Si-PIN. A Figura 4.12 mostra a resolução em energia para os detectores proporcional, cristal cintilador de iodeto de sódio NaI(Tl), e semicondutor de Si(Li) para fótons de raios X de 22,1 e 25,2 keV emitidos pelo elemento químico prata (Ag).



**Figura 4.12 - Resolução de alguns detectores para os raios X característicos emitidos pela prata.**

Fonte: NASCIMENTO FILHO (1999).

#### 4.4.2 EQUAÇÃO FUNDAMENTAL PARA FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Como descrito anteriormente, a técnica denominada fluorescência de raios X possui a grande capacidade de correlacionar as intensidades dos raios X característicos (número de fótons emitidos por unidade de tempo) emitidos pelos elementos químicos de uma amostra (de um tipo qualquer de matriz que se deseja analisar), à medida que a mesma é submetida a um sistema adequado de excitação.

Em pesquisas realizadas com a técnica EDXRF, é primordial que se tenha o conhecimento da aplicação da equação dos parâmetros fundamentais da fluorescência de raios X para a quantificação dos elementos que compõe a amostra (NASCIMENTO FILHO, APPOLONI, 2004). Levando em consideração todos esses eventos probabilísticos visto na sessão 4.4, pode-se chegar à equação matemática denominada equação básica dos parâmetros fundamentais, a qual é dada pela equação 4.16.

$$I_i = C_i \cdot S_i \cdot A_i \quad (4.16)$$

sendo  $I_i$  a intensidade líquida dos raios X (cps),  $C_i$  a concentração do elemento químico  $i$  de interesse (em gramas por grama de amostra),  $S_i$  a sensibilidade analítica elementar ( $\text{cps} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ ) e  $A_i$  o fator de absorção da matriz ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), referentes ao elemento  $i$  em questão.

A sensibilidade elementar  $S$  é obtida pela equação:

$$S = \tau \cdot w \cdot f \left( 1 - \frac{1}{j} \right) G \cdot \varepsilon \quad (4.17)$$

onde  $\tau$  representa o coeficiente de absorção do elemento para o efeito fotoelétrico na energia incidente ( $\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ ),  $w$  é o rendimento da fluorescência para raios X,  $f$  corresponde a fração dos fótons emitidos como raios X  $K_\alpha$ ,  $(1-1/j)$  é a razão de *jump* no corte de absorção K,  $G$  representa o fator geométrico e por fim  $\varepsilon$  é a eficiência do detector para a energia do raios X característico emitido pelo analito.

A determinação do fator de absorção  $A_i$  da amostra para o elemento de interesse  $i$ , o qual é definido por meio da equação 4.18.

$$A_i = \frac{1 - e^{-\chi_i \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi_i \cdot \rho_0 \cdot D}$$

onde  $\rho_0$  é a densidade da matriz ( $g \cdot cm^{-3}$ ),  $D$  é a espessura da amostra e  $\chi_i$  é o coeficiente de absorção de massa total que é dado pela equação 4.18.

$$\chi_i = \frac{\mu_{oi}}{\text{sen}\theta_0} + \frac{\mu_i}{\text{sen}\theta} \quad (4.18)$$

sendo  $\mu_{oi}$  e  $\mu_i$  os coeficientes de absorção de massa da matriz ( $g^{-1} \cdot cm^2$ ) para a energia dos fótons de excitação e dos fótons detectados, respectivamente,  $\theta_0$  e  $\theta$  correspondem aos ângulos de radiação incidente e emergente em relação a amostra.

Para amostras finas, como por exemplo, filmes finos, o fator de absorção pode ser considerado  $A_i = 1$ , pelo fato que a espessura tende ser zero  $D \rightarrow 0$ . Já para o caso de amostras espessas em que  $D \rightarrow \infty$  o fator de absorção pode ser reescrita como  $A_i = \frac{1}{\chi_i \cdot \rho_0 \cdot D}$ , implicando que o usuário verifique os demais fatores para que possa quantificar os elementos presentes em suas amostras.

#### 4.5 LLD - LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO

O Limite mínimo de detecção (LLD) é uma grandeza importante para análises quantitativas. O LLD representa a menor quantidade (concentração, massa, volume, etc.) que pode ser discriminada estatisticamente de uma medida em relação ao *background*. Para toda a análise qualitativa é de fundamental importância considerar esse limite, uma vez que, aos valores de intensidades menores que a intensidade limite não é possível atribuir confiabilidade na presença do elemento que a originou. Os LLD's para a técnica de TXRF são menores que o da fluorescência convencional, devido a três fatores: baixa intensidade do background sob os picos característicos, fluxo da radiação primária disponível para a excitação da amostra é mais efetivo e a proximidade entre a amostra e o detector de raios X. O valor do

limite está intimamente relacionado com o valor da sensibilidade elementar e o comportamento do *background* (contagem de fundo).

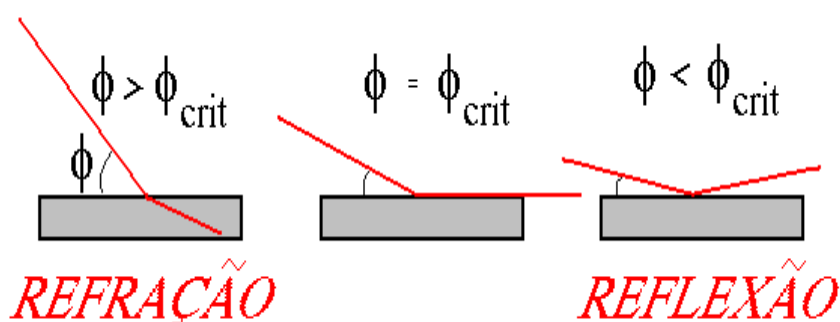
O *software* do equipamento utilizado no presente trabalho realiza os cálculos relacionados sobre os LLD'S através da fórmula 4.19.

$$LLD_i = \frac{3 \cdot C_i \cdot \sqrt{N_{BG}}}{N_i} \quad (4.19)$$

onde  $C_i$  é a concentração do elemento  $i$  (elemento em questão)  $mg/L$ ,  $N_{BG}$  é a área de fundo subjacente ao pico de fluorescência ( $N_{BG}/t$ , contagem líquida do fundo sobre o tempo de medida) e  $N_i$  é área do pico de fluorescência ( $N_i/t$ , contagem líquida do elemento sobre o tempo de medida). Essa equação determina qual o valor mínimo da contagem que pode obter um grau de confiança de 95%.

#### 4.6 TXRF- FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL

A técnica TXRF é uma variante da técnica EDXRF. A principal diferença é a geometria entre o tubo de raios X e o detector. A TXRF baseia-se nos fundamentos básicos do fenômeno de reflexão total de um feixe de luz, neste caso um feixe de raios X. Em suma, quando um feixe de radiação monoenergético passa de um meio (ar ou vácuo) e atinge uma superfície plana de um dado material, pode ocorrer a *refração*, penetrando pelo material, ou a *reflexão*, sendo refletido pela sua superfície em um ângulo refletido igual ao de incidência. Quando um feixe monocromático se propaga de um meio mais refringente para um meio menos refringente com um ângulo de incidência  $i$  maior que o ângulo crítico  $\phi_c$ , dado pela lei de Snell, ocorre a refração, se o ângulo de incidência for menor que o ângulo crítico o feixe incidente não penetra no segundo meio, ou seja, ele é completamente refletido ao meio de origem. A esse fenômeno, dá-se o nome de *reflexão total* da luz, conforme apresenta a Figura 4.13.

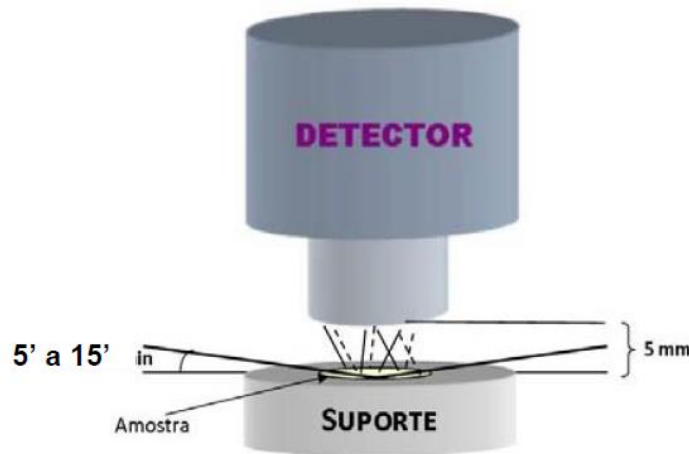


**Figura 4.13 - Representação esquemática da refração e reflexão de um feixe de radiação monoenergético em função do ângulo crítico de incidência.**

**Fonte:** Nascimento Filho (1999).

Os raios X são incididos com um ângulo rasante à superfície de tal forma que ocorra a reflexão total. Devido a esta reflexão, a ausência de espalhamento pelo suporte reduz o espalhamento do feixe primário com uma significativa redução da radiação do fundo no espectro de pulsos produzidos pelo detector. O feixe incidente não interage com o suporte, mas atravessa todo o filme fino formado pela deposição da amostra, com isto há grande probabilidade de excitar os átomos da superfície da amostra gerando raios X característicos cuja fluorescência é detectada por detectores posicionados muito próximos à amostra. (PRANGE, 1989). O efeito da reflexão total é aplicado para minimizar a intensidade da radiação de fundo, obtendo uma melhora no sinal de fluorescência. A baixa radiação de fundo resulta, principalmente, da menor profundidade de penetração com ângulos inferiores ao ângulo crítico de reflexão total (KLOCKEMKÄMPER et al.; 1996). Outra característica marcante do TXRF é a pequena distância entre a amostra e o detector, de apenas alguns milímetros, resultando em um ângulo crítico grande, obtendo uma eficiente detecção do sinal de fluorescência proveniente da amostra. A Figura 4.14 ilustra geometria de excitação/detecção da TXRF.

A técnica TXRF está sendo muito utilizada nos últimos anos e vem sendo aplicada principalmente na análise de elementos traços (na faixa de ppb) em amostras líquidas da ordem de microlitros em aplicações de monitoramento ambiental de metais pesados, em aerossóis e em amostras biológicas. Esta técnica apresenta muitas vantagens, entre elas é a excitação da amostra, possui excelentes níveis de detecção e detecta a maioria dos elementos da tabela periódica.



**Figura 4.14** - Geometria de excitação/detecção da TXRF, com linhas contínuas representando os raios X incidentes e espalhados, e os tracejados os raios X característicos.

**Fonte:** Cleto D.A.M. (2013), adaptado de Nascimento Filho (1999).

O ângulo crítico, a refletividade e a profundidade de penetração são três parâmetros que seguem os princípios da radiação eletromagnética, ocasionada pelo efeito de excitação em XRF utilizando a reflexão total.

O ângulo crítico é um parâmetro bastante relevante na TXRF, pois depende da energia do feixe de raios X incidente e da densidade do material, assim pode ser observado um valor de ângulo crítico para cada tipo de material para um mesmo valor de energia do feixe incidente, sendo o índice de refração dado pela equação 4.20.

$$n = 1 - \delta - i\beta \quad (4.20)$$

onde  $\delta$  é a parte real e representa a dispersão do feixe que depende da densidade do material e  $\beta$  a parte imaginária, a qual representa a atenuação na matéria e possui dependência com o coeficiente de absorção do material. O parâmetro  $\delta$  é representado pela equação 4.21 e o parâmetro  $\beta$  pela equação 4.22.

$$\delta = \frac{ne^2\lambda^2}{2\pi mc^2} \quad (4.21)$$

e

$$\beta = \frac{\mu\lambda}{4\pi} \quad (4.22)$$

sendo  $n$  a densidade eletrônica,  $e$  e  $m$  a carga e massa do elétron, respectivamente,  $c$  a velocidade da luz,  $\mu$  o coeficiente de atenuação e  $\lambda$  o comprimento de onda (GRIEKEN; MARKOWICZ, 2002). A densidade eletrônica pode ser determinada através da equação 4.23.

$$n = \frac{N_A \rho Z}{A} \quad (4.23)$$

onde  $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$  átomos  $\cdot g^{-1}$  é o número de Avogadro e  $\rho$  é a densidade do material em  $g \cdot cm^{-3}$ ,  $Z$  é o número atômico e  $A$  é o átomo-grama ou molécula-grama do material ( $g \cdot mol^{-1}$ ). Os valores de  $\delta$  e  $\beta$  correspondem a pequenos valores, de tal modo que em geral  $\beta$  é bem menor que  $10^{-6}$ . Podemos encontrar o valor do ângulo crítico pela lei de Snell.

$$\cos \phi_c = 1 - \delta \quad (4.24)$$

expandindo em série para pequenos valores do ângulo crítico  $\phi_c$ , pode-se escrever a equação 4.25.

$$\phi_c = \sqrt{2\delta} \quad (4.25)$$

Substituindo as equações 4.21 e 4.23 em 4.25, obtemos a equação do ângulo crítico.

$$\phi_c = \frac{99,1}{E_c} \sqrt{\frac{Z\rho}{A}} \quad (4.26)$$

## 5 TESTES ESTATÍSTICOS

A análise estatística dos resultados obtidos em um determinado estudo é uma ferramenta importantíssima na validação desses dados, assim como para a adequada extrapolação dos resultados obtidos para a população estudada. Nesse caso vários testes foram introduzidos nas análises dos resultados obtidos.

### 5.1 TESTES DE NORMALIDADE

Na literatura, é possível encontrar vários testes de normalidade como D'Agostinho-Pearson, Kolmogorov-Smirnov, Cramér-von Mises, Anderson-Darling e Shapiro-Wilk, que verificam se a distribuição de um conjunto de dados segue uma distribuição normal (SANTOS, 2003).

Existem dois tipos básicos de distribuição dos dados: normal ou anormal. A distribuição normal ou Gaussiana (relativo à Carl Gauss) apresenta uma forma semelhante a uma curva em sino quando os dados contínuos estão dispostos em uma curva de distribuição. Pode ser visto que os dados se concentram em torno de uma média e se dispersam simetricamente a partir desse ponto central. Quando a curva de distribuição dos dados não apresenta uma forma de sino é chamada de assimétrica ou anormal. Se os dados apresentarem uma distribuição anormal, é necessário escolher um teste não paramétrico ou transformar os dados em uma distribuição normal, aplicando, como exemplo, uma transformação logarítmica (Sheats 2002).

Cabe observar que, para um conjunto grande de amostras, as diferenças entre os métodos são mínimas, porém para pequenas amostras elas podem ser significativas (MARTINEZ, 2004). O teste de normalidade de Shapiro-Wilk, também conhecido como teste *W*, é o mais adequado para nosso estudo, pois é um teste indicado para amostras com  $N < 50$ , apesar de alguns autores atestarem que ele também pode ser usado para  $N > 50$  (CONOVER, 1980). Neste trabalho, os testes estatísticos utilizados nas amostras de saliva e plasma foram obtidos com a ajuda dos programas SPSS 24 (*Statistical Package for Social Sciences*).



### 5.1.1 TESTE DE SHAPIRO-WILK

Esse teste, proposto em 1965 por Samuel Sanford Shapiro e Martin Wilk, calcula uma estatística  $W$  que testa se uma amostra aleatória de tamanho  $N$  provém de uma distribuição normal. Este teste estatístico é obtido dividindo o quadrado de uma combinação linear apropriada da ordem estatística da amostra por uma usual estimativa de variância simétrica, como mostra a equação 5.1.

Ao calcular o teste  $W$ , o programa SPSS fornece os valores da estatística com suas significâncias ( $p$ -valor). Para serem aceitas pelo teste de  $W$ , as distribuições precisam apresentar os valores da estatística maiores que os valores tabelados para a significância de 5%, nível estabelecido neste trabalho, e a significância fornecida pelo SPSS precisa ser superior a 5%.

$$W = \frac{\left( \sum_{i=1}^N a_i x_i \right)^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (5.1)$$

onde  $x_i$  são os valores da amostra e  $a_i$  são constantes generalizadas das médias, variâncias e covariâncias da amostra de tamanho  $N$  de uma distribuição normal.

### 5.1.2 DISTRIBUIÇÃO LOGNORMAL

Os conjuntos de dados que não descreveram uma distribuição normal foram transformados para conjuntos de dados lognormais como mostra a equação 5.2, KUBALA KUKUS (2004) cita que é comum a concentração elementar em materiais biológicos descreverem uma distribuição assimétrica, e mais precisamente uma lognormal. O teste de Wilk foi aplicado novamente nas distribuições para testar a distribuição transformada.

$$x' = \ln(x) \quad (5.2)$$

## 5.2 TESTE T DE AMOSTRAS PAREADAS

Amostras pareadas são consideradas em planejamentos nos quais medem os mesmos sujeitos, ou seja, dados pareados, onde a unidade é o seu próprio controle. Este tipo de planejamento é utilizado quando se deseja determinar o nível de certa medida (peso, concentrações sanguíneas, etc.) antes e depois de uma intervenção (dieta, tratamento medicamentoso, etc.) (ROSNER, 1995). O teste é apropriado para comparar as diferenças estatísticas significativas entre as médias das amostras pareadas. Considerando que as medidas tenham distribuição normal, a diferença entre elas também terá distribuição normal, portanto as distribuições t são apropriadas para testar a hipótese nula de que a média das diferenças é igual à zero (ROSNER, 1995). O teste t pareado é dado pela equação 5.3 com intervalo de confiança de 95%.

$$T = \frac{\bar{D} - \mu_D}{\frac{S_D}{\sqrt{n}}} \quad (5.3)$$

onde  $\bar{D}$  é a média amostral da diferença,  $\mu_D$  é o valor da hipótese nula,  $S_D$  é o desvio padrão da amostra e  $n$  é o tamanho das amostras.

Para comparar as diferenças significativas dos conjuntos de dados que não descreveram uma distribuição normal, o teste usado foi de Wilcoxon pareado, este é um método não paramétrico para comparação de duas amostras pareadas.

## 5.3 CORRELAÇÃO

Ao se estudar uma variável o interesse eram as medidas de tendência central, dispersão, assimetria, etc. Com duas ou mais variáveis além destas medidas individuais também é de interesse conhecer se elas têm algum relacionamento entre si, isto é, se valores altos (baixos) de uma das variáveis implicam em valores altos (ou baixos) da outra variável (BUSSAB, 1986). A análise de correlação fornece a relação entre duas variáveis que resume o grau de relacionamento linear entre as variáveis (LARSON e FARBER, 2010).

A análise de correlação feita em uma tabela não mostra facilmente o tipo de relacionamento que possa existir entre as duas variáveis. Para ter uma ideia melhor, as variáveis são distribuídas em um diagrama de dispersão. A análise gráfica da relação entre variáveis é importante, mas nossos olhos podem ser enganados por uma mudança de escalas, ou pela quantidade de espaço em branco em torno do aglomerado dos pontos. Deve-se, então, utilizar uma medida numérica para suplementar o gráfico, a essa medida numérica dá-se o nome de coeficiente de correlação linear de Pearson, dado pela equação 5.4.

$$r = \frac{n \sum (x_i \cdot y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{\sqrt{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \cdot \sqrt{n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}} \quad (5.4)$$

O coeficiente de correlação linear mede a correlação em estatística paramétrica, o valor de  $r$  é um número que varia de -1 a +1 e sua interpretação dependerá do valor numérico e do sinal, como segue na tabela 5.1.

**Tabela 5.1-** Coeficientes de Correlação.

<b>Coeficiente de correlação</b>	<b>Correlação</b>
$r = 1$	Perfeita positiva
$0,8 \leq r < 1$	Forte positiva
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderada positiva
$0,1 \leq r < 0,5$	Fraca positiva
$0 \leq r < 0,1$	Ínfima positiva
0	Nula
$-0,1 < r < 0$	Ínfima negativa
$-0,5 < r \leq -0,1$	Fraca negativa
$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderada negativa
$-1 < r \leq -0,8$	Forte negativa
$r = -1$	Perfeita negativa

Fonte: Larson (2010).

Em estatística, a correlação de postos de Spearman é uma medida não paramétrica, que foi utilizada para amostras que não assumiram uma distribuição normal. O coeficiente de correlação de Spearman é definido como o coeficiente de correlação de Pearson entre variáveis classificadas em postos (Myers, 2013). O coeficiente  $\rho$  de Spearman varia entre -1 e 1. Quanto mais próximo estiver destes extremos, maior será a associação entre as variáveis. O sinal negativo da correlação significa que as variáveis variam em sentido contrário, isto é, as categorias mais elevadas de uma variável estão associadas a categorias mais baixas da outra variável. O coeficiente  $\rho$  de Spearman é dado pela equação 5.5.

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n d_i^2}{n^3 - n} \quad (5.5)$$

em que  $n$  é o número de pares  $(x_i, y_i)$  e  $d_i = (\text{postos de } x_i \text{ dentre os valores de } x) - (\text{postos de } y_i \text{ dentre os valores de } y)$ . Se os postos de  $x$  são exatamente iguais aos pontos de  $y$ , então todos os  $d_i$  serão zero e  $\rho$  será 1.

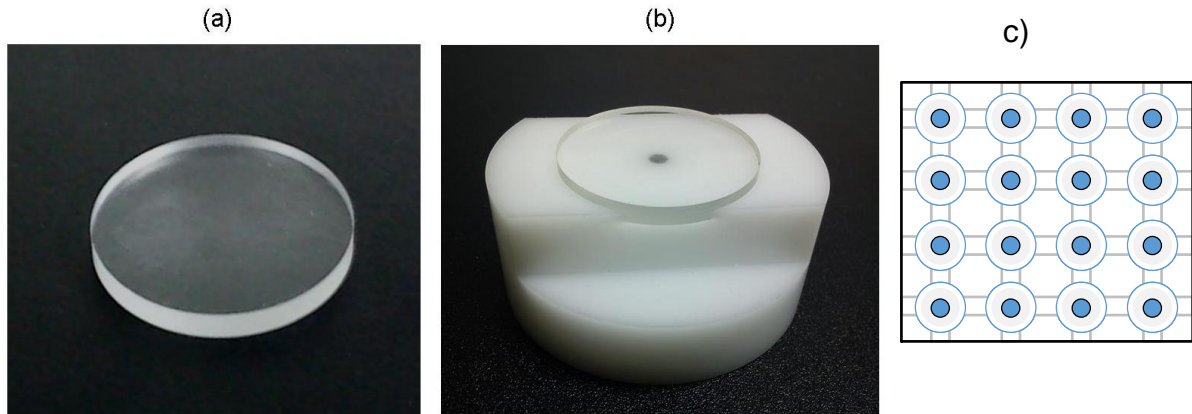
## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

Para validação da metodologia de análise foram utilizados padrões certificados de água (NIST 1640 e 1640e) provenientes do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologias (NIST, do inglês National Institute of Standards e Technology). As amostras de saliva analisadas foram coletadas de atletas de futsal e jiu jitsu e as amostras de plasma foram coletadas somente dos atletas de futsal.

### 6.1 DISCO DE ACRÍLICO UTILIZADO

O disco de acrílico utilizado para as análises das amostras de saliva no sistema TXRF é do tipo pastilha cilíndrica com diâmetro de 3 cm e espessura de 3 mm, fornecido pelo fabricante do sistema, a empresa Bruker S.A (Atibaia, Brasil). Esses discos possuem películas protetoras para não haver contaminação do mesmo, as quais são retiradas antes da deposição das amostras para análise. Para a deposição da amostra, a pastilha de acrílico é colocada sobre um suporte que contém uma marca no centro. A Figura 6.1 apresenta o disco de acrílico e seu suporte para deposição.

Foram realizadas medidas no disco de acrílico juntamente com o padrão de Ga depositado sobre o mesmo, a qual será chamada de branco. Branco de amostra é uma matriz igual à da amostra, mas sem as substâncias que você deseja analisar. Serve para verificar se existem interferências no procedimento analítico. Utiliza-se o branco para fazer a subtração dos elementos pré-existentes no disco de acrílico dos elementos encontrados nas amostras. Os elementos identificados foram: potássio, enxofre e argônio. O elemento argônio, sendo ele inerte e presente no ar está dentro do sistema, pois o sistema não está em vácuo, nesse caso o Ar foi medido juntamente com os outros elementos identificados nas amostras estudadas. Portanto, nas análises de todas as amostras o Ar foi desconsiderado.



**Figura 6.1 – (a) Disco de acrílico, (b) suporte para deposição das amostras e (c) suporte para secagem e armazenagem das mesmas.**

**Fonte:** Elaborada pela autora

## 6.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Neste trabalho analisaram-se amostras de sangue e saliva de atletas de futsal submetidos a um teste físico agudo. Amostras de saliva foram coletadas de atletas de jiu jitsu (masculino) submetidos a um período de 8 semanas de treinamento preparatório para competição internacional.

