

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DO DESPORTO E EDUCAÇÃO FÍSICA

**Análise da Variação do Cortisol, da Testosterona e do Rácio
Testosterona/ Cortisol, em resposta ao Teste Anaeróbio de Wingate**



Rui Pedro Lima Pinho

Coimbra 2006

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DO DESPORTO E EDUCAÇÃO FÍSICA

Seminário relativo ao Comportamento de Marcadores Imunológicos em Esforço de Nado Aeróbio e Anaeróbio, com a orientação do Mestre Luís Rama e coordenação da Professora Doutora Ana Teixeira.

AGRADECIMENTOS

Chegado ao fim, torna-se indispensável recompensar todas as pessoas que de alguma forma estiveram comigo, e com a sua preciosa ajuda me possibilitaram a finalização deste trabalho de seminário.

À Professora Ana Teixeira, que com a sua gentileza, e simpatia, me ajudou ao longo deste ano lectivo, contribuindo de sobremaneira para o desenvolvimento científico de uma área tão importante nesta Faculdade, através da realização de tão prestigiantes trabalhos científicos.

Ao Mestre Luís Rama, que pela sua surpreendente cultura científica em tão vastas áreas da Educação Física e do Desporto em geral tem contribuído para o meu desenvolvimento académico, primando a sua intervenção em valores tão nobres como o respeito e a humildade.

À Doutora Fátima Rosado, pelo apoio prestado na realização deste seminário, ao nível dos procedimentos laboratoriais, onde evidencia um conhecimento científico moldado às necessidades do Desporto actual.

Aos meus