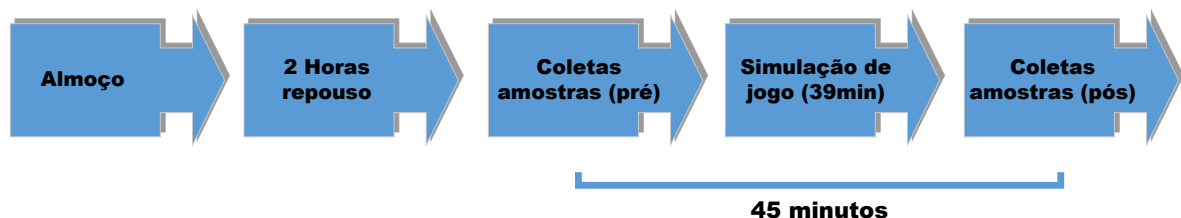
### 6.2.1 COLETAS DAS AMOSTRAS DE SALIVA E SANGUE DOS ATLETAS DE FUTSAL

Foram coletadas 13 amostras de saliva e 12 amostras de sangue, de uma equipe profissional de futsal que disputou a série prata do campeonato paranaense de futsal (segunda divisão do campeonato paranaense). Os jogadores compareceram ao laboratório de fisiologia do clube, ao qual a equipe está vinculada, para caracterização da amostra. A amostra foi composta de atletas com peso médio de  $71,4 \pm 7,2$  Kg, idade média de  $26,4 \pm 7,8$  anos e altura  $1,75 \pm 0,06$  metro como apresenta a tabela 6.1. As coletas de amostras foram realizadas no período da manhã com aproximadamente 48 horas sem realizarem exercícios.

**Tabela 6.1-** Dados da altura, peso e idade dos atletas de futsal.

<b>Atletas</b>	<b>Altura (m)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>Idade (anos)</b>
1	1,85	87,7	22
2	1,74	68,9	39
3	1,84	73	39
4	1,76	78,7	30
5	1,81	71	21
6	1,75	65,8	19
7	1,69	63,2	28
8	1,77	70,2	20
9	1,72	62,1	39
10	1,61	66,5	22
11	1,72	75,1	23
12	1,79	79	21
13	1,74	67,2	20

Primeiramente foram coletadas amostras de saliva e logo em seguida amostras sanguíneas. Todos os indivíduos apresentaram boa saúde periodontal. As amostras foram coletadas em duas etapas: 1ª etapa, 2 horas após o almoço, não realizando o controle de desidratação e dieta, no qual esta etapa foi chamada de (pré) e a 2ª etapa: momento após a simulação do jogo chamada de (pós), como apresenta a Figura 6.2. As amostras de saliva não estimulada foram coletadas por expectoração em frascos esterilizados, durante 2 minutos após os sujeitos apresentarem suas bocas enxaguadas com água deionizada duas vezes. As amostras de saliva foram centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos para separar os sobrenadantes, o qual foi armazenado em alíquotas de aproximadamente 1 ml usando micropipetas e ponteiros descartáveis e mantidas a -20°C até a análise.

**Figura 6.2-** Apresenta a logística da coleta das amostras de futsal.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

As coletas de plasma foram coletadas de treze atletas, sendo que uma amostra foi descartada por hemólise durante a centrifugação. Aproximadamente 5 ml de plasma foram coletados na fossa antecubital do braço dos jogadores por meio do método a vácuo em Vacutainer® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Após a retirada, as amostras de plasma foram transportadas ao laboratório e centrifugadas por 10 minutos a 5000 rotações por minuto (rpm) para separar o plasma, o qual foi armazenado em alíquotas de aproximadamente 1 ml usando micropipetas e ponteiras descartáveis e mantidas a -20°C até a análise.

### **6.2.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SALIVA DOS ATLETAS DE JIU JITSU**

Foram avaliados 12 atletas de jiu jitsu de faixa roxa, marrom e preta. Os atletas tinham no mínimo 6 anos de experiência na prática de jiu jitsu, tendo participado de campeonatos estaduais e/ou nacionais, entre os anos de 2015 a 2017. Os indivíduos foram submetidos a exame bucal, para detecção de lesões inflamatórias agudas ou crônicas e focos de infecção bucal que possam alterar os níveis de marcadores biológicos observados em saliva. Foram excluídos indivíduos com periodontite crônica, lesões cáries ativas e sob risco de desenvolver abscessos bucais. Foram excluídos do estudo atletas que estavam fazendo uso de medicamentos de uso contínuo, esteroides, anabolizantes e suplementos alimentares e atletas com lesões músculo-esqueléticas e doenças que impeçam a realização das sessões de treinamento ou testes.

Os atletas compareceram a pelo menos 3 sessões semanais de treinamento técnico-tático e 5 sessões semanais de treinos físicos, durante 7 semanas preparatórias para o campeonato Sul-Americano de jiu jitsu de 2015.

O procedimento de coleta de saliva foi o mesmo citado no item 6.2.1, mas as etapas foram diferentes. Foram realizadas três etapas: 1ª etapa: antes do período de treinamento preparatório para a competição (pré), 2ª etapa: após 4 semanas de treino (pós 1) e a 3ª etapa: após 8 semanas de treino (pós 2), fim do período de preparação para a competição, como apresenta o esquema da Figura 6.3. As amostras foram coletadas entre 8 e 10 horas no período da manhã em jejum e em repouso



Todos os atletas (futsal e jiu jitsu) preencheram um termo de consentimento livre esclarecido após receberem todas as informações a respeito do projeto. Os procedimentos foram realizados após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos. O termo de consentimento e aprovação do comitê de ética encontra-se no Apêndice A2.



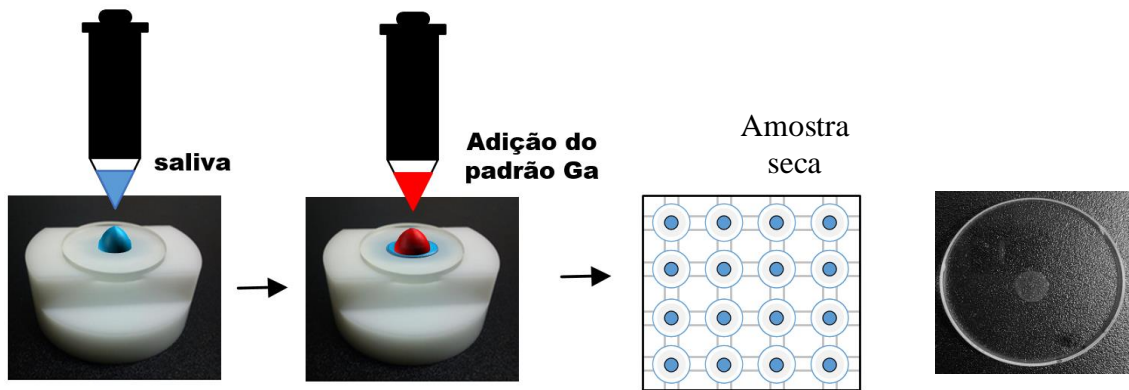
**Figura 6.3-** Apresenta a logística da coleta das amostras de jiu jitsu.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 6.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A alíquota de 1 ml que estava à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  foi descongelada em temperatura ambiente. Após o descongelamento as amostras estavam em sua fase líquida, com isso foi retirado com a ajuda de uma micropipeta e ponteiros descartáveis estéreis  $10\ \mu\text{L}$  de saliva. Essas amostras foram colocadas sobre o disco de acrílico, que contém dois lados utilizáveis, a superfície de cada lado continha uma pequena marcação referente aos números dos atletas para diferenciar as amostras (pré) das amostras (pós). Sobre a amostra de saliva foi depositado  $10\ \mu\text{L}$  de padrão gálio com concentração de  $5\ \text{mg/L}$ , ver Figura 6.4. Em seguida os discos de acrílico foram colocados em um suporte, o qual foi confeccionado para secagem das amostras e armazenagem das mesmas até análise de TXRF. Para a manipulação de todo o procedimento de preparação das amostras foram usadas máscara e luvas sem talco.

O suporte com os discos de acrílico foi colocado em uma estufa para secagem com temperatura aproximada de  $55\ ^{\circ}\text{C}$  com um tempo aproximado de 35 minutos de secagem. O procedimento usado nas amostras desse trabalho foi baseado ao procedimento descrito por (CALLE, 2013), o qual é chamado de procedimento direto sem tratamento, o mesmo procedimento foi realizado nas amostras NIST.



**Figura 6.4 – Esquema representativo em ordem de etapas.**

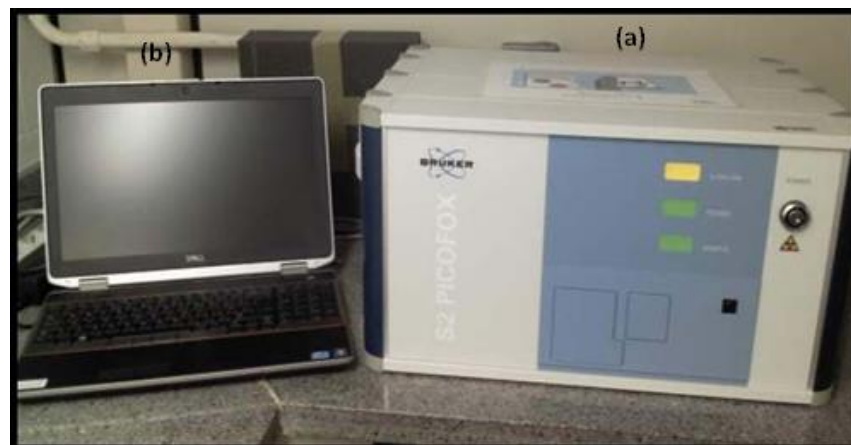
Fonte: Elaborada pela autora.

#### 6.4 AMOSTRAS CERTIFICADAS DE ÁGUA

A fim de verificar a precisão e acurácia do equipamento de TXRF foram utilizadas as amostras certificadas de água NIST 1640 e 1643e. As amostras certificadas seguiram o mesmo procedimento de preparação das amostras do trabalho, as concentrações obtidas e certificadas são apresentadas sessão 7.

#### 6.5 SISTEMA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF)

Com o objetivo de obter análises qualitativas e quantitativas dos elementos presentes nas amostras de saliva e sangue, foi utilizado o sistema de bancada S2 PICOFOX da Bruker S.A, a Figura 6.5 ilustra o sistema. O sistema encontra-se no Laboratório de Física Nuclear Aplicada (LFNA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).



**Figura 6.5- Sistema de TXRF, a) espectrômetro e b) computador.**

Fonte: Elaborada pela autora.

O tubo de raios X com foco em linha reta opera com uma potência de 30 W, voltagem de 50 kV, corrente de 602  $\mu\text{A}$  e alvo de Mo. Possui um monocromador de Ni/C, 17,5 KeV com 80 % de refletividade, seu detector correspondente é de silício drift (Si-Drift, XFlash®), com área útil de 10  $\text{mm}^2$  e resolução de 150 eV. O feixe que colide com a amostra possui um ângulo  $< 0,1^\circ$ .

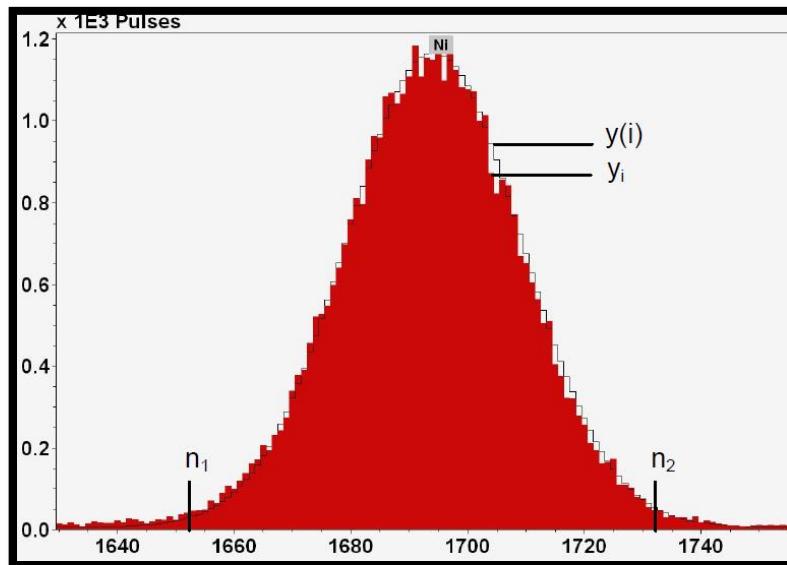
O computador utilizado para obtenção dos espectros possui o software SPECTRA já instalado, disponibilizado pelo fabricante do TXRF. O software é responsável por coletar toda informação proveniente da eletrônica e, por fim, gerar um espectro de energia para análise, com ele pode modificar o tempo de irradiação na amostra, introduzir elementos identificados, desconvolução de picos sobrepostos e outros fatores. Além das concentrações de cada elemento o software também disponibiliza os seguintes valores: background (contagem de fundo), desvio padrão (sigma), ajuste realizado pelo software no espectro medido (Chi) e o limite mínimo de detecção já informado no item 4.5. O valor do sigma informado pelo sistema é dado através da fórmula 6.1.

$$\delta = \sqrt{N_i + 2N_{BG}} \quad (6.1)$$

onde  $N_i$  é a contagem líquida do elemento  $i$  de interesse,  $N_{BG}$  é a contagem da área do fundo. O parâmetro estatístico que indica a qualidade do ajuste "fit" é dado pela equação 6.2.

$$\chi^2 = \frac{1}{n_2 - n_1} \sum_{i=n_1}^{n_2} \frac{1}{\delta_i^2} (y_i - y(i))^2 \quad (6.2)$$

sendo  $n_1$  e  $n_2$  o intervalo do pico de energia do elemento analisado,  $y_i$  a contagem medida e  $y(i)$  a contagem obtida pelo ajuste. A Figura 6.6 indica as variáveis  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $y_i$  e  $y(i)$ .



**Figura 6.6 – Pico do elemento Ni.**

**Fonte:** BRUKER, S2 Picofox.

### 6.5 MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL

O sistema (eletrônica e tubo de raios X) foi ligado uma hora antes das análises para estabilização do mesmo, logo após a estabilização foi realizada a calibração do sistema e as medidas das amostras.

As medidas das amostras já secas foram realizadas com um tempo de irradiação de 1000 s para todas as amostras de saliva (futsal e jiu jitsu) e sangue (futsal). Todos os discos com suas respectivas amostras foram rotacionadas manualmente em cerca de  $120^\circ$  no próprio suporte do sistema para realizar a triplicata, resultando em 3000 s medidos por amostra.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão mostrados os resultados obtidos por Fluorescência de Raios X por reflexão total (TXRF) para os experimentos realizados com amostras de saliva dos atletas de futsal e jiu jitsu e amostras de plasma dos atletas de futsal.

### 7.1 ELEMENTOS MEDIDOS

As concentrações elementares medidas pelo método TXRF foram determinadas a partir da área do pico de cada elemento em relação ao padrão interno Ga, como mencionado no item 4.6. Os elementos medidos nas amostras de saliva e sangue foram: P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Rb, Hg e Pb.

### 7.2 AMOSTRAS CERTIFICADAS NIST 1640E

Os resultados das medidas do padrão certificado de água NIST 1640e estão apresentados na tabela 7.1, respectivamente. A amostra NIST seguiu o mesmo procedimento de preparação das amostras utilizadas neste trabalho, como mencionado na sessão 6.3. As medidas foram feitas em triplicatas e tempo de aquisição de 1000s, resultando em tempo final de 3000s para cada amostra. As concentrações são apresentadas em ( $\mu\text{g/L}$ ) devido à concentração traço de vários elementos.

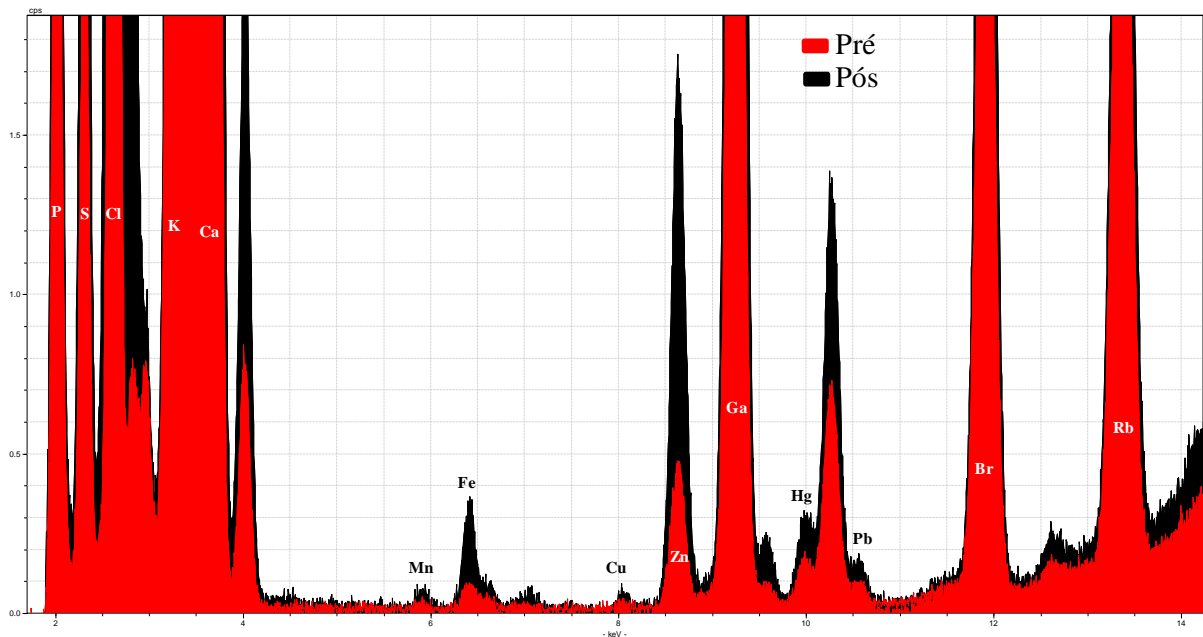
De maneira geral, como esperado as recuperações dos elementos foram satisfatórias tendo variado de 89 a 114%, com exceção do Zn que obteve valor de recuperação superior a 120% e do Rb valor inferior a 80%.

**Tabela 7.1** – Concentrações ( $\mu\text{g/L}$ ) das amostras certificadas e medidas NIST 1640e.

Elementos	Certificado		Medido		LLD ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação
	Conc. ( $\mu\text{g/L}$ )	Desvio ( $\mu\text{g/L}$ )	Conc. ( $\mu\text{g/L}$ )	Desvio ( $\mu\text{g/L}$ )		
<b>K</b>	2034	29	1808	16	7,3	89%
<b>Ca</b>	32300	1100	32888	95	4	102%
<b>Mn</b>	38,97	0,45	40	0	0	103%
<b>Fe</b>	98,1	1,4	112	4	0	114%
<b>Cu</b>	22,76	0,31	22	2	0	97%
<b>Zn</b>	78,5	2,2	172	1	0	219%
<b>Rb</b>	14	0,18	6	1	2	42%
<b>Pb</b>	20	0,21	21	2	0	105%

### 7.3 Amostras De Saliva Dos Atletas De Futsal

As concentrações elementares das triplicatas de saliva (pré e pós) de cada atleta podem ser vista no Apêndice A1. A Figura 7.1 mostra um exemplo de espectros de TXRF de um atleta para as amostras de saliva (pré e pós), respectivamente.



**Figura 7.1 – Exemplo de espectros das amostras de saliva (pré e pós) de um atleta de futsal.**

**Fonte:** Elaborada pela autora.

A taxa do fluxo salivar foi analisada para verificar se houve um aumento ou diminuição do mesmo após o exercício físico, essa taxa foi encontrada através do volume de saliva expectorada por um tempo de 2 minutos. Foi verificado que o fluxo salivar diminuiu ( $P < 0,01$ , teste t pareado) a partir de  $2,05 \pm 0,93$  ml/min (pré) para  $1,51 \pm 0,75$  ml/min (pós), esse fato pode estar associado à ativação do sistema nervoso simpático. Mesmo com a taxa de fluxo salivar reduzida após o exercício, nenhuma alteração significativa na concentração dos elementos foi observada.

Todas as amostras de saliva apresentam os elementos P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb. Os elementos que não foram encontrados em todas as amostras estão descritos a seguir juntamente com a taxa encontrada sobre o total de amostras. O Ti foi detectado em 11 amostras (pré e pós). Mn foi detectado em 10

amostras (pré e pós). Para o elemento Pb foram 1 amostra (pré e pós). Hg foi observado em 6 amostras (pré) e 3 amostras (pós).

Os conjuntos de dados passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, este teste permite verificar se a distribuição de um conjunto de dados descreve uma distribuição normal para valores de  $W > 0,866$ . A tabela 7.2 apresenta os dados do teste de Shapiro-Wilk para todos os elementos encontrados nas amostras de saliva dos atletas de futsal, referentes às médias dos elementos acompanhado dos desvios padrão, p-valor, teste W e o coeficiente de variação. Pré significa amostras que foram coletadas antes da simulação do jogo de futsal e pós significa amostras que foram coletadas após a simulação do jogo. Podemos afirmar com nível de significância de 0,05 que os elementos P, K, Ca, Mn, Cu, Zn, Br, Rb e Hg (pré) e os elementos P, Ca, Br e Hg (pós) provém de uma população normal, esses elementos passaram no teste de normalidade. O elemento Pb não possui valores suficientes para realizar o teste de normalidade. A amostra pós do indivíduo 9 para o elemento Cl possui uma variação mais elevada em relação as demais amostras, devido a esse fato o valor do desvio está alto.

**Tabela 7.2** – Teste de normalidade, (pré) significa antes da simulação do jogo e (pós) significa após a simulação do jogo. P-valor é a probabilidade de significância, W teste de normalidade de Shapiro-Wilk e CV coeficiente de variação dado em porcentagem.

	Pré( $mg.l^{-1}$ ) <sup>+</sup>	P-valor	W	CV %	Pós ( $mg.l^{-1}$ )	P-valor	W	CV %
<b>P</b>	99,32 ± 4,07	0,51	0,94	24,69	98,83 ± 2,28	0,16	0,91	34,78
<b>S</b>	41,80 ± 2,83	0,04 <sup>*</sup>	0,86	61,72	37,70 ± 1,37	0,0006 <sup>***</sup>	0,70	63,67
<b>Cl</b>	95,65 ± 15,64	0,04 <sup>*</sup>	0,86	95,86	233,40 ± 40,58	0,0008 <sup>***</sup>	0,72	127,68
<b>K</b>	467,50 ± 25,72	0,96	0,96	20,24	459,40 ± 33,85	0,02 <sup>*</sup>	0,83	41,08
<b>Ca</b>	25,35 ± 1,60	0,46	0,94	41,59	28,57 ± 1,20	0,23	0,92	47,33
<b>Ti</b>	0,40 ± 0,26	0,002 <sup>*</sup>	0,74	142,70	0,32 ± 0,59	< 0,0001 <sup>****</sup>	0,49	193,06
<b>Mn</b>	0,07 ± 0,01	0,19	0,89	50,19	0,10 ± 0,01	<0,0001 <sup>****</sup>	0,58	139,88
<b>Fe</b>	2,06 ± 0,27	0,04 <sup>*</sup>	0,86	105,14	1,58 ± 0,14	0,01 <sup>*</sup>	0,81	103,10
<b>Cu</b>	0,049 ± 0,004	0,27	0,92	60,27	0,032 ± 0,001	0,02 <sup>*</sup>	0,85	67,05
<b>Zn</b>	0,36 ± 0,02	0,13	0,90	65,65	0,37 ± 0,02	0,009 <sup>**</sup>	0,81	83,37
<b>Br</b>	1,35 ± 0,08	0,99	0,99	34,75	1,19 ± 0,15	0,05	0,87	64,64
<b>Rb</b>	0,84 ± 0,05	0,59	0,95	27,28	0,89 ± 0,17	0,03 <sup>*</sup>	0,85	49,64
<b>Hg</b>	0,13 ± 0,007	0,27	0,88	41,53	0,10 ± 0,08	0,25	0,85	36,64
<b>Pb</b>	0,12 ± 0,06	-	-	-	0,19 ± 0	-	-	-

<sup>+</sup>Média ± desvio-padrão.

\*Elementos que não passaram no teste de normalidade.

Os elementos que não passaram no teste de normalidade para as amostras (pré) foram: S, Cl, Ti, Fe e para as amostras (pós) foram: S, Cl, K, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, Rb, esses conjuntos de dados foram transformados para dados lognormais. Após a transformação, os conjuntos de dados lognormais foram novamente testados pelo teste de Shapiro-Wilk. A tabela 7.3 apresenta somente os dados lognormais acompanhados do desvio padrão, p-valor, teste de normalidade W. Todos os conjuntos de dados lognormais passaram pelo teste de normalidade.

**Tabela 7.3** – Teste de normalidade para conjunto de dados lognormais, (pré) significa antes da simulação do jogo e (pós) significa após a simulação do jogo. P-valor é a probabilidade de significância, W teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

	<b>Pré(mg.l<sup>-1</sup>)<sup>+</sup></b>	<b>P-valor</b>	<b>W</b>	<b>Pós (mg.l<sup>-1</sup>)<sup>+</sup></b>	<b>P-valor</b>	<b>W</b>
<b>S</b>	3,56 ± 0,60	0,15	0,90	3,49 ± 0,49	0,13	0,89
<b>Cl</b>	3,95 ± 1,36	0,24	0,92	4,47 ± 1,74	0,08	0,88
<b>K</b>	-	-	-	6,06 ± 0,36	0,55	0,95
<b>Ti</b>	-1,21 ± 1,05	0,94	0,51	-1,66 ± 1,03	0,15	0,89
<b>Mn</b>	-	-	-	-2,75 ± 0,94	0,28	0,91
<b>Fe</b>	-0,18 ± 1,66	0,12	0,89	-0,06 ± 1,13	0,60	0,95
<b>Cu</b>	-	-	-	-3,65 ± 0,66	0,47	0,94
<b>Zn</b>	-	-	-	1,29 ± 0,80	0,50	0,94
<b>Br</b>	-	-	-	1,20 ± 0,80	0,05	0,87
<b>Rb</b>	-	-	-	-0,20 ± 0,44	0,82	0,97

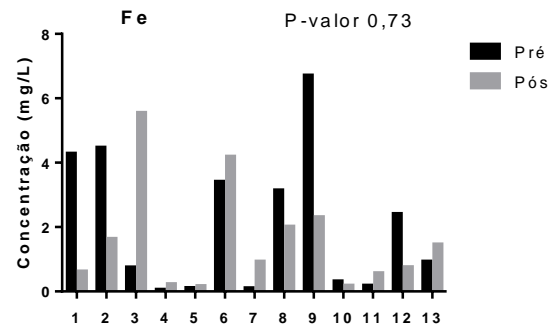
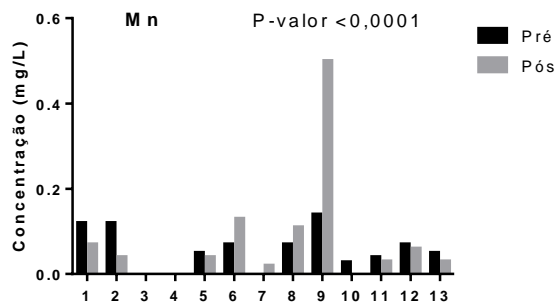
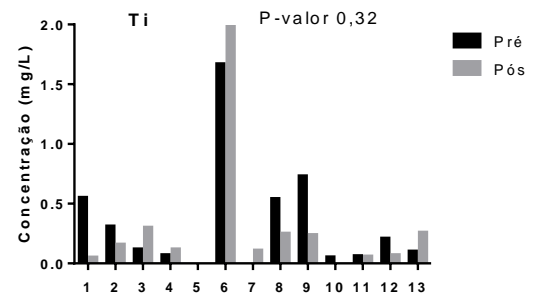
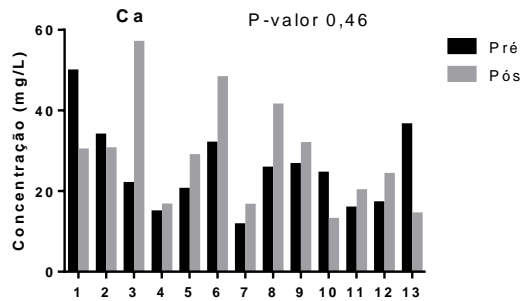
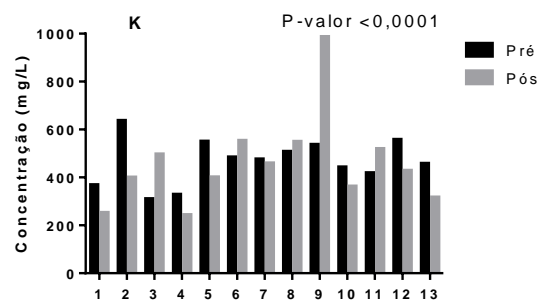
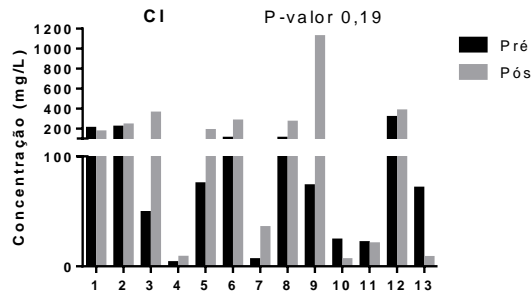
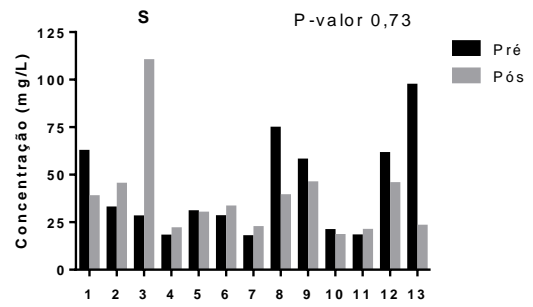
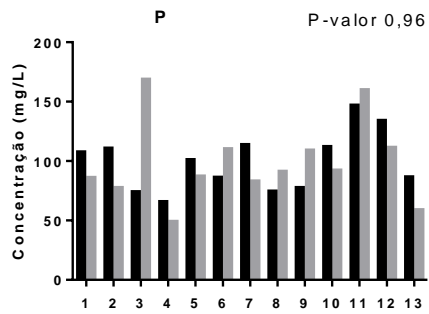
<sup>+</sup>Média ± desvio-padrão.

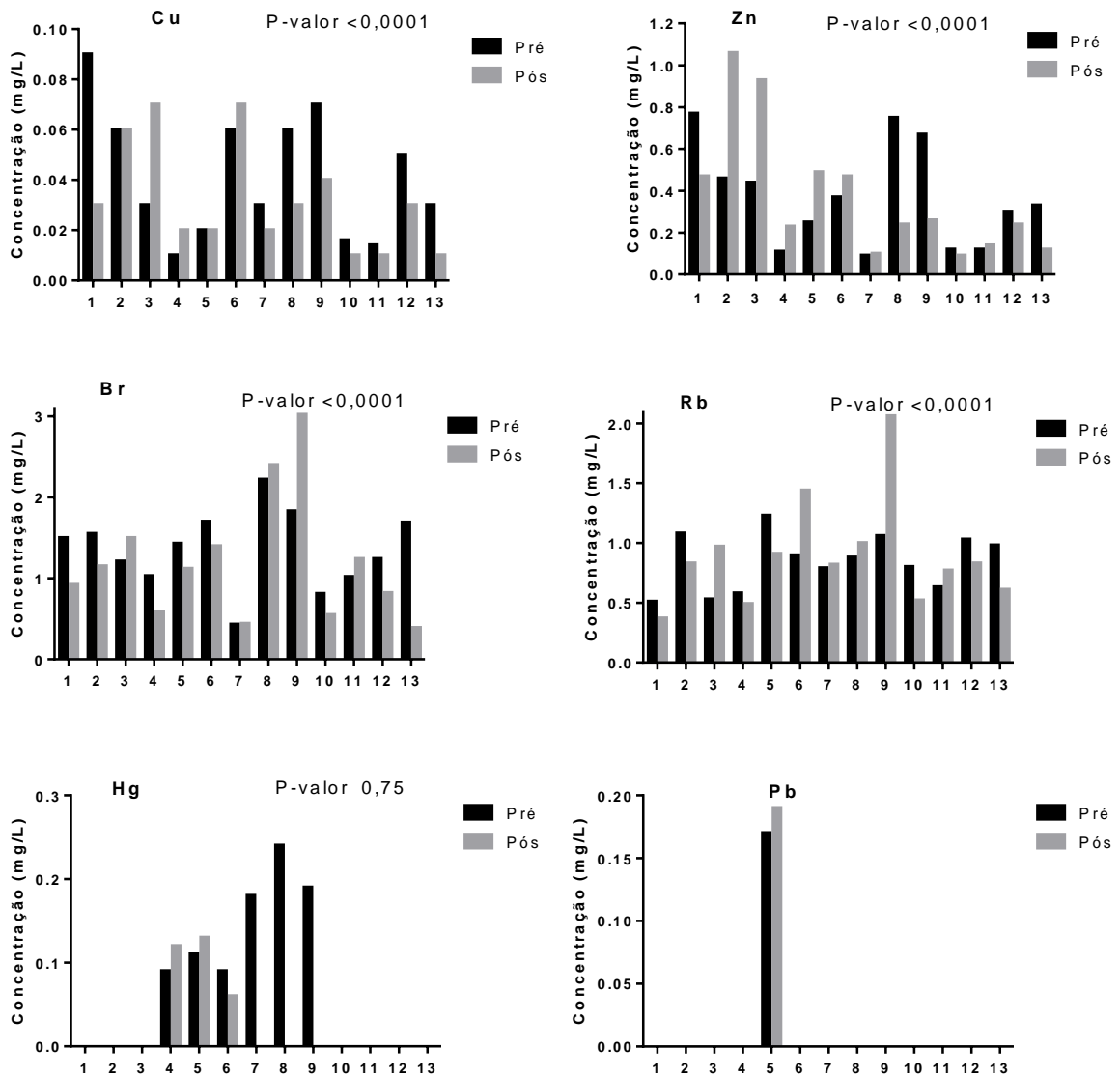
Como as amostras de saliva (pré e pós) medem os mesmos sujeitos, o teste t pareado foi usado com intervalo de confiança de 95% para comparar as diferenças estatísticas significativas das médias. A Figura 7.2 apresenta os valores referentes ao p-valor do teste t pareado para os conjuntos de dados que passaram no teste de normalidade. Podemos notar que os elementos que possuem uma diferença estatística entre amostras (pré e pós) são: K, Mn, Cu, Zn, Br e Rb.

A Figura 7.2 mostra a comparação das concentrações dos elementos identificados na saliva de cada atleta (pré e pós). Os atletas 3 e 9 foram os que obtiveram uma maior variação nas amostras pós de alguns elementos em relação aos demais atletas. Podemos verificar nos gráficos que o elemento que possui a concentração mais elevada em relação aos demais é o elemento K, o segundo mais elevado é o Cl. Os p-valores indicam quais elementos obtiveram



diferenças significativas entre as amostras pré e pós com nível de significância de 0,05.



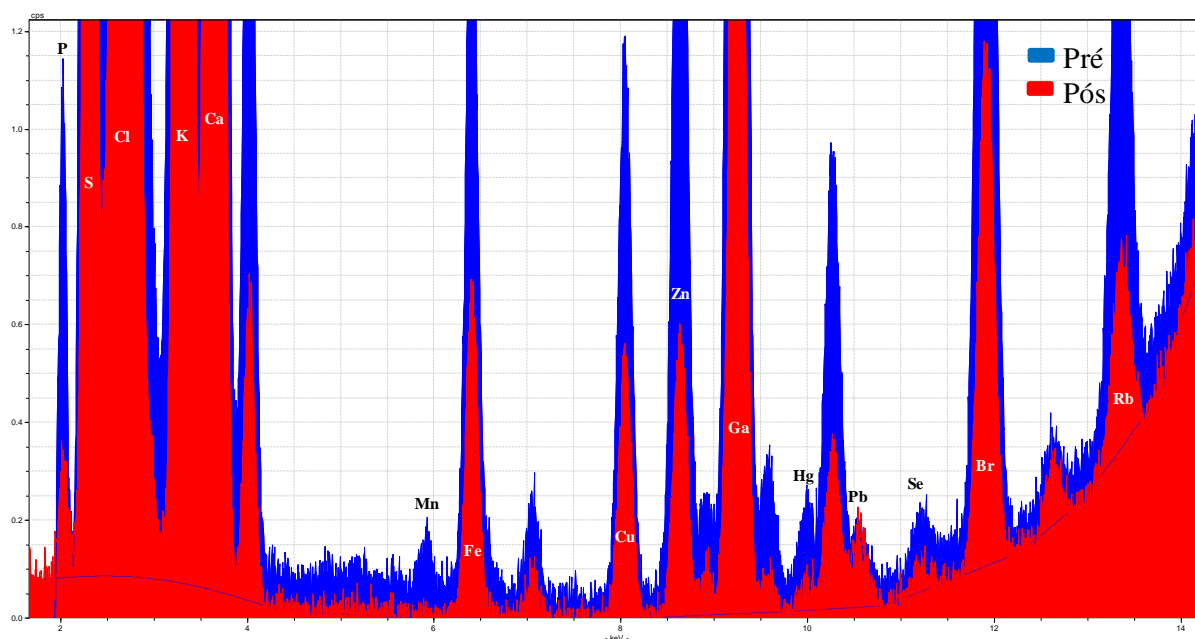


**Figura 7.2 – Gráfico referente à comparação das concentrações das amostras de saliva de cada atleta (pré e pós).**

Fonte: Elaborada pela autora

#### 7.4 AMOSTRAS DE PLASMA DOS ATLETAS DE FUTSAL

As concentrações elementares das triplicatas de plasma (pré e pós) de cada atleta, realizadas durante as medidas podem ser vistas no Apêndice A1. A Figura 7.3 mostra um exemplo dos espectros de TXRF para as amostras de plasma (pré e pós), respectivamente.



**Figura 7.3 – Exemplo de espectros das amostras de plasma (pré e pós) de um atleta de futsal.**

**Fonte:** Elaborada pela autora

Os elementos P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Se, Br e Rb estiveram presentes em todas as amostras (pré) e (pós) do plasma. Os elementos que não foram encontrados em todas as amostras estão descritos a seguir juntamente com a taxa encontrada sobre o total de amostras. Mn foi detectado em 11 amostras (pré) e 10 amostras (pós), Hg foi detectado em 4 amostras (pré) e 1 amostras (pós), Pb foi detectado em 3 amostras (pré) e 5 amostras (pós).

Os elementos identificados passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk como foi realizado anteriormente com o conjunto de dados das amostras de saliva. A tabela 7.4 apresenta os dados do teste de Shapiro-Wilk para todos os elementos identificados nas amostras de sangue (plasma) dos atletas de futsal, referentes às médias dos elementos acompanhado dos desvios padrão, p-valor, teste W e o coeficiente de variação. Pré significa amostras que foram coletadas antes da simulação do jogo de futsal e pós significa amostras que foram coletadas após a simulação do jogo. Podemos afirmar com nível de significância de 0,05 para as amostras (pré) os elementos P, S, Cl, K, Ca, Mn, Cu, Se, Br, Hg e Pb e para as amostras (pós) os elementos Mn, Zn, Se provém de uma população normal, esses elementos passaram no teste de normalidade para valores de  $W > 0,866$ .

**Tabela 7.4** – Teste de normalidade para o conjunto de dados das amostras de plasma, (pré) significa antes da simulação do jogo e (pós) significa após a simulação do jogo. P-valor é a probabilidade de significância, W teste de normalidade de Shapiro-Wilk e CV coeficiente de variação dado em porcentagem.

	<b>Pré(<math>\mu\text{g.l}^{-1}</math>)<sup>+</sup></b>	<b>P-valor</b>	<b>W</b>	<b>CV %</b>	<b>Pós (<math>\mu\text{g.l}^{-1}</math>)<sup>+</sup></b>	<b>P-valor</b>	<b>W</b>	<b>CV %</b>
<b>P</b>	14,53 $\pm$ 2,63	0,24	0,91	29,29	13,56 $\pm$ 1,22	0,64	0,95	39,36
<b>S</b>	148,03 $\pm$ 13,17	1,00	0,99	19,85	124,23 $\pm$ 6,89	0,93	0,97	15,08
<b>Cl</b>	741,58 $\pm$ 84,61	0,69	0,95	35,32	694,12 $\pm$ 37,15	0,79	0,96	24,31
<b>K</b>	409,62 $\pm$ 35,74	0,05	0,86	50,50	353,60 $\pm$ 15,66	0,06	0,86	19,45
<b>Ca</b>	31,85 $\pm$ 1,02	0,53	0,94	14,80	33,75 $\pm$ 0,68	0,61	0,95	10,81
<b>Mn</b>	0,12 $\pm$ 0,02	0,34	0,92	14,80	0,09 $\pm$ 0,02	0,006 <sup>*</sup>	0,77	10,81
<b>Fe</b>	1,11 $\pm$ 0,02	0,001 <sup>**</sup>	0,70	68,82	0,89 $\pm$ 0,03	0,14	0,90	30,20
<b>Cu</b>	0,46 $\pm$ 0,01	0,25	0,92	18,79	0,51 $\pm$ 0,01	0,33	0,93	28,93
<b>Zn</b>	0,80 $\pm$ 0,01	< 0,0001 <sup>****</sup>	0,63	79,80	0,93 $\pm$ 0,02	< 0,0001 <sup>****</sup>	0,66	92,01
<b>Se</b>	0,0310 $\pm$ 0,0007	0,19	0,87	86,50	0,030 $\pm$ 0,003	0,001 <sup>**</sup>	0,81	92,55
<b>Br</b>	0,94 $\pm$ 0,07	0,18	0,91	39,52	1,08 $\pm$ 0,02	0,31	0,92	23,39
<b>Rb</b>	0,29 $\pm$ 0,03	< 0,0001 <sup>****</sup>	0,63	54,44	0,25 $\pm$ 0,01	0,41	0,93	20,33
<b>Hg</b>	0,14 $\pm$ 0,01	0,35	0,88	39,02	0,01 $\pm$ 0,01	-	-	-
<b>Pb</b>	0,151 $\pm$ 0,005	0,41	0,91	44,39	0,09 $\pm$ 0,008	0,36	0,89	32,43

<sup>+</sup>Média  $\pm$  desvio-padrão.

\*Elementos que não passaram no teste de normalidade.

Os elementos que não passaram no teste de normalidade para as amostras (pré) foram: Fe, Zn, Rb e para as amostras (pós) foram: Mn, Zn, Se. Esses conjuntos de dados foram transformados para conjuntos de dados lognormais. Após a transformação os conjuntos de dados lognormais foram novamente testados pelo teste de Shapiro-Wilk. A tabela 7.5 apresenta somente os dados lognormais acompanhados do desvio padrão, p-valor, teste de normalidade W. Os elementos que não passaram no teste de normalidade para os conjuntos de dados transformados (lognormais) foram: Rb para amostras (pré) e Mn, Zn e Se para as amostras (pós).

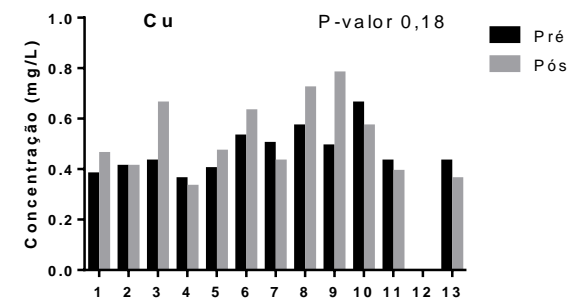
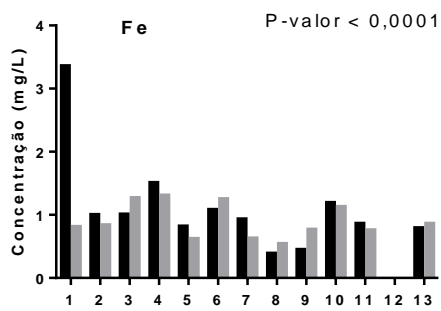
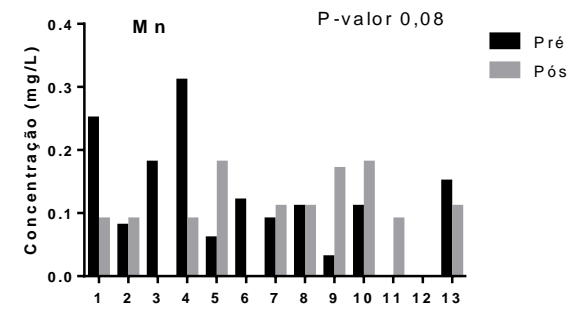
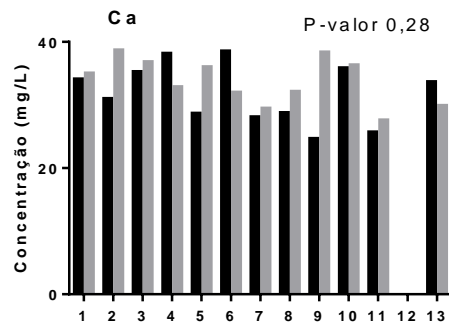
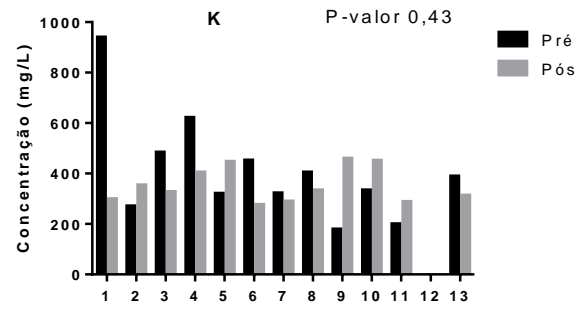
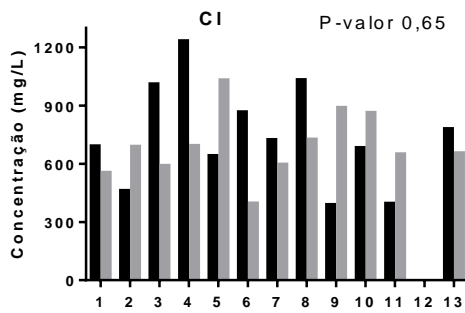
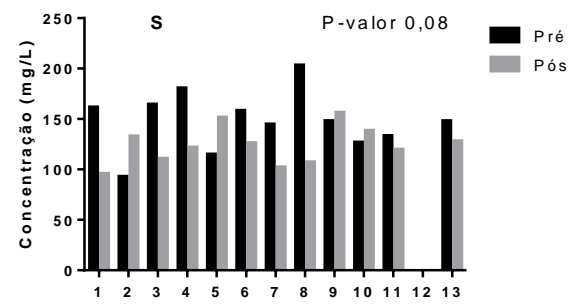
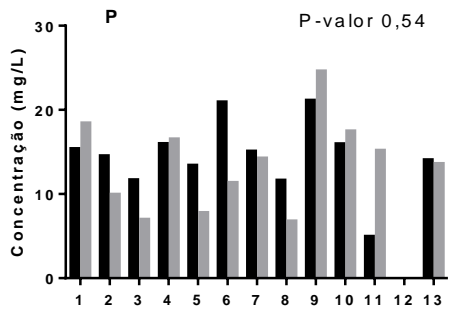
**Tabela 7.5** – Teste de normalidade para conjunto de dados lognormais das amostras de plasma, (pré) significa antes da simulação do jogo e (pós) significa após a simulação do jogo. P-valor é a probabilidade de significância, W teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

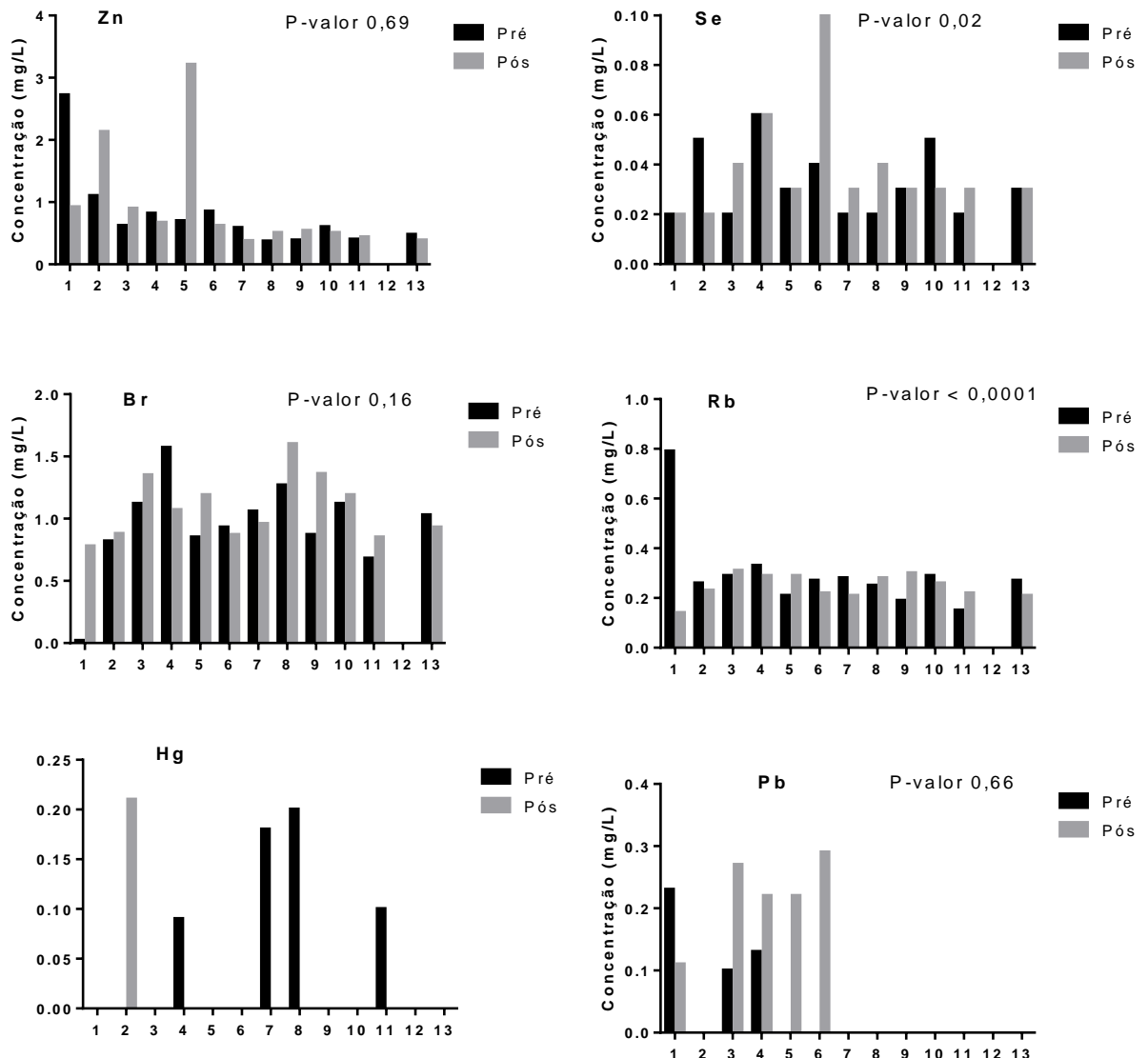
	Pré( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) <sup>+</sup>	P-valor	W	Pós ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) <sup>+</sup>	P-valor	W
<b>Mn</b>	-	-	-	-2,1 ± 0,3	0,01*	0,81
<b>Fe</b>	-0,04 ± 0,54	0,25	0,92	-	-	-
<b>Zn</b>	-0,39 ± 0,55	0,07	0,87	-0,31 ± 0,66	0,02*	0,83
<b>Se</b>	-	-	-	-3,5 ± 0,19	0,04*	0,85
<b>Rb</b>	-1,30 ± 0,40	0,03*	0,84	-	-	-

\*Média ± desvio-padrão.

Como as amostras de plasma (pré e pós) medem os mesmos sujeitos, o teste t pareado foi usado com intervalo de confiança de 95% para comparar as diferenças estatísticas significativas das médias. A Figura 6.5 apresenta os resultados referentes do p-valor do teste t pareado para os conjuntos de dados que passaram no teste de normalidade. O elemento Rb para o conjunto de dados de amostras (pré) e os conjuntos de dados dos elementos Mn, Zn e Se não passaram no teste de normalidade mesmo com a transformação lognormal, estes conjuntos de dados passaram pelo teste de Wilcoxon pareado e seus dados estão apresentados na Figura 7.4. Não há casos válidos suficientes para executar o teste de postos assinados por Wilcoxon para Hg, nenhuma estatística é calculada. Podemos verificar através do teste t pareado e do teste de postos assinados por Wilcoxon, que os elementos Fe, Se, Rb obtiveram diferenças significativas entre as amostras (pré e pós).

A Figura 7.4 mostra a comparação das concentrações dos elementos identificados no sangue (pré e pós) dos atletas de futsal. Podemos verificar que os elementos P, S, Cl, K, Mn, Fe, Se, Rb e Hg apresentaram uma maior concentração no momento pré do que pós. Os elementos Ca, Cu, Zn, Br e Pb apresentaram uma diminuição no momento pré do que pós.





**Figura 7.4 – Gráfico referente à comparação das concentrações das amostras de plasma (pré e pós) dos atletas de futsal.**

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 7.4.1 CORRELAÇÃO SALIVA E PLASMA (PRÉ E PÓS)

As correlações analisam a relação entre variáveis, quando estas são quantitativas ou também as ordens de variáveis, como nas ordinais. Se ambas as variáveis, dependente e independente, forem quantitativas e cumprirem com os restantes requisitos da estatística paramétrica, vistos anteriormente, pode-se então utilizar o  $r$  de Pearson. Caso os dados não apresentem normalidade podemos

aplicar o teste de Spearman. Foi realizada a correlação dos conjuntos de dados das amostras de saliva e sangue (pré e pós).

#### **7.4.2 CORRELAÇÃO SALIVA E PLASMA (PRÉ)**

A correlação entre as amostras de saliva e plasma (pré) estão apresentadas na Figura 7.5. De acordo com a tabela 5.1 de coeficientes de correlação citada na seção 5 podemos descrever a análise dos gráficos da Figura 7.5 e 7.6. A concentração do elemento P das amostras de plasma possui tendência de correlação moderada positiva com a concentração das amostras de saliva. Portanto, quanto maior a concentração na saliva maior a concentração no plasma. O P é liberado na saliva por transporte ativo de íons em ductos salivares, a concentração do P na saliva é maior do que no plasma (Proctor, 2016; Proctor e carpinteiro, 2014; Tobey e Anslyn, 2003). Rodrigues et al., 2016 verificou que as concentrações de plasma e saliva não são correlacionados. Alguns autores relataram que um ataque agudo de exercício de alta intensidade pode aumentar os níveis circulantes de P em atletas jovens (Karakukcu et al, 2013; Nishiyama et al., 1988). Enquanto outros autores demonstraram a redução dos níveis de compostos contendo fósforo (fosfatos) após um esforço extremo de uma ultramaratona (Zanchi et al., 2017). No presente estudo, os níveis de P estavam sob o limite de detecção da técnica TXRF.

Os elementos S, Fe, Cu e Rb possuem tendência de correlação fraca positiva. A concentração do elemento Cl das amostras de plasma possui tendência de correlação moderada negativa com a concentração das amostras de saliva. Portanto, quanto menor a concentração na saliva menor a concentração no plasma. O enxofre está envolvido no metabolismo aeróbio, perfil lipídico, estatus antioxidante e resistência à fadiga do músculo nos estudos de animais e humanos (Elshorbagy et al., 2012; Ferreira et al, 2011; Ito et al, 2014; Speich et al., 2001). No presente estudo, observou-se uma diminuição não significativa na concentração de íons de S no plasma e na saliva, sugerindo que as concentrações não foram significativamente alteradas por uma partida de futsal. Isto é interessante, pois alguns autores sugerem a utilização desses compostos contendo enxofre para diminuir a fadiga, dor e estresse oxidativo induzido por sessões de exercícios de alta intensidade (Ferreira et al., 2011; Soria et al, 2014; Withee et al., 2017). O



monitoramento de S na saliva pode ser avaliado com cautela, pois pode ser passivamente liberado pelas glândulas salivares, mas várias bactérias orais produzem e metabolizam compostos contendo enxofre. Além disso, o tabagismo, cálculo dental e halitose foram associados com o aumento dos níveis de íons de S na saliva (Krespi et al., 2006; Poles et al., 2016).

O elemento Fe tem sido monitorado em atletas como um marcador biológico do metabolismo de energia e anemia (Badenhorst et al, 2015; Ishibashi et al., 2017). Baixa concentração de ferro sérico tem sido descrita em atletas de rugby durante períodos de temporada (Clarke et al., 2017), ou durante períodos de alta formação em corredores de longa distância e triatletas (Coates et al., 2017; Ishibashi et al., 2017). No presente estudo, os esforços físicos não foram considerados intensos e não foram significativamente alterados os níveis circulantes de ferro. Taxa de concentração e secreção salivar também não eram afetadas e não se correlacionam com os níveis circulantes.

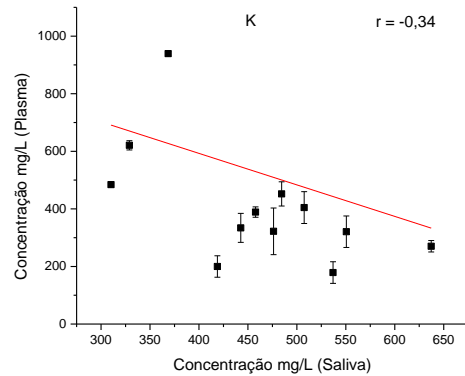
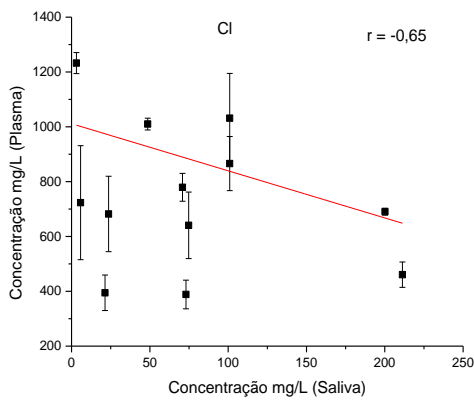
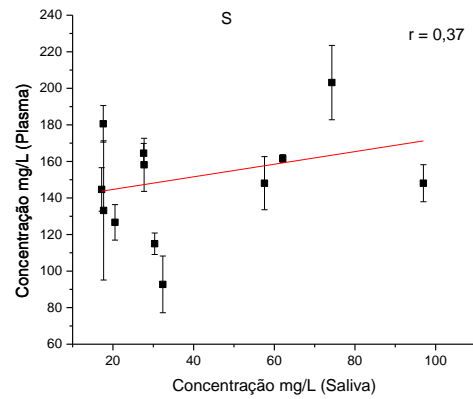
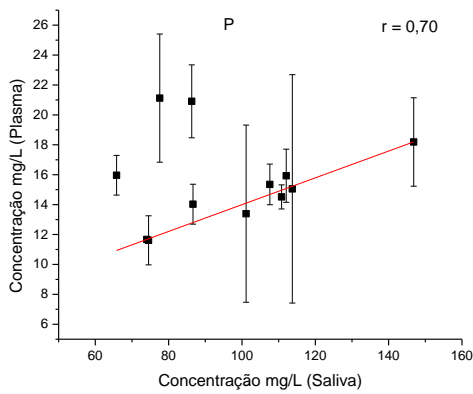
Os elementos K, Ca, Zn e Rb possuem tendência de correlação fraca negativa. O elemento K foi detectado em todas as amostras de saliva e plasma sugerindo que TXRF é um bom método para monitorar este marcador. A liberação do K é associada à fadiga muscular devido à deficiência  $\text{Na}^+\text{K}^+$  durante esforços intensos e maior liberação de  $\text{K}^+$  ao contrair os músculos esqueléticos (Atanasovska et al, 2014; Goodman et al., 2014). A concentração salivar de K não foi alterada pelo ataque agudo de exercício.

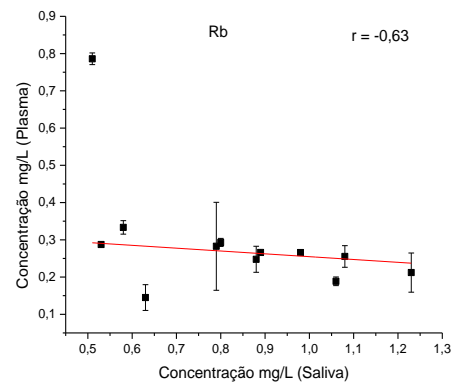
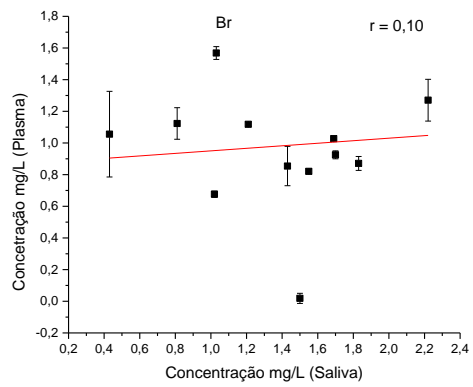
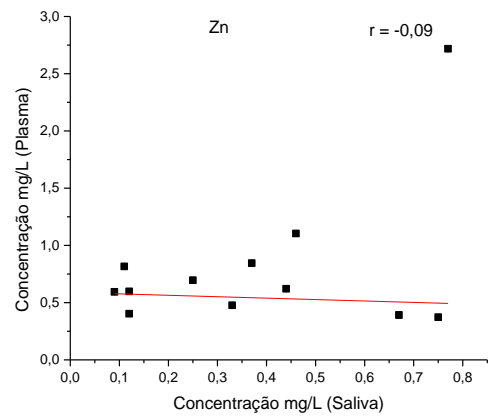
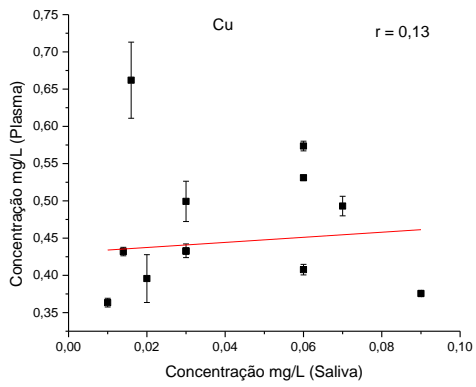
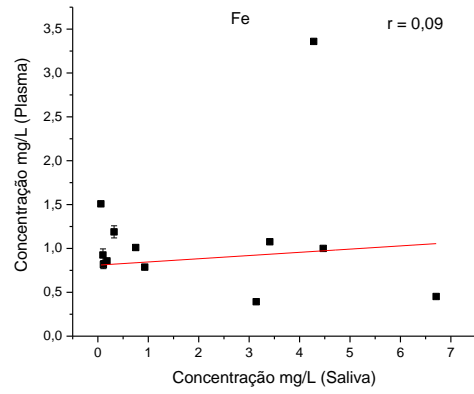
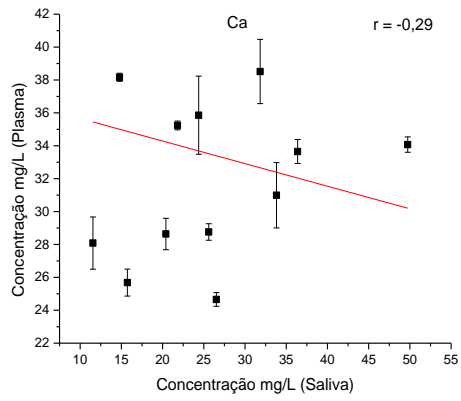
O cálcio é um elemento envolvido em várias vias de sinalização celulares e homeostase óssea. Alguns estudos têm demonstrado que um ataque agudo de exercício (treino de boxe) ou um esforço físico extremo (tal como uma ultramaratona) pode ter uma maior circulação de níveis de Ca (Karakukcu et al, 2013; Zanchi et al., 2017). Por outro lado, nenhuma mudança significativa foi observada em jogadores de basquete, depois de um período intenso de treinamento (Zhao et al., 2015). Avaliar o elemento Ca na saliva pode ser mais impreciso para monitoramento de atletas do que a retirada de sangue. O elemento Ca, bem como o P, é ativamente secretado na saliva e é essencial para a proteção de erosão de dentes e cáries.

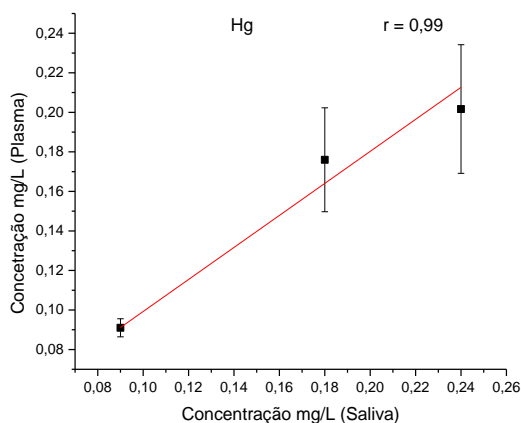
Ti foi identificado apenas em amostras de saliva e pode estar relacionada à contaminação de amostras de saliva de produtos odontológicos. Por

outro lado, algumas amostras de saliva e plasma apresentaram baixos níveis de Pb e Hg sugerindo que alguns atletas foram exposto a contaminantes ambientais.

Os elementos P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Cu, Br e Hg foram correlacionados através do teste r de Pearson e o elemento Rb foi correlacionado através do teste de Spearman. Podemos verificar que os elementos Mn, Fe, Cu e Br possuem uma correlação quase nula. Hg tem alta correlação positiva.







**Figura 7.5 – Gráfico referente ao teste de correlação de Pearson e Spearman das amostras de saliva e plasma (pré), (pré) significa antes da simulação do jogo.**

Fonte: Elaborada pela autora

#### 7.4.3 CORRELAÇÃO SALIVA E PLASMA (PÓS)

A correlação entre as amostras de saliva e plasma (pós) estão apresentadas na Figura 7.6. A concentração dos elementos Br e Zn das amostras de plasma possui tendência de correlação forte positiva com a concentração das amostras de saliva. Portanto, quanto maior a concentração na saliva maior a concentração no sangue. Os elementos P, Cl, K, Ca, Mn e Rb possuem tendência de correlação fraca positiva. A concentração dos elementos S e Fe das amostras de sangue possui tendência de correlação negativa com a concentração dos elementos das amostras de saliva. Portanto, quanto menor a concentração na saliva menor a concentração no sangue.

Manganês podem não ter sido detectado em todas as amostras de saliva e plasma, sugerindo que não é um bom marcador para acompanhamento de atletas de futsal por TXRF. O elemento Mn está relacionado à condição de antioxidantes no sangue e na saliva, mas sua concentração é muito menor na saliva em relação às amostras de plasma. Os níveis séricos de Mn pareciam não ser afetado por um único fim de exercício intenso em triatletas (Soria et al, 2015). Além disso, níveis salivares de Mn pareciam estar relacionada com a sua concentração

em outros fluidos biológicos, como urina e sangue (Gil et al., 2011), limitando a sua utilização para monitorar o Mn nos atletas.

O elemento Cu possui tendência de correlação ínfima negativa. Este elemento tem propriedades anti-inflamatórias e antioxidativas e positivamente correlacionados com o metabolismo lipídico (Casimiro-Lopes et al, 2009; Speich et al., 2001; Zhao et al., 2015). Em resposta aos esforços físicos agudos provocados por um teste de exaustão, voluntários saudáveis apresentaram aumento nos níveis circulantes de Cu, sugerindo que uma única sessão de exercício pode até modular os níveis circulantes de Cu (Cinar et al., 2007).

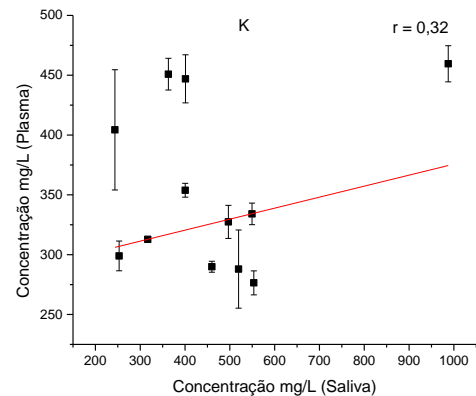
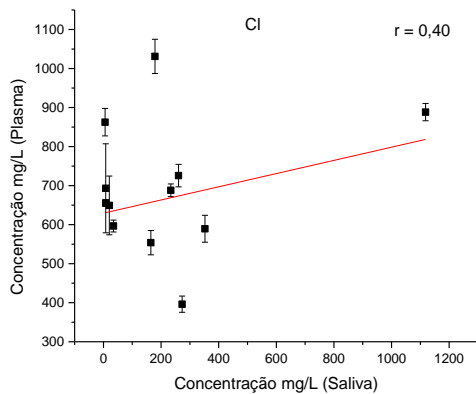
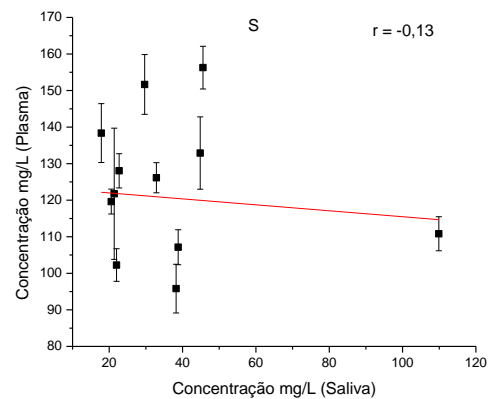
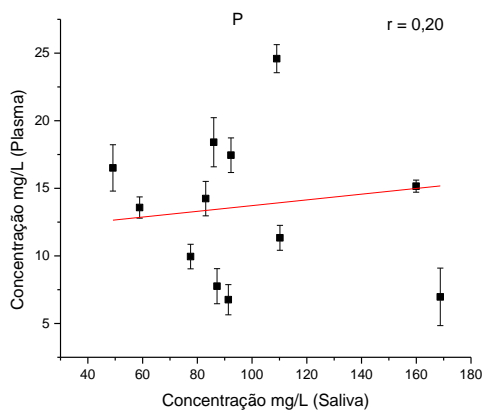
O Zn, assim como Cu, também está envolvido em processos inflamatórios e oxidativos e metabolismo energético (Casimiro-Lopes et al, 2009; Döker et al, 2014; Speich et al., 2001). Durante esforço máximo e submáximo, os níveis circulantes de Zn é maior (Cinar et al., 2007; Soria et al, 2015, 2016) e foram positivamente correlacionados com o estresse relacionado a secreção hormonal (Soria et al, 2016). Estes resultados sugerem que o exercício pode modular os níveis de Zn circulantes. No presente estudo, uma correlação moderada foi detectada entre concentração plasmática e salivar de zinco. Contudo, os níveis muito baixos de Zn encontrado na saliva podem não ser um marcador confiável para monitorar o status dos elementos através da técnica TXRF.

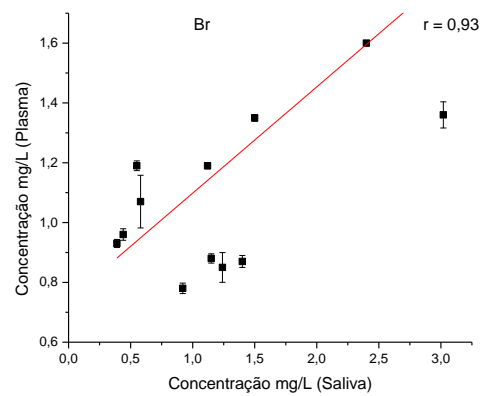
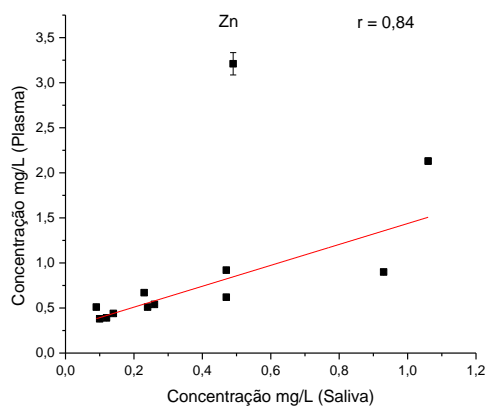
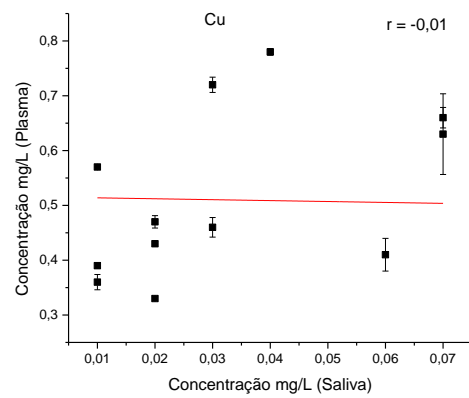
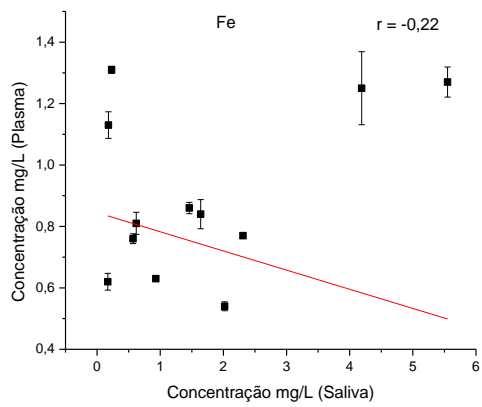
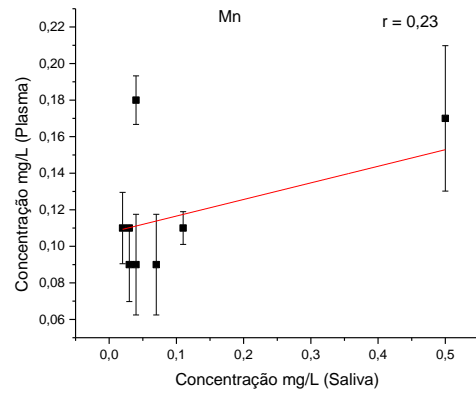
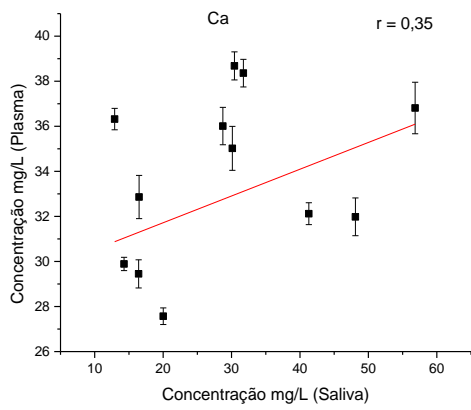
Os efeitos biológicos do Br não é completamente compreendido, mas parece estar relacionada à ativação de células inflamatórias e a produção de colágeno tipo IV por membranas em organismos vivos (Duerr et al, 2018; McCall et al., 2014). No presente estudo, a concentração de Br no plasma e na saliva foram observadas diferenças, apesar de uma diminuição da taxa de secreção salivar foram observados no pós. O mecanismo de secreção de Br na saliva não é compreendido, mas os resultados do presente estudo sugerem que a concentração de bromo não foram correlacionados com as exigências físicas de futsal e é transportado passivamente por glândulas salivares.

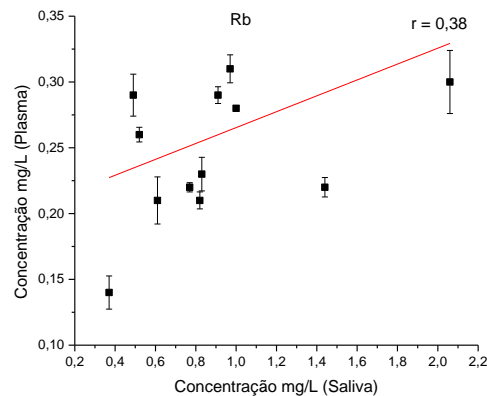
Foi observado que os atletas envolvidos nas modalidades anaeróbias e aeróbio-anaeróbio apresentam maiores níveis circulantes de Rb (Maynar et al., 2017). Os níveis salivares de Rb são 30 vezes enriquecidos em relação aos níveis séricos, sugerindo que é ativamente transportado pelas glândulas salivares (Olmez et al., 1988).

No presente estudo, verificaram-se níveis mais elevados de Rb na saliva em relação ao plasma, sugerindo que o Rb pode ter algum efeito biológico na cavidade oral e detecção de alterações em sua concentração em resposta aos esforços físicos pode ser mais facilmente detectada nas amostras de saliva.

Os elementos P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Br e Rb foram correlacionados através do teste  $r$  de Pearson e o elemento Zn foi correlacionado através do teste de Spearman. A correlação é significativa ao nível de 0,05 para todos os elementos menos para o Zn que foi de 0,01.







**Figura 7.6 – Gráfico referente ao teste de correlação de Pearson e Spearman das amostras de saliva e plasma (pós), (pós) significa após o jogo, r teste de Pearson e Spearman.**

Fonte: Elaborada pela autora

#### 7.4.4 CORRELAÇÃO PLASMA (PRÉ E PÓS) COM MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Foi realizada a correlação entre o plasma (pré e pós) com o exercício físico através da distância total percorrida dos atletas com os mediadores inflamatórios. Um dos mediadores inflamatórios é a TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral Alfa), refere-se a um grupo de citocinas capaz de estimular a resposta inflamatória. Seu mau funcionamento pode causar inflamações. O outro mediador é a Interleucina 6 (IL-6), é uma proteína que atua como uma citocina pró-inflamatória e também tem um papel contra a infecção. A tabela 7.6 mostra os resultados da correlação em questão. As concentrações dos elementos P(pós), S(pós), Cl(pré e pós), K(pré e pós), Ca(pós), Fe(pré e pós) e Zn(pós) estão correlacionados positivamente com a distância total percorrida. Portanto, quanto maior a distância total percorrida pelos atletas maior a concentração dos elementos no plasma. A concentração dos elementos P(pré), S(pré), Zn(pré) e Ca(pré) estão correlacionados negativamente com a distância total percorrida. Portanto, quanto maior a distância total percorrida pelos atletas menor a concentração dos elementos no plasma. As concentrações dos elementos (pré) P, S, Cl, K, Ca, Fe e Zn estão correlacionadas positivamente com a TNF- $\alpha$ . Portanto, quanto maior a quantidade de TNF- $\alpha$  maior a concentração dos elementos no plasma. A concentração dos elementos (pós) P, S,



Cl, K, Ca, Fe e Zn estão correlacionados negativamente com a TNF- $\alpha$ . Portanto, quanto maior a quantidade de TNF- $\alpha$  menor a concentração dos elementos no plasma. Por último a correlação da IL-6, as concentrações dos elementos (pré) P, S, Cl, K, Ca, Fe e Zn estão correlacionadas positivamente com a IL-6. Portanto, quanto maior a quantidade de IL-6 maior a concentração dos elementos no plasma. A concentração dos elementos (pós) P, S, Cl, K, Ca, Fe e Zn estão correlacionados negativamente com a IL-6. Portanto, quanto maior a quantidade de IL-6 menor a concentração dos elementos no plasma.

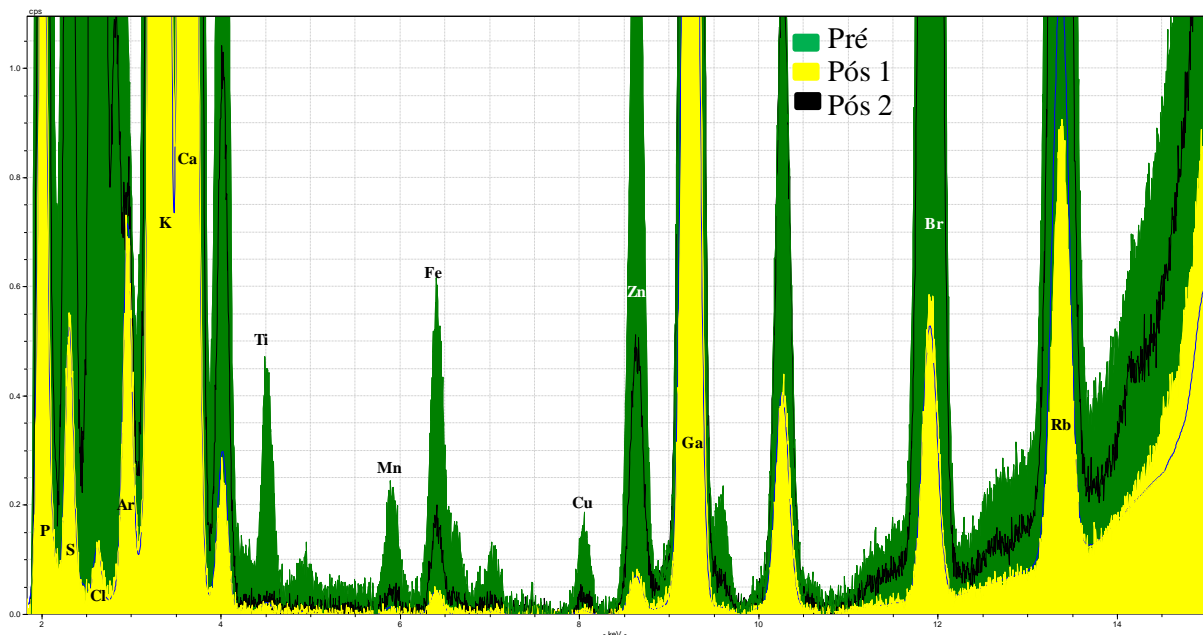
**Tabela 7.6** - Correlação dos elementos identificados com a distância total percorrida pelos atletas e mediadores inflamatórios para atletas de futsal, (pré) significa antes da simulação do jogo e (pós) após a simulação do jogo.

		Distância total		TNF -alfa <sup>#</sup>		IL-6 <sup>#</sup>	
		r	P	r	P	r	P
<b>Fósforo</b>	Pré	-0,15	0,72	0,40	0,32	0,54	0,17
	Pós	0,39	0,33	-0,88	0,007*	-0,61	0,11
<b>Enxofre</b>	Pré	-0,33	0,41	0,66	0,06	0,88	0,007*
	Pós	0,27	0,51	0,76	0,03*	-0,28	0,50
<b>Cloro</b>	Pré	0,60	0,10	0,30	0,46	0,19	0,66
	Pós	0,37	0,35	-0,85	0,01*	-0,80	0,02*
<b>Potássio</b>	Pré	0,06	0,85	0,47	0,24	0,57	0,15
	Pós	0,55	0,15	-0,85	0,01*	-0,61	0,11
<b>Cálcio</b>	Pré	-0,80	0,01*	0,21	0,61	0,59	0,13
	Pós	0,40	0,32	-0,64	0,69	-0,09	0,84
<b>Ferro</b>	Pré	0,19	0,64	-0,83	0,01*	-0,50	0,21
	Pós	0,54	0,16	-0,66	0,08	-0,40	0,32
<b>Zinco</b>	Pré	-0,11	0,79	0,47	0,24	-0,50	0,21
	Pós	0,54	0,16	-0,26	0,56	-0,40	0,32

<sup>#</sup> Coeficiente de correlação de Spearman

## 7.5 AMOSTRAS DE SALIVA DOS ATLETAS DE JIU JITSU

A taxa do fluxo salivar foi analisada para verificar se houve um aumento ou diminuição do mesmo após o exercício físico. Essa taxa foi encontrada através do volume de saliva expectorada por um tempo de 2 minutos ( $P < 0,05$ ,  $F = 6,27$ , ANOVA amostras repetidas). A taxa diminuiu a partir de  $1,2 \pm 0,6$  ml/min (pré) para  $0,7 \pm 0,3$  ml/min (pós 1) e aumentou novamente para  $0,9 \pm 0,3$  ml/min (pós 2). Foram encontrados os seguintes elementos em todas as amostras analisadas de saliva dos 12 atletas de jiu jitsu: P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, Br e Rb. As amostras foram coletadas em três etapas: (pré) atletas em jejum, (pós 1) após 4 semanas de treino e (pós 2) após 8 semanas de treino. As concentrações elementares das triplicatas de saliva (pré, pós 1 e pós 2) de cada atleta, realizadas durante as medidas podem ser vistas no Apêndice A1. A Figura 7.7 mostra um exemplo dos espectros de TXRF para as amostras de saliva (pré, pós 1 e pós 2), respectivamente.



**Figura 7.7 – Exemplo de espectros das amostras de saliva (pré, pós 1 e pós 2) dos atletas de jiu jitsu.**

Fonte: Elaborada pela autora

A distribuição dos dados foi analisada com a prova de Shapiro-Wilk como apresentada na tabela 7.7, nas variáveis que atenderam ao critério de normalidade. Dentre os conjuntos de dados analisados em nível de significância de 0,05 e intervalo de confiança de 95% os elementos S, Cl, Ca, Fe e Zn para as amostras (pré), todos os elementos menos o Ti, Cu e Br das amostras (pós 1) e os elementos P, Cl, Ca, Ti e Zn não passaram no teste de normalidade. Empregou-se teste de Mauchly para se testar a esfericidade dos dados. A análise de variância de um caminho (ANOVA) com medidas repetidas foi conduzida para se testar os diferentes momentos de avaliação. Identificando-se significância na ANOVA, considerou-se o teste de Bonferroni para localização das diferenças. A Figura 7.8 apresenta os resultados do p-valor encontrado pela ANOVA. Os elementos que obtiveram diferenças significativas foram: S, K, Br e Rb. Foram avaliadas também as diferenças significativas das comparações (pré e pós), O S obteve diferença com (pré – pós) com p-valor de 0,002 e diferença de (pós 1 – pós 2) com p-valor de <0,0001. O Br possuiu diferenças entre (pré – pós 1) com p-valor de 0,01.

**Tabela 7.7** – Teste de normalidade para o conjunto de dados das amostras de saliva dos atletas de jiu jitsu, (pré) significa em jejum, (pós 1) após 4 semanas de treino e (pós 2) após 8 semanas de treino. P-valor é a probabilidade de significância, W teste de normalidade de Shapiro-Wilk e CV coeficiente de variação dado em porcentagem.

	Pré ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) <sup>+</sup>	P-valor	W	CV %	Pós 1 ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) <sup>+</sup>	P-valor	W	CV %	Pós 2 ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) <sup>+</sup>	P-valor	W	CV %
<b>P</b>	106,2 ± 3,17	0,15	0,89	56,83	73,5 ± 3,04	0,004 <sup>*</sup>	0,76	52,46	74,30 ± 2,98	0,005 <sup>**</sup>	0,78	52,73
<b>S</b>	18,8 ± 0,84	< 0,0001 <sup>****</sup>	0,68	96,99	11,2 ± 0,88	0,001 <sup>*</sup>	0,72	64,21	13,5 ± 1,13	0,15	0,89	54,96
<b>Cl</b>	104 ± 4	0,02 <sup>*</sup>	0,82	120,08	30,5 ± 1,15	< 0,0001 <sup>****</sup>	0,35	304,28	44,5 ± 1,57	< 0,0001 <sup>****</sup>	0,68	169,51
<b>K</b>	464,4 ± 29,55	0,82	0,96	47,28	293,9 ± 13,38	0,002 <sup>*</sup>	0,73	34,73	290,8 ± 15,13	0,24	0,91	51,10
<b>Ca</b>	18,3 ± 0,42	0,04 <sup>*</sup>	0,85	62,59	16,3 ± 0,43	< 0,0001 <sup>****</sup>	0,49	107,62	19,6 ± 0,36	0,02 <sup>*</sup>	0,74	85,86
<b>Ti</b>	0,24 ± 0,03	0,18	0,83	191,44	0,13 ± 0,02	0,32	0,87	201,57	0,15 ± 0,05	0,006 <sup>**</sup>	0,61	180,91
<b>Mn</b>	0,18 ± 0,01	0,13	0,87	113,62	0,05 ± 0,002	0,008 <sup>**</sup>	0,79	272,60	0,10 ± 0,005	0,07	0,87	159,54
<b>Fe</b>	0,2 ± 0,03	0,04 <sup>*</sup>	0,86	102,42	0,05 ± 0,01	0,008 <sup>**</sup>	0,79	97,52	0,09 ± 0,02	0,07	0,87	93,96
<b>Cu</b>	0,027 ± 0,002	0,09	0,86	95,35	0,017 ± 0,01	0,32	0,88	209,24	0,11 ± 0,003	0,98	0,99	149,58
<b>Zn</b>	0,14 ± 0,002	0,004 <sup>*</sup>	0,77	93,26	0,16 ± 0,004	< 0,0001 <sup>****</sup>	0,42	197,26	0,11 ± 0,01	0,02 <sup>*</sup>	0,74	82,88
<b>Br</b>	1,56 ± 0,10	0,98	0,98	31,49	0,7 ± 0,05	0,24	0,91	28,95	1,1 ± 0,08	0,65	0,95	66,70
<b>Rb</b>	0,8 ± 0,05	0,41	0,93	50,59	0,54 ± 0,02	< 0,0001 <sup>****</sup>	0,56	66,62	0,5 ± 0,02	0,34	0,92	60,70

<sup>+</sup>Média ± desvio-padrão.

\*Elementos que não passaram no teste de normalidade.

A Figura 7.8 mostra a comparação da média nas três etapas. Podemos verificar que a maioria dos elementos tinham uma maior concentração na etapa (pré) depois uma diminuição na etapa (pós 1) e um aumento novamente na etapa (pós 2). Os elementos que não obtiveram esse mesmo comportamento foram: K, Mn, Cu e Rb, esses elementos possuíam uma concentração maior na etapa (pré) e uma diminuição nas etapas (pós 1 e pós 2), a concentração do Zn aumentou para a etapa (pós 1) e diminuiu para a etapa (pós 2).

A constatação do presente estudo demonstrou que as concentrações de elementos em amostras de saliva podem ser alteradas através do treinamento de cargas no Jiu-Jitsu. Permitindo a utilização do TXRF para detectar essas alterações e a quantificação das variações nas concentrações de elementos nas amostras de saliva, sugerindo que é um método adequado para o monitoramento do equilíbrio eletrolítico salivar em atletas de Jiu-Jitsu.

A técnica TXRF demonstrou que as concentrações de amostras de saliva de alguns minerais essenciais (Cl e K) e elementos traços (Mn, Cu, Br, Rb) foram significativamente reduzidos após um período intenso de treinamento.

A concentração de P diminuiu após um intenso período de treinamento. Os níveis salivares de P em pacientes de controle apresentam uma concentração média variando de  $(214 \pm 19,5)$  para  $(234 \pm 101,4 \text{ mg/ml})$  (Rehak, Cecco, & Csako, 2000; Tobey & Anslyn, 2003) foram maiores do que o observado no pré  $(102 \pm 48 \text{ mg/ml})$ .

Compostos que contêm enxofre, como antioxidantes e aminoácidos de enxofre, estão envolvidos no metabolismo aeróbio, perfil lipídico, condição antioxidante e resistência à fadiga muscular (Elshorbagy et al., 2012; Ferreira, Campbell, & Reid, 2011; Speich et al., 2001). O estudo com TXRF demonstrou níveis concentração da saliva total de  $(1535 \pm 230 \text{ } \mu\text{g/g})$  (Poles et al., 2016). Um estudo em ratos demonstrou que uma sessão de natação única diminuiu os níveis plasmáticos de S, sugerindo que o exercício poderia modular seus níveis circulantes (Bicer et al., 2011). No entanto, não está claro se o S também é modulado por exercício em seres humanos. No presente estudo, não se observou nenhuma diferença estatística no S em períodos diferentes de treinamento; no entanto, o tamanho do efeito e correlação sugere que níveis salivares de S diminuem após treinamento intensivo. Embora os níveis de S podem ser detectados em altas concentrações na saliva, pode não ser um biomarcador adequado para monitorar a

condição de treinamento utilizando amostras de saliva. Além disso, o aumento dos níveis de compostos de enxofre voláteis é produzido por bactérias anaeróbias, associadas com doença periodontal e a halitose (Krespi, Shrimel, & Kacker, 2006; Mokeem, em 2014). Por exemplo, enxofre pode estar presente na cavidade oral, devido à produção de bactérias locais em vez de secreção pelas glândulas salivares.

Cl e K apresentaram uma correlação positiva moderada em amostras de saliva (Rehak et al., 2000). No presente estudo, foi encontrada uma alteração considerada do pré para pós 1. Cloro é secretado pelas glândulas salivares sob estimulação do sistema nervoso parassimpático (Melvin, 1999; Proctor, 2016). Conforme descrito anteriormente, a intensa carga de treinamento foi destacado por aumento da ativação simpática e parassimpática (Fortes et al, 2017; Proctor & Carpenter, 2007; Yoshino et al., 2009), que talvez foram responsáveis para reduzir a taxa de fluxo salivar e dos níveis de Cl e K na saliva durante o período de treinamento intenso.

Cálcio não foi significativamente alterado pelo treinamento. Exercício agudo diminuiu o nível de cálcio e um período longo de treinamento os níveis de Ca circulante nos pugilistas amadores aumentaram (Karakukcu et al., 2013). Outros estudos não relataram nenhuma mudança no nível de cálcio após uma semana de intenso treinamento em atletas de basquetebol (Wang et al., 2012). Além disso, o aumento dos níveis de Ca salivar pode estar associado a fatores locais, tais como a presença de cálculo dental e tabagismo (Vieira, Hegde, Kashyap, & Marques, 2015). Os resultados do presente estudo sugerem que níveis salivares de Ca não foram alterados por cargas de treinamento. O uso de Ca para monitorar a condição e o equilíbrio eletrolítico salivar deve ser considerado com cautela devido à presença de fatores locais e baixa sensibilidade para cargas de treinamento.

Manganês foi detectada em baixas concentrações nas amostras de saliva ( $3,9 \pm 0,3$  mg/l), mas sua concentração não foi influenciado pelos níveis séricos ou ingestão de Mn (Nabatov et al, 2017; Ntihakose, Surette, Foucher, Clarisse, & Bouchard, 2018). Os níveis salivares de Mn foram significativamente reduzidos após o período de treinamento intensificado; no entanto, íons de Mn não foram detectados em todos os atletas. No presente estudo, o baixo nível de Mn presente nas amostras analisadas sugere que não é um marcador confiável para monitorar o treinamento por TXRF.

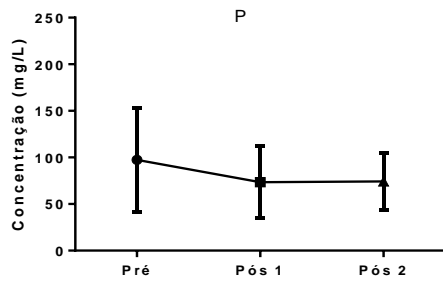
Deficiência de ferro é uma característica comum em atletas treinados, especialmente no treinamento aeróbio (Coates, Mountjoy, & Burr, 2017). Um estudo de corredoras de longa distância durante um período de treino de baixa intensidade e após um período de alta intensidade de cargas não demonstrou nenhuma alteração significativa nos níveis séricos de ferro (Ishibashi et al., 2017). Estes resultados sugerem que os níveis de Fe são influenciados por equilíbrio energético e nutrição em vez de carga de treinamento intenso. No presente estudo o Fe teve uma variação grande de pré para pós 1, porém não atingiu significância estatística devido à variabilidade entre os atletas.

Zn também está associada com níveis de antioxidantes em atletas e pode ser alterado pela intensidade do exercício, metabolismo energético e estado nutricional (Speich et al., 2001; Zhao et al., 2015). Um estudo em jogadores de basquete demonstrou que uma única sessão de exercício de alta intensidade pode diminuir níveis séricos de Zn (Zhao et al., 2015). A concentração de Zn salivar mediana relatada na literatura é de 0,03 (0,002-0,037)  $\mu\text{g/ml}$  (Norris et al., 2018) e estavam perto de valores observados em atletas de Jiu-Jitsu ( $0,013 \pm 0,011 \mu\text{g/ml}$ ). Embora o Zn é um microelemento importante na regulação dos processos biológicos relacionados com anti-inflamatório e metabolismo de energia, seus valores não foram alterado em pontos diferentes de tempo e não se correlacionam com os atletas de Jiu-Jitsu. Os resultados sugerem que Zn poderia não ser eficientemente controlada por amostragem de saliva.

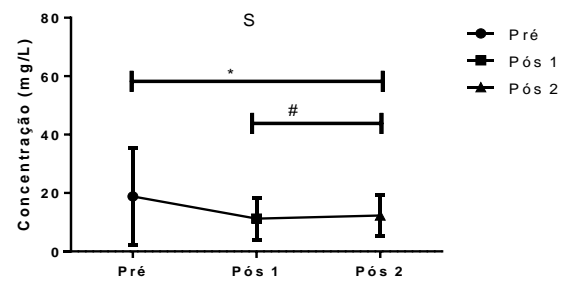
Um elemento importante, com efeito, anti-oxidantes e anti-inflamatórios é Cu (Speich et al., 2001). No presente estudo, baixos níveis de Cu foram observados em atletas de Jiu-Jitsu após 4 semanas de intenso treinamento (pré) e durante o pós 1, sugerindo que cargas de treinamento influenciaram na secreção salivar do Cu. No entanto, o Cu não foi detectado em todas as amostras de saliva. No presente estudo, foi tomado cuidado para não incluir indivíduos com cárie ativa, desde que os níveis salivares de Cu podem ser aumentados em pacientes com cárie ativa (Watanabe, Tanaka, Shigemi, Hayashida, & Maki, 2009).

O Br também apresentada diminuição níveis na saliva após intenso treinamento. Observou-se que os níveis salivares de Br aumentaram proporcionalmente à concentração de soro (Olmez et al., 1988), sugerindo que a saliva pode ser usado para monitorar o Br.

Os níveis de Rb também são afetados pelo treino e não retornaram aos níveis basais no pós 2. O Rb pode ser um marcador biológico interessante para acompanhamento de atletas de Jiu-Jitsu, um esporte com alta demanda por sistemas anaeróbios.



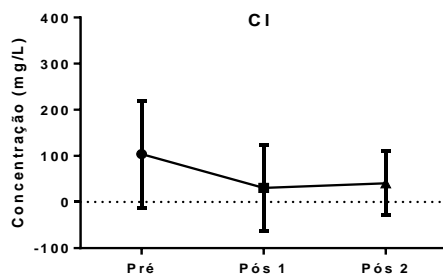
P-valor = 0,10



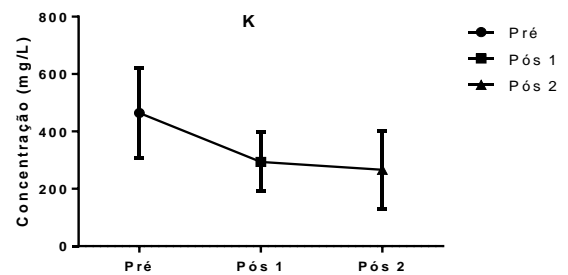
P-valor < 0,0001

\* P-valor = 0,002

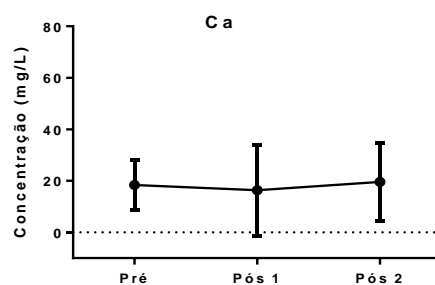
# P-valor < 0,0001



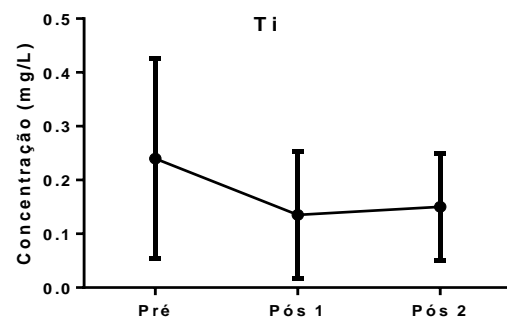
P-valor = 0,30



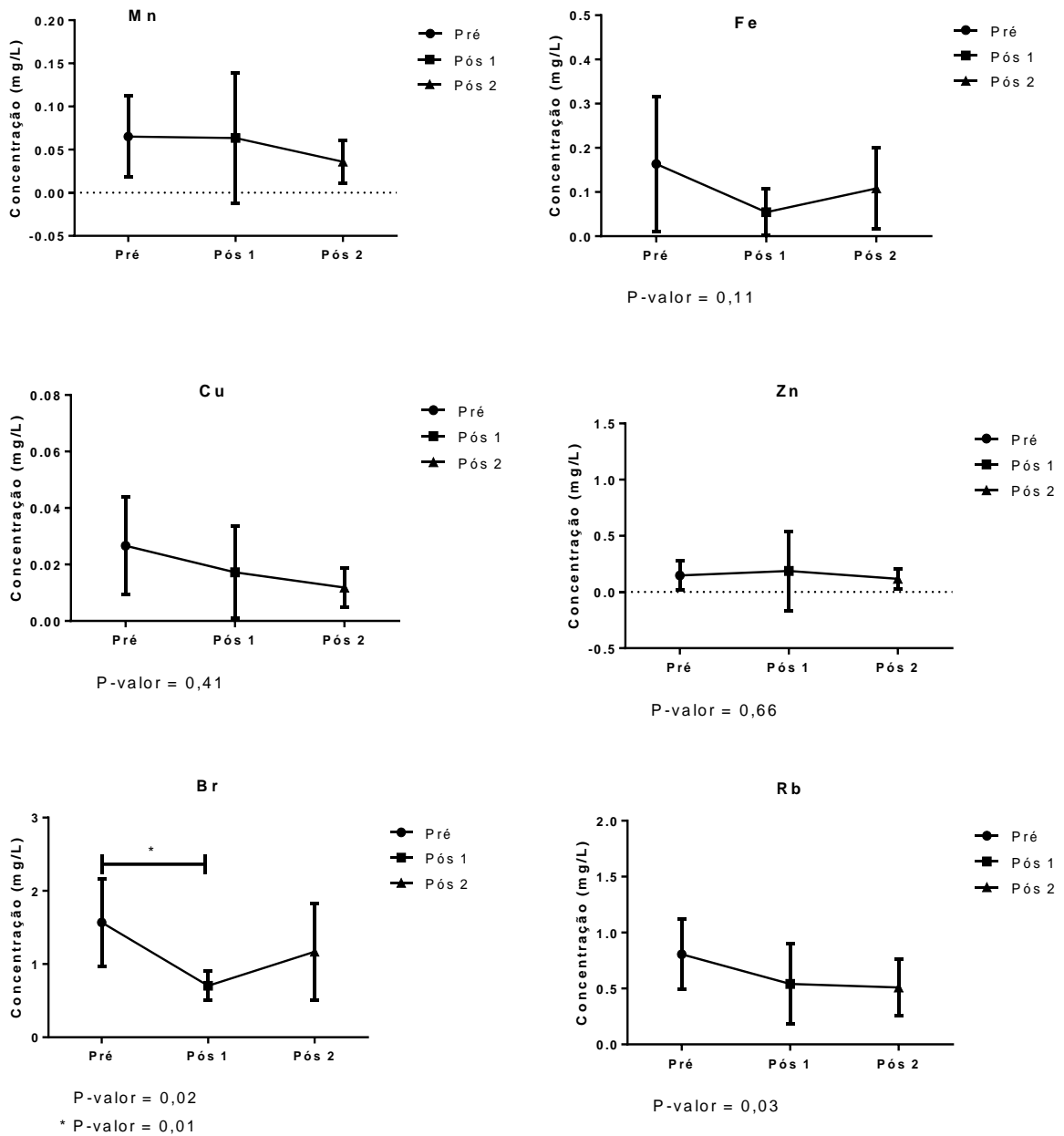
P-valor = 0,01



P-valor = 0,94







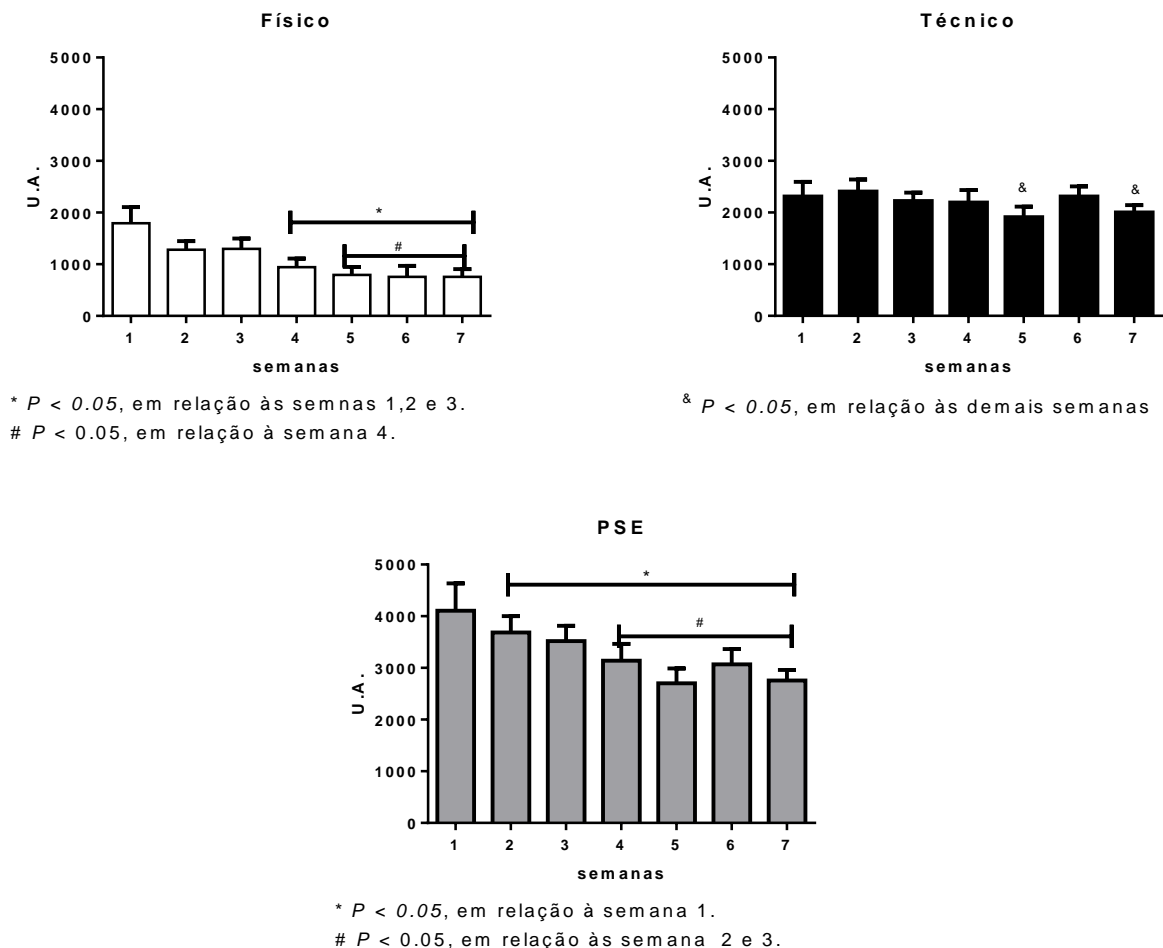
**Figura 7.8** – Gráfico referente à comparação das médias das concentrações junto com o desvio padrão das amostras de saliva (pré, pós 1 e pós 2) dos atletas de jiu jitsu.

**Fonte:** Elaborada pela autora

### 7.5.1 PSE- PERCEPÇÃO SUBJETIVA DE ESFORÇO

Foi realizada também a análise da PSE (Percepção Subjetiva de Esforço). PSE é uma ferramenta adicional utilizada para monitorar a resposta perceptiva ao treinamento, sendo estabelecida como um método para determinação

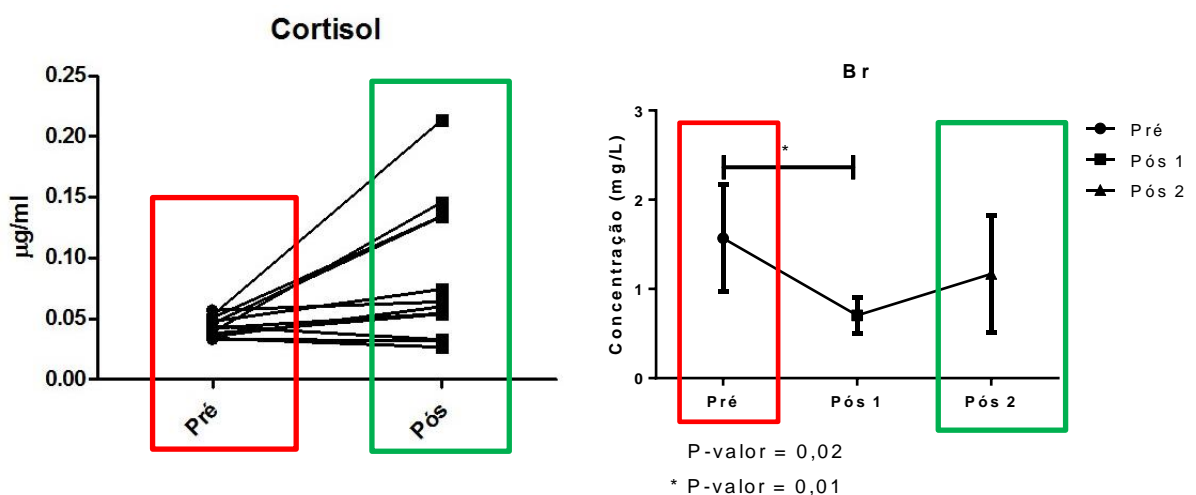
do esforço durante o exercício. Para quantificação da carga de treino por meio do método PSE foi calculado o produto entre a duração de treinamento acumulado em minutos e o valor apontado na escala de Borg de 1 a 10 o quanto de esforço foi realizado durante o exercício (FOSTER et al., 1995). Com o somatório do PSE do treino físico e técnico, como apresenta a Figura 7.9, foi calculado o PSE total. Por meio do PSE, foi verificado que a concentração de alguns elementos vistos na Figura 7.9 decai a partir do momento em que há uma intensificação de carga (nas primeiras 3 semanas) e aumenta a partir do momento em que há uma diminuição de carga (após a 4 semana).



**Figura 7.9** – PSE do treinamento físico e técnico dos atletas de jiu jitsu.

Além do PSE pudemos comparar o comportamento dos resultados das comparações das médias das concentrações dos atletas de jiu jitsu vistas na

Figura 7.8 com a concentração de cortisol. O cortisol é um hormônio produzido pelas glândulas suprarrenais, que estão localizadas acima dos rins. Ajuda o organismo a controlar o estresse, reduzir inflamações, contribuir para o funcionamento do sistema imune e manter os níveis de açúcar no sangue constante. A Figura 7.10 apresenta a concentração de cortisol dos atletas comparada com a concentração do elemento Br. Pode-se verificar que a concentração de cortisol apresentada no momento pré e pós corroboram com a análise realizada das concentrações dos elementos, pois como exemplo, podemos verificar a comparação do cortisol com o Br. Na etapa pós 2, podemos verificar que a quantidade de cortisol dos atletas não estão todas agrupadas, isso deve-se ao fato que alguns atletas não estavam totalmente recuperados após a diminuição da carga no período de tempo de 3 semanas. Podemos verificar o mesmo fato ocorrido na concentração de Br, após a diminuição da carga a concentração do Br não estava totalmente recuperada. Embora, a concentração pós 2 esteja maior que a concentração na etapa pós 1, podemos, claramente verificar que os atletas não estavam totalmente recuperados quando comparados com o cortisol. O cortisol foi dosado em saliva utilizando kit comercial SALIMETRICS (STATE COLLEGE, USA), conforme as recomendações do fabricante.



**Figura 7.10** – Concentração de cortisol comparada com o elemento Br dos atletas de jiu jitsu.

## CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a técnica TXRF é um método muito promissor para analisar elementos em amostras de saliva e plasma, e que a metodologia de coleta, preparo e análise mostrou-se adequada para o objetivo proposto neste trabalho, que é a comparação dos resultados obtidos das amostras de saliva e plasma de atletas de futsal e jiu jitsu com a análise por TXRF. O interesse de se estudar a saliva através dessa técnica é de poder encontrar algum tipo de correlação entre os elementos químicos determinados na saliva e no plasma com algum distúrbio físico ou biológico, ou mesmo de deficiência de minerais no organismo e até uma contaminação com algum metal nocivo ao organismo. A TXRF é uma técnica de alta sensibilidade que permite a determinação multielementar em uma única medida utilizando uma pequena quantidade de material.

O padrão certificado de água foi de extrema importância para esse trabalho. A partir das análises das concentrações certificadas pudemos comparar as concentrações deste trabalho com as concentrações dos padrões. Pudemos verificar que as recuperações foram satisfatórias.

As análises quantitativas mostraram ser de grande importância neste tipo de estudo, pois revela com rapidez em uma análise preliminar a presença ou ausência de elementos chaves na caracterização química elementar das amostras. Os elementos químicos identificados nas amostras dos indivíduos em estudo foram o P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Rb, Hg e Pb. Nem todos esses elementos foram identificados em todas as amostras.

Foi observado que o elemento K nas amostras de saliva obteve uma maior concentração em relação às amostras de sangue. Nas amostras de sangue foi observado o Cl como sendo o elemento de maior concentração. Foi verificada tendência de correlação moderada positiva para o elemento P de saliva e sangue (pré) e tendência de correlação moderada negativa para o elemento Cl. Tendências de correlações forte positiva de saliva e sangue (pós) foram verificadas também para os elementos Br e Zn. A correlação foi significativa ao nível de 0,05 para todos os elementos menos para o Zn que foi de 0,01.

Foram obtidas várias correlações moderadas e boas com os medidores inflamatórios, tanto (pré) quanto (pós).

Concluímos que TXRF pode ser usado para monitorar níveis salivares (P, S, Cl, K, Ca, Fe, Zn, Br e Rb) e circulantes (S, Cl, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb) de vários elementos em atletas de futsal. No entanto, um esforço físico simulando uma partida oficial de futsal não alterou a concentração salivar e plasmática dos elementos. Estudo investigando a composição iônica da saliva em atletas de futsal deve levar em consideração o fluxo de saliva, uma vez que as taxas de secreção de P, K, Cu, Br e Rb na saliva foram negativamente moduladas pelos esforços físicos do futsal.

As concentrações dos elementos nas amostras de jiu jitsu P, S, Cl, Ti, Fe e Br apresentaram uma diminuição no momento (pós 1), esse fato pode estar relacionado a alta intensidade de esforço físico realizado no período de 4 semanas. Após há quarta semana a intensidade do treinamento foi diminuída, devido a esse fato foi verificado um aumento nas concentrações no momento (pós 2).

Comparando o PSE com as médias das concentrações dos atletas de jiu jitsu, conclui-se que, a partir de um treino intenso de carga as concentrações dos elementos nas 3 primeiras semanas decai e aumenta a partir do momento em que há uma diminuição da carga após 4 semanas.

Entretanto, para trabalhar com amostras de plasma é necessário um pouco de cuidados especiais, após um período longo de secagem a amostra não adere ao substrato e quando adere pode causar algumas rachaduras nas amostras, causando assim uma análise errônea. É comum concentrações elementares em materiais biológicos descreverem uma distribuição assimétrica, e mais precisamente uma lognormal, por isso que uma grande maioria dos conjuntos de dados passaram por uma transformação lognormal. Após a transformação vários elementos possuíram uma distribuição normal.

Pode-se verificar que a concentração de cortisol apresentada nos momentos pré e pós corroboram com a análise realizada das concentrações dos elementos do presente estudo, podendo assim verificar que os atletas não estavam totalmente recuperados após a diminuição da carga no período de tempo de 3 semanas.

Portanto, conclui-se que a técnica TXRF é muito promissora para analisar elementos em amostras de saliva e plasma.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J. A.; SÁNCHEZ, H. J.; VALENTINUZZIA, M. C.; GRENÓN, M. S. Analysis Of Metals In Oral Fluids Of Patients With Dental Implants: a TXRF approach. **X-Ray Spectrometry**, v. 43, p. 193-197, 2014.
- ABRAHAM, J. A.; SÁNCHEZ, H. J.; VALENTINUZZIA, M. C.; GRENÓN, M. S. Influence of smoking on the Elemental Composition of Oral Fluids: a TXRF approach. **X-Ray Spectrometry**, v. 39, p. 372-375, 2010.
- ANDREATO, L. V., E. FRANCHINI, et al. (2013). "Physiological and Technical-tactical Analysis in Brazilian Jiu-jitsu Competition." *Asian J Sports Med* 4(2): 137-143.
- ANDREATO, L. V., U. F. JULIO, et al. (2015). "Brazilian Jiu-Jitsu Simulated Competition Part II: Physical Performance, Time-Motion, Technical-Tactical Analyses, and Perceptual Responses." *J Strength Cond Res* 29(7): 2015-2025.
- ANDREATO, L. V., U. F. JULIO, et al. (2015). "Brazilian Jiu-Jitsu Simulated Competition Part I: Metabolic, Hormonal, Cellular Damage, and Heart Rate Responses." *J Strength Cond Res* 29(9): 2538-2549.
- ANGELI A, MINETTO M, DOVIO A, PACCOTTI P. The Overtraining Syndrome In Athletes: A Stress-Related Disorder. **J Endocrinol Invest**. 2004;27:603-12.
- APPOLONI, C. R. Interação da Radiação Eletromagnética com a Matéria. **Texto Experimental para a Disciplina de Física Nuclear** – Universidade Estadual de Londrina PR, 2007.
- ARAÚJO, L. DE A.; FREITAS DA SILVA, GEIRLA JANE; OLIVEIRA MAGALHÃES, MARYANE; MACHADO MAIA, FERNANDA MARIA; LIMA DE MORAES, MILENA; JOSÉ DOS ANJOS, MARCELINO; CORDEIRO GURGEL, DANIEL. Ferro, Zinco e Cobre Séricos e Estado Nutricional De Pacientes Com Neoplasia Mamária. *Nutr. clín. diet. hosp.* 2016; 36(2):132-139
- ATANASOVSKA, T., Petersen, A.C., Rouffet, D.M., Billaut, F., Ng, I., McKenna, M.J., 2014. Plasma K<sup>+</sup> dynamics and implications during and following intense rowing exercise. *J. Appl. Physiol.* 117, 60–68.
- BADENHORST, C.E., Dawson, B., Cox, G.R., Laarakkers, C.M., Swinkels, D.W., Peeling, P., 2015. Acute dietary carbohydrate manipulation and the subsequent inflammatory and hepcidin responses to exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 115, 2521–2530.
- BICER, M., Akil, M., Sivrikaya, A., Kara, E., Baltaci, A. K., & Mogulkoc, R. (2011). Effect of zinc supplementation on the distribution of various elements in the serum of diabetic rats subjected to an acute swimming exercise. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 67(4), 511–517.
- BLOCKER SAFE. 2010. Disponível em: <<http://useblocker.blogspot.com.br>>. Acesso em: 10 de out. de 2012.

BOX GEP, HUNTER WG E HUNTER JS. Statistics for Experimenters - An Introduction to design, data analysis, and model building, New York, John Wiley & Sons, 1978.

BUSSAB, W. O, MORETTIN, PEDRO A. Estatística Básica. 3ª ed. São Paulo, Atual, 1986.

CALLE, I. De La, N. Cabaleiro, V. Romero, I. Lavilla, C. Bendicho. Sample Pretreatment Strategies for Total Reflection X-ray Fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B* 90 (2013) 23–54.

CASIMIRO-LOPES, G., de Oliveira-Junior, A.V., Portella, E.S., Lisboa, P.C., Donangelo, C.M., de Moura, E.G., Koury, J.C., 2009. Plasma leptin, plasma zinc, and plasma copper are associated in elite female and male judo athletes. *Biol. Trace Elem. Res.* 127, 109–115.

CESAREO, R.; X-Ray Physics: Interaction With Matter, Production, Detection, *Rivista del Nuovo Cimento*, Vol. 23, No 7, 2000.

CINAR, V., Mogulkoc, R., Baltaci, A.K., Nizamlioglu, M., 2007. Effect of magnesium supplementation on some plasma elements in athletes at rest and exhaustion. *Biol. Trace Elem. Res.* 119, 97–102.

COATES, A., Mountjoy, M., Burr, J., 2017. Incidence of iron deficiency and iron deficient anemia in elite runners and triathletes. *Clin. J. Sport Med.* 27, 493–498.

CONOVER, W.J., *Practical Nonparametric Statistics*, 2ª ed., New York: Wiley (1980).

CLARKE, A.C., Anson, J.M., Dziedzic, C.E., Mcdonald, W.A., Pyne, D.B., 2017. Iron monitoring of male and female rugby sevens players over an international season. *J. Sports Med. Phys. Fitness*.

CHICHARRO JL, LEGIDO JC, ALVAREZ J, *et al.* Saliva Electrolytes As A Useful Tool For Anaerobic Threshold Determination. ***Eur J Appl Physiol.***1994;68:1495-7.

CLETO, D.A.M., ANDRELLO, A. C., NETTO, Í. J. V. AND APPOLONI, C. R. **Analysis Of Saliva And Gingival Crevice Fluid By Total Reflection X-Ray Fluorescence (TXRF). *X-Ray Spectrometry***, v. 45, p. 220-224, 2016.

CLETO, D.A.M. Análise De Saliva E Do Fluido Sulco Gengival Pelo Método De Fluorescência De Raios X Por Reflexão Total. Dissertação (Mestrado em Física). Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2013.

CURIE, L. A.; Limits for Quantitative Detection and Quantitative Determination. ***Analytical Chemistry***, v.40, p.586-593, 1968.

DA SILVA, B. V., B. N. IDE, *et al.* (2014). "Neuromuscular Responses To Simulated Brazilian Jiu-Jitsu Fights." *J Hum Kinet* 44: 249-257.

DÖKER, S., Hazar, M., Uslu, M., Okan, İ., Kafkas, E., Boşgelmez, İ.İ., 2014. Influence of training frequency on serum concentrations of some essential trace elements and electrolytes in male swimmers. *Biol. Trace Elem. Res.* 158, 15–21.

DUERR, M.A., Palladino, E.N.D., Hartman, C.L., Lambert, J.A., Franke, J.D., Albert, C.J., Matalon, S., Patel, R.P., Slungaard, A., Ford, D.A., 2018. Bromofatty aldehyde derived from bromine exposure and myeloperoxidase and eosinophil peroxidase modify glutathione and protein. *J. Lipid Res.* jlr.M083279.

DA NOBREGA. AC. The Subacute Effects Of Exercise: Concept, Characteristics, And Clinical Implications. **Exerc Sport Sci Rev.** 2005;33:84-7.

EISBERG, R.; RESNICK, R. **Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas.** 18ª Tiragem, Editora Campus, 1979, 67 e 428 p.

ELSHORBAGY, A.K., Valdivia-Garcia, M., Graham, I.M., Palma Reis, R., Sales Luis, A., Smith, A.D., Refsum, H., 2012. The association of fasting plasma sulfur-containing compounds with BMI, serum lipids and apolipoproteins. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 22, 1031–1038.

FERREIRA, L.F., Campbell, K.S., Reid, M.B., 2011. Effectiveness of sulfur-containing antioxidants in delaying skeletal muscle fatigue. *Med. Sci. Sports Exerc.* 43, 1025–1031.

FORTES, L. S., da Costa, B. D., Paes, P. P., do Nascimento Júnior, J. R., Fiorese, L., & Ferreira, M. E. (2017). Influence of competitive-anxiety on heart rate variability in swimmers. *Journal of Sports Science & Medicine*, 16(4), 498–504.

FRIDEN J, LIEBER RL. Segmental Muscle Fiber Lesions After Repetitive Eccentric Contractions. *Cell Tissue Res* 1998;293(1):165-71.

GAMA, E. M., CLÉSIA C. NASCENTESA. ROBERTA P.MATOSA. GABRIELLE DE C.RODRIGUESA. .GUILHERME D.RODRIGUESA. A simple method for the multi-elemental analysis of beer using total reflection X-ray fluorescence. *TALANTA*, v. 174, p. 274-278, 2017.

GIL, F., Hernández, A.F., Márquez, C., Femia, P., Olmedo, P., López-Guarnido, O., Pla, A., 2011. Biomonitorization of cadmium, chromium, manganese, nickel and lead in whole blood, urine, axillary hair and saliva in an occupationally exposed population. *Sci. Total Environ.* 409, 1172–1180.

GOODMAN, C.A., Bennie, J.A., Leikis, M.J., McKenna, M.J., 2014. Unaccustomed eccentric contractions impair plasma K<sup>+</sup> regulation in the absence of changes in muscle Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase content. *PLoS ONE* 9, e101039.

GLEESON M. Immune Function In Sport And Exercise. **J Appl Physiol.** 2007;103: 693-9.

GmbH, B. N. **Manual: TXRF Spectrometer for Element Analysis. S2 PICOFOX**, p. 25, 46, 76 2011.



GRIESEL, S.; MUNDRY, R.; KAKUSCHKE, A.; FONFARA, S.; SIEBERT, U.; PRANGE, A. Mineral Elements and Essential Trace Elements in Blood of Seals of the North Sea Measured by Total Reflection X-ray Fluorescence Analysis. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, p. 1158–1165, 2006.

GRIEKEN, R. V.; MARKOWICZ, A. Handbook of X Ray Spectrometry. New York: M. Dekker. 2002.

GRÖSCHL M. Current Status Of Salivary Hormone Analysis. **Clin Chem**. 2008;54(11):1759-69.

ISHIBASHI, A., Maeda, N., Sumi, D., Goto, K., 2017. Elevated serum hepcidin levels during an intensified training period in well-trained female long-distance runners. *Nutrients* 9, 277.

ITO, T., Yoshikawa, N., Schaffer, S.W., Azuma, J., 2014. Tissue taurine depletion alters metabolic response to exercise and reduces running capacity in mice. *J. Amino Acids* 2014, 1–10.

LACHANCE, G. R.; CLAISSE, F. Quantitative X- Ray Fluorescence Analysis: Theory and Application. 1<sup>nd</sup> Edition. John Wiley & Sons, Inc., 1995, 492 p.

KAUFMAN, E.; LAMSTER, I. B. Analysis of Saliva for Periodontal Diagnosis – a review. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 7, p. 453-465, 2000.

KAUFMAN E, LAMSTER IB. The Diagnostic Application Of Saliva. **Crit Rev Oral Biol Med**. 2002;13(2):197-202.

KARAKUKCU, C., Polat, Y., Torun, Y., Pac, A., 2013. The effects of acute and regular exercise on calcium, phosphorus and trace elements in young amateur boxers. *Clin. Lab*. 59.

KUBALA-K, A. BRAZIEWICZ, J., PAJEK, M. Total Reflection X-Ray Fluorescence Studies of Trace Elements in Biomedical Samples. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 59, n. 8, p. 1283-1289, 2004.

KLOCKEMKÄMPER, R.; BOHLEN, A. Elemental Analysis of Enviromental Samples by Total Reflection Fluorescent. **X-Ray Spectrometry**, v. 25, p. 156-162, 1996.

KRAVETZ, R. E. X-Ray Tube. **Elsevier Science**, v. 96, n. 4, p. 53–57, 2001.

KRESPI, Y.P., Shrime, M.G., Kacker, A., 2006. The relationship between oral malodor and volatile sulfur compound–producing bacteria. *Otolaryngol.-Head Neck Surg*. 135, 671–676.

KNOLL, G. F. Radiation Detection and Measurements. 3<sup>nd</sup>. Edition. Nova York: John Wiley & Sons, 1999.

LARSON. R., FARBER. B. Estatística Aplicada. 4<sup>o</sup> ed. São Paulo, Pearson, p. 394-408, 2010

LIMA, F. O. de; RAMALHO, M. J. P.; RUMMLER, M. do C. O. e RODRIGUEZ, T. T. Hipotireoidismo Altera Secreção e Composição Salivar em Ratos Sépticos. **Odonto Ciência**, v. 23, n. 1, p. 53–57, 2008.

MARTINEZ-ESPINOSA, M., Calil Junior, C., Lahr, F.A.R., *Scientia Forestalis*, **66**, 76-83 (2004).

MAYNAR, M., Llerena, F., Grijota, F.J., Alves, J., Robles, M.C., Bartolomé, I., Muñoz, D., 2017. Serum concentration of several trace metals and physical training. *J. Int. Soc. Sports*

MELVIN, J. E. (1999). Chloride channels and salivary gland function. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 10(2), 199–209

MOKEEM, S. A. (2014). Halitosis: a review of the etiologic factors and association with systemic conditions and its management. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 15(6), 806–811.

MÖLLER, P.; PERRIER, M.; OZSAHIN, M.; MONNIER, P. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 97, n. 02, p. 173–189, 2004.

MYERS, JEROME L.; WELL, ARNOLD D.; JR, ROBERT F. Lorch (11 de janeiro de 2013). *Research Design and Statistical Analysis*:

MOUGIOS M. Reference Intervals For Serum Creatine Kinase In Athletes. *Br J Sports Med* 2007;41(10):674-8.

MCCALL, A.S., Cummings, C.F., Bhave, G., Vanacore, R., Page-McCaw, A., Hudson, B.G., 2014. Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture. *Cell* 157, 1380–1392.

NABATOV, A. A., Troegubova, N. A., Gilmutdinov, R. R., Sereda, A. P., Samoilov, A. S., & Rylova, N. V. (2017). Sport- and sample-specific features of trace elements in adolescent female field hockey players and fencers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 43, 33–37.

NASCIMENTO FILHO V. F.; Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF), CENA, Junho, 1999.

NIEMAN DC, HENSON DA, FAGOAGA OR, *et al.* Change In Salivary Iga Following A Competitive Marathon Race. **Int J Sports Med**. 2002; 23:69–75.

NIST – NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY. **Certificate of Analysis Standar Reference Material® 1640**. 2008. Disponível em <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/archive/1640.pdf>. Acesso em: 10 jan.2017.

NIST – NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY. **Certificate of Analysis Standar Reference Material® 1643e**. 2009. Disponível em <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/archive/1643e.pdf>. Acesso em: 10 jan.2017.

NISHIYAMA, S., Tomoeda, S., Ohta, T., Higuchi, A., Matsuda, I., 1988. Differences in basal and postexercise osteocalcin levels in athletic and nonathletic humans. *Calcif. Tissue Int.*

NORRIS, H. L., Friedman, J., Chen, Z., Puri, S., Wilding, G., & Edgerton, M. (2018). Salivary metals, age, and gender correlate with cultivable oral *Candida* carriage levels. *Journal of Oral Microbiology*, 10(1), 1447216.

OLMEZ, I., Gulovali, M.C., Gordon, G.E., Henkin, R.I., 1988. Trace elements in human parotid saliva. *Biol. Trace Elem. Res.* 17, 259–270.

PARREIRA, P. S.; Metodologia de ED-XRF e Aplicações com um Sistema Portátil, Laboratório de Física Nuclear Aplicada – Publicação técnica, 2007. Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR.

PINTO, N. G. V. C. L. S. Mota ; Regina Cely R. Barroso ; Silvana Moreira ; Delson Braz. Avaliação de Multielementos em Amostras de Sangue Humano Usando SR-TXRF. *Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia*, 2010, vol.32, n.3, pp.195-202.

POLES, A.A., Balcão, V.M., Chaud, M.V., Vila, M.M.D.C., Aranha, N., Yoshida, V.M.H., Oliveira, J.M., 2016. Study of the elemental composition of saliva of smokers and nonsmokers by X-ray fluorescence. *Appl. Radiat. Isot.* 118, 221–227.

PRANGE, A.; SCHWENKE, H. Sample Treatment for TXRF: Requirements and Prospects. *Adv. X-Ray Anal.*, v. 32, p. 211, 1989.

PROCTOR, G.B., 2016. The physiology of salivary secretion. *Periodontol.* 2000 70, 11–25.

PROCTOR, G.B., Carpenter, G.H., 2014. Salivary secretion: mechanism and neural regulation, in: Ligtenberg, A.J.M., Veerman, E.C.I. (Eds.), *Monographs in Oral Science*. S. KARGER AG, Basel, pp. 14–29.

PROCTOR, G.B., Carpenter, G.H., 2007. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton. Neurosci.* 133, 3–18.

REHAK, N. N., Cecco, S. A., & Csako, G. (2000). Biochemical composition and electrolyte balance of “unstimulated” whole human saliva. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38(4), 335–343

ROSNER B. *Fundamentals of Biostatistics*, 4<sup>a</sup> ed., New York, Duxbury Press, 1995

RODRIGUES, V.P., Franco, M.M., Marques, C.P.C., de Carvalho, R.C.C., Leite, S.A.M., Pereira, A.L.A., Benatti, B.B., 2016. Salivary levels of calcium, phosphorus, potassium, albumin and correlation with serum biomarkers in hemodialysis patients. *Arch. Oral Biol.* 62, 58–63.

SANTOS, A.C. e Ferreira, D.F., *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, **27**, n.2, 432-437 (2003).

SORIA, M., Anson, M., Escanero, J.F., 2016. Correlation analysis of exercise-induced changes in plasma trace element and hormone levels during incremental exercise in well-trained athletes. *Biol. Trace Elem. Res.* 170, 55–64.

SHEPHARD RJ, SHEK PN. Potential Impact Of Physical Activity And Sport On The Immune System. A brief review. **Br J Sports Med** 1994;28:247-55.

SPEICH, M., Pineau, A., Ballereau, F., 2001. Minerals, trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 312, 1–11.

TARSOLY, G.; ÓVÁRI, M.; ZÁRAY, G. Determination of Fluorine by Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v.65, p. 287–290, 2010.

TOBEY, S.L., Anslyn, E.V., 2003. Determination of inorganic phosphate in serum and saliva using a synthetic receptor. *Org. Lett.* 5, 2029–2031.

THOMPSON D, WILLIAMS C, KINGSLEY M, NICHOLAS CW, LAKOMY HKA, MCARDLE F, et al. Muscle Soreness and Damage Parameters after Prolonged Intermittent Shuttle-Running Following Acute Vitamin C Supplementation D. *Int J Sports Med* 2001;22(1):68-75.

THOMPSON D, NICHOLAS CW, WILLIAMS C. Muscular Soreness Following Prolonged Intermittent High-Intensity Shuttle Running. *J Sports Sci*1999;17(5):387-95.

VAN GRIEKEN, R. E., MARKOWICZ, A. A. **Handbook of X-Ray Spectrometry**. Marcel Dekker Inc., New York & United States of America. 2002.

XIAO, H.; WONG, D. T. W., Method Development for Proteome Stabilization in Human Saliva. **Analytica Chimica Acta**, v. 722, p. 63–69, 2012.

WANG, L., Zhang, J., Wang, J., He, W., & Huang, H. (2012). Effects of high-intensity training and resumed training on macroelement and microelement of elite basketball athletes. *Biological Trace Element Research*, 149(2), 148–154.

WATANABE, K., Tanaka, T., Shigemi, T., Hayashida, Y., & Maki, K. (2009). Mn and Cu concentrations in mixed saliva of elementary school children in relation to sex, age, and dental caries. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23(2), 93–99.

WITHEE, E.D., Tippens, K.M., Dehen, R., Tibbitts, D., Hanes, D., Zwickey, H., 2017. Effects of methylsulfonylmethane (MSM) on exercise-induced oxidative stress, muscle damage, and pain following a half-marathon: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 14.

ZANCHI, D., Viallon, M., Le Goff, C., Millet, G.P., Giardini, G., Croisille, P., Haller, S., 2017. Extreme mountain ultra-marathon leads to acute but transient increase in cerebral water diffusivity and plasma biomarkers levels changes. *Front. Physiol.* 7.

ZHAO, J., Fan, B., Wu, Z., Xu, M., Luo, Y., 2015. Serum zinc is associated with plasma leptin and Cu–Zn SOD in elite male basketball athletes. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 30, 49–53

## APÊNDICE A1- CONCENTRAÇÕES ELEMENTARES NAS SALIVAS DOS ATLETAS

Concentrações elementares de saliva de atletas de futsal antes do jogo (pré) estão apresentadas na tabela A1 e a tabela A2 apresentam as concentrações após o jogo (pós).

**Tabela A.1-** Concentrações elementares de saliva (pré) dos elementos medidos em *mg/L* dos atletas de futsal. Letra A representa os atletas e DP desvio padrão.

A	DP	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Cu	Zn	Br	Rb	Hg	Pb
1		107,59	62,11	200,12	368,56	49,74	0,55	0,12	4,28	0,09	0,77	1,5	0,51	-	-
	±	4,46	4,57	15,67	21,83	0,98	0,02	0,01	0,29	0,01	0,01	0,11	0,02		
2		110,8	32,36	211,25	637,27	33,82	0,31	0,116	4,47	0,06	0,46	1,55	1,08	-	-
	±	2,75	3,1	9,3	35,6	0,68	0,05	0,005	0,55	0,005	0,01	0,07	0,05		
3		74,05	27,61	48,65	310,16	21,82	0,12	-	0,75	0,03	0,44	1,21	0,53	-	-
	±	3,02	1,67	5,75	9,95	0,47	0,01		0,13	0,004	0,01	0,09	0,02		
4		65,81	17,6	3,08	328,91	14,78	0,07	-	0,06	0,03	0,11	1,03	0,58	0,09	-
	±	3,31	1,24	0,22	21,59	0,52	0,003		0,01	0,02	0,004	0,09	0,03	0,01	
5		101,14	30,35	74,8	550,55	20,4	-	0,05	0,11	0,02	0,25	1,43	1,23	0,11	-
	±	4,7	2,25	2,08	54,26	0,9		0,01	0,02	0,004	0,01	0,14	0,14	0,004	
6		86,31	27,72	100,99	484,43	31,84	1,67	0,07	3,41	0,06	0,37	1,7	0,89	0,09	0,17
	±	22,47	5,07	154,01	75,85	15,09	2,13	0,06	0,96	0,01	0,09	0,34	0,24	0,01	0,2
7		113,74	17,19	5,77	476,18	11,55	-	-	0,1	0,03	0,09	0,43	0,79	0,18	-
	±	4,48	2,14	0,12	40,73	0,29			0,01	0,01	0,01	0,02	0,08	0,02	
8		74,51	74,28	101,01	507,5	25,6	0,54	0,07	3,14	0,06	0,75	2,22	0,88	0,24	-
	±	0,65	6,1	4,93	8,14	0,53	0,09	0,004	0,72	0,002	0,03	0,06	0,02	0,01	
9		77,58	57,56	73,09	536,97	26,52	0,73	0,14	6,71	0,07	0,67	1,83	1,06	0,19	-
	±	1,93	3,79	4,94	13,7	0,59	0,07	0,002	0,62	0,002	0,02	0,06	0,03	0,004	
10		112,06	20,5	23,68	442,73	24,38	-	-	0,32	-	0,12	0,81	0,8	-	-
	±	1,39	0,76	0,19	6,81	0,19			0,02		0,01	0,01	0,005		
11		146,84	17,68	21,38	418,81	15,73	-	0,04	0,18	-	0,12	1,02	0,63	-	-
	±	2,48	1,65	0,25	25,56	0,06		0,01	0,02		0,004	0,06	0,03		
12		134,02	61,02	308,83	557,76	17,01	0,21	0,07	2,41	0,05	0,3	1,24	1,03	-	-
	±	0,88	2,58	3,39	9,09	0,37	0,01	0,01	0,15	0,002	0,01	0,02	0,01		
13		86,65	96,96	70,84	457,85	36,38	0,1	0,05	0,93	0,03	0,33	1,69	0,98	-	-
	±	0,5	1,93	2,47	5,44	0,2	0,01	0,005	0,03	0,003	0,002	0,03	0,01		

(-) Elementos não identificados nas amostras

**Tabela A.2-** Concentrações elementares de saliva (pós) dos elementos medidos em *mg/L* das amostras dos atletas de futsal. Letra A representa os atletas e DP desvio padrão.

A	DP	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Cu	Zn	Br	Rb	Hg	Pb
1		86	38,23	164,68	252,87	30,12	0,05	0,07	0,615	0,03	0,467	0,922	0,373	-	-
	±	4,34	0,70	6,74	9,35	1,38	0,01	0,004	0,03	0,003	0,01	0,03	0,01	-	-
2		78	44,80	233,90	400,44	30,42	0,16	0,04	1,64	0,06	1,06	1,15	0,83	-	-
	±	2	1,49	4,49	5,51	0,14	0,04	0,002	0,21	0,002	0,01	0,04	0,01	-	-
3		168,78	109,89	352,21	496,75	56,83	0,30	-	5,55	0,07	0,93	1,50	0,97	-	-
	±	8,40	5,26	16,10	18,11	4,51	0,02	0,01	0,47	0,005	0,09	0,07	0,04	0,009	-
4		49,15	21,37	7,97	243,53	16,48	0,12	-	0,23	0,02	0,23	0,58	0,49	0,115	-
	±	3,81	3,00	0,64	19,92	0,57	0,02	0,01	0,04	0,003	0,01	0,05	0,04	0,011	-
5		87,18	29,67	178,90	401,03	28,73	-	0,04	0,17	0,02	0,49	1,12	0,91	0,127	0,192
	±	6,28	2,73	12,61	47,11	1,79		0,00	0,02	0,002	0,02	0,17	0,11	0,003	
6		110,17	32,86	273,01	553,53	48,10	1,98	0,13	4,19	0,07	0,47	1,40	1,44	30,060	-
	±	1,65	0,50	7,05	14,47	1,02	1,92	0,01	0,17	0,002	0,01	0,49	0,63	0,185	-
7		83,06	21,99	35,08	459,91	16,42	0,11	0,02	0,93	0,02	0,10	0,44	0,82	-	-
	±	2,10	2,52	1,67	27,27	0,22	0,03	0,00	0,15	0,001	0,002	0,03	0,05	-	-
8		91,33	38,80	260,68	549,53	41,30	0,25	0,12	2,02	0,03	0,24	2,40	1,00	-	-
	±	2,94	2,19	10,13	25,68	0,88	0,03	0,00	0,24	0,01	0,01	0,17	0,05	-	-
9		109,01	45,57	1118,24	987,38	31,73	0,24	0,50	2,31	0,04	0,26	3,02	2,06	-	-
	±	0,58	1,03	151,19	134,12	1,57	0,03	0,07	0,38	0,001	0,01	0,41	0,29	-	-
10		92,28	17,83	5,84	362,80	12,91	-	-	0,18	0,01	0,09	0,55	0,52	-	-
	±	0,89	0,60	0,13	4,31	0,03	#DIV/0!	#DIV/0!	0,01	0,001	0,001	0,01	0,0046	-	-
11		159,96	20,56	20,34	519,56	20,02	0,06	0,03	0,57	0,01	0,14	1,24	0,77	-	-
	±	2,40	2,60	0,67	29,02	0,29	0,02	0,004	0,16	0,001	0,003	0,11	0,04	-	-
12		111,37	45,20	374,87	428,50	24,07	0,26	0,06	0,76	0,03	0,24	0,82	0,84	-	-
	±	3,48	2,18	19,56	25,88	0,77	#DIV/0!	0,01	0,03	0,002	0,01	0,06	0,10	-	-
13		58,93	22,71	7,89	316,87	14,29	0,26	0,03	1,46	0,01	0,12	0,39	0,61	-	-
	±	0,65	0,39	0,26	9,05	0,09	0,01	0,004	0,04	0,005	0,001	0,01	0,01	-	-

(-) Elementos não identificados nas amostras

A tabela A.3 e A.4 apresentam as concentrações das amostras de plasma (pré) e (pós), respectivamente dos atletas de futsal.

**Tabela A.3-** Concentrações elementares de sangue plasma (pré) dos elementos medidos em *mg/L*. Letra A representa os atletas e DP desvio padrão.

A	DP	P	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Br	Rb	Hg	Pb
1	±	15,35	161,6	690,39	939,17	34,07	0,25	3,36	0,38	2,72	-	0,02	0,79	-	0,23
		1,36	2,11	12,51	8,36	0,47	0,02	0,02	0,004	0,02	0,003	0,03	0,02	-	0,01
2	±	14,52	92,72	460,66	270,3	30,99	0,08	1	0,41	1,1	-	0,82	0,26	-	-
		0,80	15,52	46,10	19,80	1,98	0,03	0,01	0,01	0,02		0,01	0,03		
3	±	11,67	164,53	1010,04	484,03	35,24	0,18	1,01	0,43	0,62	0,02	1,12	0,29	-	0,1
		0,08	5,32	21,49	8,31	0,27	0,003	0,03	0,01	0,01	0,002	0,01	0,001	0,005	
4	±	15,96	180,57	1232,46	620,85	38,16	0,31	1,51	0,36	0,82	-	1,57	0,33	0,09	0,13
		1,33	10,02	38,30	16,10	0,25	0,02	0,02	0,01	0,005	0,001	0,04	0,02	0,005	0,002
5	±	13,39	114,96	640,68	320,66	28,64	0,06	0,82	0,4	0,7	0,03	0,85	0,21	-	-
		5,92	5,88	121,29	54,78	0,95	0,04	0,05	0,03	0,02	0,005	0,12	0,05		
6	±	20,91	158,15	865,89	452,03	38,51	0,12	1,08	0,53	0,85	-	0,93	0,27	-	-
		2,44	14,54	98,82	42,08	1,95	0,01	0,02	0,004	0,02	0,004	0,03	0,004	0,004	0,002
7	±	15,05	144,67	723,21	322,08	28,09	0,09	0,93	0,5	0,59	0,02	1,06	0,28	0,18	-
		7,64	11,91	207,93	80,93	1,59	0,04	0,07	0,03	0,01	0,003	0,27	0,12	0,03	0,01
8	±	11,61	203,15	1031,36	404,64	28,76	0,11	0,39	0,57	0,37	0,02	1,27	0,25	0,2	-
		1,64	20,35	163,54	55,34	0,50	0,03	0,01	0,01	0,01	0,003	0,13	0,03	0,03	
9	±	21,12	148,1	388,42	178,91	24,66	0,03	0,45	0,49	0,39	0,03	0,87	0,19	-	-
		4,28	14,55	52,20	37,61	0,42	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01	0,04	0,01		
10	±	15,93	126,68	682	334,06	35,86	0,11	1,19	0,66	0,6	0,05	1,12	0,29	-	-
		1,78	9,71	137,58	50,35	2,37	0,01	0,07	0,05	0,01	0,01	0,10	0,01		
11	±	4,93	133,2	394,51	199,89	25,68	-	0,86	0,43	0,4	0,02	0,68	0,15	0,1	-
		2,96	38,09	64,80	37,38	0,82	0,03	0,02	0,01	0,01	0,04	0,02	0,03		
12	±	14,03	148,1	779,35	388,93	33,65	0,15	0,79	0,43	0,48	0,03	1,03	0,27	-	-
		1,34	10,12	50,78	17,94	0,73	0,02	0,01	0,003	0,003	0,002	0,004	0,01		



**Tabela A.4-** Concentrações elementares de plasma (pós) dos elementos medidos em *mg/L*. Letra A representa os atletas e DP desvio padrão.

A	DP	P	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Br	Rb	Hg	Pb
		18,41	95,81	553,81	298,96	35,02		0,81	0,46	0,92	-	0,78	0,14		0,11
1	±	1,82	6,67	31,15	12,41	0,98	-	0,04	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	-	-0,003
		9,95	132,90	688,00	353,84	38,68	0,09	0,84	0,41	2,13	0,02	0,88	0,23	0,21	-
2	±	0,91	9,90	16,27	5,78	0,62	0,03	0,05	0,03	0,03	0,002	0,02	0,01		-
		6,97	110,82	589,43	327,41	36,81		1,27	0,66	0,90	0,04	1,35	0,31	-	0,27
3	±	2,13	4,65	34,46	13,86	1,14	-	0,05	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01		0,01
		16,51	121,75	693,19	404,37	32,86	0,18	1,31	0,33	0,67	-	1,07	0,29	-	0,22
4	±	1,71	17,95	113,95	50,25	0,96	0,04	0,01	0,003	0,005	0,002	0,09	0,02	0,03	0,01
		7,76	151,66	1031,08	446,99	36,01	0,11	0,62	0,47	3,21	0,03	1,19	0,29	-	0,22
5	±	1,30	8,18	43,92	20,13	0,83	0,01	0,03	0,01	0,12	0,001	0,01	0,01	0,00	0,01
		11,34	126,14	396,21	276,44	31,98		1,25	0,63	0,62	-	0,87	0,22	-	0,29
6	±	0,92	4,12	20,80	10,03	0,84	-	0,12	0,07	0,02		0,02	0,01	0,02	0,004
		14,24	102,26	596,52	289,92	29,45	0,11	0,63	0,43	0,38	0,03	0,96	0,21	-	-
7	±	1,27	4,47	15,23	4,56	0,63	0,02	0,01	0,004	0,001	0,001	0,02	0,01	-	-
		6,76	107,14	725,74	334,10	32,12	0,11	0,54	0,72	0,51	0,04	1,60	0,28	-	-
8	±	1,12	4,79	28,86	9,05	0,49	0,01	0,01	0,01	0,005	0,003	0,002	0,002	-	-
		24,59	156,27	888,38	459,57	38,36	0,17	0,77	0,78	0,54	0,03	1,36	0,30	-	-
9	±	1,04	5,84	22,27	15,09	0,61	0,04	0,01	0,01	0,01	0,002	0,04	0,02	-	-
		17,45	138,36	862,51	450,88	36,32	0,18	1,13	0,57	0,51	-	1,19	0,26	-	-
10	±	1,28	8,05	35,20	13,27	0,48	0,03	0,04	0,002	0,004	0,004	0,02	0,01	-	-
		15,16	119,62	649,33	287,98	27,57	0,09	0,76	0,39	0,44	-	0,85	0,22	-	-
11	±	0,45	3,40	75,23	32,70	0,37	0,02	0,02	0,005	0,001	0,003	0,05	0,004	-	-
12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	±	13,58	128,04	655,34	312,83	29,89	0,11	0,86	0,36	0,39	0,03	0,93	0,21	-	-
		0,78	4,69	8,51	0,83	0,30	0,001	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01	0,02	-	-

A tabela A.5, A.6 e A.7 apresentam as concentrações elementares de saliva de atletas de jiu jitsu em três momentos: jejum, depois de 4 semanas e após 8 semanas, respectivamente.

**Tabela A.5-** Concentrações elementares de saliva (pré) dos elementos medidos em *mg/L*. Letra A representa os atletas de jiu jitsu e DP desvio padrão.

A	DP	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Cu	Zn	Br	Rb
1	±	107,65 3,99	20,6 2,02	282,11 15,78	519,79 43,24	14,91 0,11	-	0,13 0,01	0,19 0,02	0,06 0,003	0,24 0,005	1,86 0,17	0,81 0,06
2	±	154,05 3,36	14,28 0,54	165,4 7,41	722,29 64,45	10,06 0,33	0,05 0,02	0,03 0,01	0,18 0,1	0,02 0,002	0,12 0,002	1,9 0,16	1,13 0,11
3	±	108,15 4,15	12,27 0,33	85,61 1,46	690,02 62,65	13,96 0,39	-	0,03 0,01	0,17 0,11	0,01 0,002	0,09 0,002	2,68 0,11	1,07 0,1
4	±	124,18 4,91	9,42 0,05	26,67 1,45	547,06 51,88	22,08 0,3	-	-	-	0,03 0,002	0,07 0,002	1,15 0,16	1,27 0,14
5	±	221,59 6,64	65,68 1,91	349,86 2,57	534,41 3,55	35,77 1,51	0,41 0,03	0,14 0,01	0,3 0,02	0,05 0,003	0,46 0,01	1,88 0,01	1,17 0,01
6	±	42,82 1,31	8,57 0,74	2,82 0,9	279,42 12,15	13,1 0,34	-	-	0,03 0,01	-	0,06 0,004	0,88 0,06	0,39 0,02
7	±	88,99 1,69	25,86 1,02	56,59 8,06	330,7 4,66	18,32 0,5	0,11 0,03	0,04 0,002	0,42 0,04	0,01 0,003	0,19 0,003	2,07 0,11	0,55 0,003
8	±	89,53 3,21	12,59 0,71	99,09 0,84	441,8 30,13	12,56 0,28	-	0,08 0,01	0,06 0,01	0,02 0,003	0,06 0,002	1,3 0,08	0,7 0,04
9	±	91,08 3,3	14,56 0,95	51,11 1,33	432,88 30,29	18,1 0,36	-	-	0,02 0,001	0,02 0,003	0,07 0,003	1,39 0,11	0,78 0,04
10	±	71,71 0,72	18,21 0,59	14 2,29	230,24 3,21	36,12 0,37	0,39 0,03	0,02 0,001	0,4 0,03	0,02 0,002	0,19 0,003	0,55 0,04	0,39 0,01
11	±	68,78 1,55	4,97 0,38	11,02 1,95	379,58 18,8	7,35 0,18	-	0,05 0,01	0,03 0,01	-	0,05 0,01	1,61 0,12	0,6 0,04
12	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabela A.6-** Concentrações elementares de saliva (pós 1) dos elementos medidos em *mg/l*. Letra A representa os atletas de jiu jitsu e DP desvio padrão.

A	DP	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Cu	Zn	Br	Rb
1	±	45,27 0,36	5,9 0,36	9,4 0,19	258,8 3,19	7,09 0,08	-	0,01 0,002	0,03 0,004	-	0,06 0,002	0,34 0,02	0,35 0,004
2	±	115,72 2,28	6,77 0,24	1,45 0,02	341,37 6,08	11,18 0,06	-	-	0,1 0,02	-	0,05 0,002	0,9 0,02	0,6 0,01
3	±	60,08 1,15	6,26 0,15	5,64 0,33	224,55 5,25	7,88 0,06	-	-	0,03 0,02	0,004 0,001	0,07 0,02	0,7 0,01	0,41 0,01
4	±	175,65 7,36	31,43 0,81	325,54 11,63	585,9 19,08	71,19 1,29	0,14 0,01	0,15 0,002	0,19 0,001	0,04 0,004	0,16 0,002	0,89 0,02	1,65 0,03
5	±	91,42 5,54	11,51 0,81	1,69 0,18	264,62 4,3	10,39 0,19	-	-	0,08 0,04	-	0,06 0	0,33 0,02	0,5 0,01
6	±	52,2 0,67	8,19 0,52	1,54 0,18	221,33 1,83	10,84 0,11	-	-	0,01 0,01	-	0,05 0	0,63 0,04	0,33 0,004
7	±	66 1,98	5,95 0,6	2,73 0,06	263,4 17,01	10,69 0,31	-	-	0,01 0,01	-	1,18 0	0,99 0,1	0,4 0,03
8	±	75,03 6,33	12,09 1,46	3,86 0,23	326,12 28,77	11,21 0,75	0,06 0,01	0,03 0,003	0,04 0,01	0,007 0,002	0,04 0,003	0,75 0,09	0,53 0,04
9	±	57,55 3,95	17,43 1,57	6,95 0,41	301,05 30,22	16,69 0,54	0,04 0,001	-	0,09 0,01	0,018 0,004	0,1 0,003	0,64 0,08	0,52 0,04
10	±	48,83 2,72	9,58 1,25	1,78 0,06	311,4 21,38	11,8 0,51	0,3 0,05	-	0,03 0,001	-	0,04 0,004	0,82 0,1	0,49 0,03
11	±	41,77 2,84	11,16 1,81	2,81 0,14	216,85 16,78	18,47 1,08	-	-	0,02 0,001	-	0,11 0,003	0,78 0,07	0,39 0,04
12	±	52,28 1,3	8,19 0,98	3,11 0,36	211,93 6,66	8,63 0,2	-	-	0,02 0,001	-	0,04 0,01	0,69 0,09	0,32 0,01

**Tabela A.7-** Concentrações elementares de saliva (pós 2) dos elementos medidos em *mg/L*. Letra A representa os atletas de jiu jitsu e DP desvio padrão.

A	DP	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Cu	Zn	Br	Rb
1		103,16	26,25	58,07	257,4	58	0,146	0,08	0,27	0,016	0,258	1,14	0,43
	±	4,13	1,70	2,03	14,48	0,70	0,003	0,003	0,02	0,001	0,001	0,05	0,01
2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		50,04	8,16	4,33	229	9,60	-	-	0,02	-	0,05	0,68	0,37
3	±	1,79	0,51	0,46	9,24	0,28	-	-	0,00	-	0,002	0,06	0,01
		151,94	19,15	233,07	474,5	23,1	-	0,031	0,03	0,024	0,09	1,75	1,07
4	±	6,22	0,35	6,99	40,23	0,30	-	0,002	0,003	0,001	0,003	0,05	0,06
		67,78	19,19	61,38	239,4	14,30	-	0,02	0,09	0,009	0,15	1,18	0,51
5	±	3,66	1,26	4,99	10,61	0,36	-	0,01	0,004	0,003	0,01	0,08	0,02
		55,69	11,09	2,38	138,5	36,1	-	-	0,13	-	0,07	0,42	0,2
6	±	0,85	1,06	0,08	3,33	0,49	-	-	0,04	-	0,003	0,02	0,01
		75,54	7,02	1,99	233,8	8,30	0,15	-	0,1	-	0,06	0,75	0,35
7	±	3,44	0,56	0,12	10,18	0,04	0,06	-	0,01	-	0	0,06	0,01
		50,86	8,65	0,56	162,3	11,30	-	-	0,02	0,002	0,07	0,32	0,25
8	±	2,46	1,05	0,07	13,27	0,37	-	-	0,01	0,002	0,002	0,06	0,02
		82,51	13,55	10,02	427,5	10,7	-	-	0,07	-	0,07	1,27	0,71
9	±	3,04	1,80	0,49	24,53	0,11	-	-	0,002	-	0,01	0,12	0,04
		63,69	13,59	7,22	368,5	15,60	0,36	-	0,19	0,012	0,3	1,91	0,59
10	±	2,73	1,83	0,47	19,36	0,39	0,16	-	0,07	0,01	0,06	0,23	0,03
		63,45	10,3	104,84	417,5	10,10	-	0,02	0,02	-	0,06	2,48	0,74
11	±	0,71	0,27	0,92	5,87	0,02	-	0,003	0,002	-	0,003	0,06	0,01
		53,07	11,44	6,02	251	18,70	0,18	0,03	0,25	-	0,09	0,95	0,38
12	±	3,72	2,04	0,66	15,29	0,89	0,03	0,01	0,06	-	0,01	0,13	0,01

**APÊNDICE A2- DOCUMENTOS DE CONSENTIMENTO AUTORIZADO E AFINS**

A coleta das amostras só foram realizadas após certos cuidados estabelecidos pelo Comitê de Ética do Hospital Estadual de Londrina. Por isso, cada doador assinou uma carta de consentimento autorizando a doação do sangue e da saliva e respondeu um questionário sobre o próprio estado de saúde, mostrados a seguir:

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Futsal

### Titulo da pesquisa:

**“EFEITO DA TERAPIA COM DIODOS EMISSORES DE LUZ (LED) NA RECUPERAÇÃO PSICOFISIOLÓGICA DE ATLETAS DE FUTSAL APÓS AÇÕES SIMULADAS DE JOGOS, SESSÕES DE TREINOS E JOGOS OFICIAIS”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“EFEITO DA TERAPIA COM DIODOS EMISSORES DE LUZ (LED) NA RECUPERAÇÃO PSICOFISIOLÓGICA DE ATLETAS DE FUTSAL APÓS AÇÕES SIMULADAS DE JOGOS, SESSÕES DE TREINOS E JOGOS OFICIAIS”**, realizada no seu próprio ambiente de treinamento (quadra do clube ao qual você está vinculado). O objetivo do estudo é analisar o efeito da terapia com LED na recuperação psicofisiológica de atletas de futsal após ações simuladas de jogos ou jogos oficiais executados em uma única sessão e em sessões em dias sucessivos. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: Você será submetido a um protocolo de exercício intermitente de alta intensidade. As exigências físicas do protocolo de exercício intermitente são semelhantes à de jogos de futsal. Em um primeiro momento, você participará de três protocolos de exercícios em dias diferentes: um teste de esforço máximo; repetirá duas vezes o protocolo de exercício intermitente ou jogo em diferentes dias. Durante o protocolo de exercício, vocês serão submetidos à terapia com LED ou Placebo. Antes, durante e após os exercícios (imediatamente após, 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após), serão realizados coletas de amostras de sangue para análise bioquímica, serão realizados testes de desempenho de potência de membros inferiores (salto vertical), de contração voluntária máxima, de sprints repetidos, no Yo-Yo e vocês serão questionados sobre sua percepção de dor muscular. Além disso, durante os exercícios você será monitorado por meio de um analisador de gases, frequência cardíaca, por uma escala de percepção subjetiva do esforço para quantificação do esforço nos exercícios e análise de filmagens para verificar a distância percorrida em diferentes velocidades. Em um segundo momento, vocês participarão dos protocolos de exercícios em dias sucessivos (mínimo 2 e máximo 6 dias), de sessões de treinamentos ou jogos, no qual, vocês receberam

terapia com LED ou placebo. As variáveis analisadas antes, durante, imediatamente e horas após protocolo de exercício serão as mesmas citadas acima para o primeiro momento.

Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

As amostras sanguíneas que não forem utilizadas para as análises bioquímicas previstas serão descartadas em local apropriado.

As filmagens que serão utilizadas para análises cinemáticas (ex.: distância percorrida) não serão divulgadas em meio público e serão arquivadas em absoluto sigilo.

Como os exercícios utilizados neste projeto apresentam exigência física semelhante à de partidas de futsal, os riscos envolvidos com essa pesquisa são semelhantes aos riscos de uma partida dessa modalidade como: possíveis lesões mioarticulares, dor muscular, fadiga. No entanto, esses exercícios são desempenhados a todo o momento por atletas dessa modalidade. Dessa maneira, essa pesquisa não implicará a vocês riscos adicionais aos riscos que estão relacionados a treinamentos e jogos de futsal. Estudos semelhantes foram realizados em nosso laboratório e nunca foi relatado nenhum problema.

Os benefícios esperados são: obter o conhecimento do efeito da LED terapia como uma estratégia a ser utilizada para acelerar a recuperação de jogadores de futsal após jogos.

Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso o senhor tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar:

Victor Hugo de Freitas, Rua Delaine Negro 55, apt - 210 bl – 2, Jardim Alto da Colina, Londrina – PR; (43)98081172; Victorfre@ig.com.br) ou procurar o Comitê de

Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380 - Campus Universidade Estadual de Londrina CEP 86057-970, fone: 33715455 ou por e-mail: cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida, assinada e entregue ao(a) senhor(a).

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

**Pesquisador Responsável**

RG:: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Jiu Jitsu

### “Avaliação de cargas de treino e desempenho em atletas de jiu jitsu ”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo para participar da pesquisa **“Avaliação de cargas de treino e desempenho em atletas de jiu jitsu”**, a ser realizada no Departamento de Histologia da Universidade Estadual de Londrina e na Academia Brasil Wellness – Londrina/PR. O objetivo da pesquisa é avaliar como um período de 8 semanas de treino físico e técnico de jiu jitsu pode modular a percepção de esforço do atleta, sua percepção de recuperação e estresse, a sua variabilidade da frequência cardíaca, desempenho físico de membros inferiores, hormônios testosterona e cortisol na saliva, anticorpos na saliva e substâncias indicadoras de dano muscular e inflamação em sangue. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: participar de um treinamento físico e técnico durante a sua preparação para um campeonato a nível nacional ou internacional, do qual você pretenda participar. O treinamento terá duração de 8 semanas sob orientação e supervisão de um profissional de educação física habilitado para preparação de atletas da modalidade, com nível de mestre e faixa preta em jiu jitsu. Além disso, serão realizadas três coletas de amostras de saliva (salivação espontânea) e de sangue, na primeira, quarta e oitava semana de treino, para avaliação de hormônios (cortisol e testosterona) e anticorpos (IgA) e substâncias presentes no sangue que indicam dano muscular (creatino quinase) e presença de inflamação (proteína C reativa, interleucina 1, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa). Você também será submetido a três testes de salto, na primeira, quarta e oitava semana, que serão realizados com um movimento de agachamento e estiramento das pernas, ou iniciando com as pernas semi-flexionadas. Os testes de salto serão realizados para avaliar a força muscular das pernas. Após cada sessão de treinamento, será perguntado qual a intensidade percebida do esforço realizado durante o treino, em uma escala de pontos conhecida como escala de Borg. Na primeira avaliação do estudo, você será deitado no tatame, com um sensor portátil e um relógio de treino (cardiofrequencímetro) durante 10 minutos para avaliação de sua frequência cardíaca de repouso e avaliação de um índice de monitoramento de atletas



conhecido como variabilidade da frequência cardíaca (VFC). A VFC indica como o seu sistema nervoso está agindo sobre a frequência de batimentos do coração, em função das cargas de treinamento que serão aplicadas. O mesmo procedimento de avaliação da VFC será realizado três vezes por semana, mas em intervalos curtos de dois minutos, antes das sessões de treinamento da segunda, terça e sexta-feiras. Nas segunda-feiras, você deverá responder um questionário chamado RESTq-sport, que avaliará o seu nível de recuperação e estresse, e apontará, em uma escala de pontos, a sua percepção de recuperação física (escala TqR). Estes dados permitirão ao pesquisador avaliar se o treino está promovendo ganho de desempenho, permitindo recuperação adequada entre sessões de treino, qual a intensidade de carga percebida pelo atleta e se a intensidade de carga está adequada.

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Após as análises, as amostras de saliva e sangue serão descartadas.

Esclarecemos ainda, que você não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação. Caso seja necessário, o deslocamento por transporte público até o local de treino será ressarcido pelo pesquisador responsável.

Os benefícios esperados são a identificação de uma carga de treinamento individualizada, monitorada por métodos simples e seguros (percepção de esforço e variabilidade da frequência cardíaca) que poderão ajudá-lo futuramente no planejamento de preparações para eventos competitivos. Os resultados da pesquisa ajudarão profissionais da área esportiva a monitorarem e treinarem atletas de jiu jitsu, melhorando rendimento físico e reduzindo o risco de sobre treinamento e perda de rendimento esportivo. Os riscos da pesquisa são mínimos, sendo relacionados a possível lesões musculares e osteoarticulares decorrentes do treinamento. No entanto, esclarecemos que sua carga de treino será monitorada diariamente, caso a intensidade de treino se torne muito elevada e a percepção de estresse esteja elevada, sua carga de treino será ajustada para evitar estresse físico e emocional. Mesmo que ocorra algum dano e você necessite cuidados médicos em

decorrência de algum procedimento do estudo, o pesquisador responsável será comunicado, providenciando o deslocamento a serviço médico público.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá contatar o pesquisador responsável: Profa. Dra. Solange de Paula Ramos, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, km 380, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina; telefone: (43) 3371-4327/99901-4992; e-mail: ramossolange@uel.br, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue à você.

Londrina, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_.

### **Pesquisador Responsável**

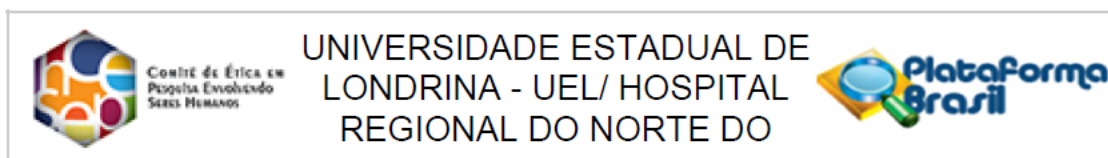
RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (NOME POR EXTENSO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Obs.: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, o texto deve estar voltado para os pais e deve ser incluído ainda, campo para assinatura do menor e do responsável.



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** EFEITO DA TERAPIA COM DIODOS EMISSORES DE LUZ (LED) NA RECUPERAÇÃO PSICOFISIOLÓGICA DE ATLETAS DE FUTSAL APÓS AÇÕES SIMULADAS DE JOGOS, SESSÕES DE TREINOS E JOGOS OFICIAIS

**Pesquisador:** Victor Hugo de Freitas

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 39519414.4.0000.5231

**Instituição Proponente:** CEFE - PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA UEM/UEL

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 930.218

**Data da Relatoria:** 21/12/2014

### Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa visa analisar o efeito da terapia com LED na recuperação psicofisiológica de atletas de futsal após ações simuladas de jogos, sessões de treinos e jogos oficiais dessa modalidade. Para isso, 15 atletas de futsal do sexo masculino da Associação Campo Mourão Futsal serão submetidos a um protocolo de exercício intermitente para o Futsal (PIEF) ou a jogos oficiais e serão submetidos à terapia com LED. Um grupo receberá uma sessão de terapia com LED (grupo LED) após o PIEF ou jogos, e o outro grupo receberá tratamento placebo simulando a terapia com LED (grupo placebo). As variáveis analisadas durante o LIST e o PEIF serão: análise cinemática, consumo de oxigênio, frequência cardíaca, lactato sanguíneo e percepção subjetiva do esforço. As variáveis analisadas antes, imediatamente após, 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após são: variabilidade da frequência cardíaca, coleta sanguínea para análise de CK, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, marcadores de estresse oxidativo, avaliação de desempenho em testes de potência de membros inferiores, de contração voluntária máxima, de sprints repetidos, de velocidade e no Yo-Yo e serão questionados sobre sua dor muscular percebida. Em um segundo momento os dois grupos participarão dos protocolos de exercícios ou jogos em dias consecutivos ou sessões de treinos, no qual, um grupo receberá terapia com LED em dias consecutivos (grupo LED)

**Endereço:** PROPPG - LABESC - Sala 3

**Bairro:** Campus Universitário

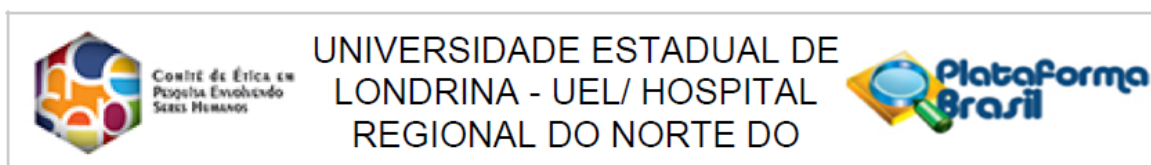
**CEP:** 86.057-970

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 930.218

e o outro receberá placebo. As variáveis analisadas durante o PEIF, treinos ou jogos e antes, imediatamente após e horas após os PEIF, treinos ou jogos sucessivos serão as mesmas citadas acima para o primeiro momento.

**Objetivo da Pesquisa:**

Analisar o efeito da terapia com LED na recuperação psicofisiológica de atletas de futsal após ações simuladas de jogos, sessões de treinos e jogos dessa modalidade executados em uma única sessão e em sessões em dias sucessivos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Quanto aos riscos o pesquisador relata: Fadiga, Dor muscular pós exercício. No entanto, os participantes da pesquisa estão acostumados a realizarem exercícios com as mesmas características dos exercícios envolvidos no presente projeto. Dessa maneira, os jogadores não serão submetidos a nenhum procedimento que envolva riscos adicionais aos riscos envolvidos em treinamentos ou jogos de futsal. Estudos semelhantes foram realizados em nosso laboratório e nunca foi relatado nenhum problema.

Os benefícios segundo o pesquisador são: obter o conhecimento do efeito da LED terapia como uma estratégia a ser utilizada para acelerar a recuperação de jogadores de futsal após jogos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é interessante uma vez que o LED tem demonstrado ser um método eficaz na redução de dor muscular e inflamação e pode auxiliar os jogadores.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta folha de rosto preenchida e assinada adequadamente. Apresenta declaração da Associação Campo Mourão Futsal para coleta de dados junto aos atletas. Apresenta TCLE em acordo com a resolução. Apresenta cronograma com previsão de coleta de dados em início de fevereiro. Apresenta orçamento de R\$28.000,00 que será custeado pela bolsa da produtividade do orientador do projeto de pesquisa.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram atendidas, recomenda-se aprovação.

**Endereço:** PROPPG - LABESC - Sala 3

**Bairro:** Campus Universitário

**CEP:** 86.057-970

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA ENVOLVENDO  
SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL  
REGIONAL DO NORTE DO



Continuação do Parecer: 930.218

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

LONDRINA, 08 de Janeiro de 2015

---

**Assinado por:**  
**Paula Mariza Zedu Alliprandini**  
**(Coordenador)**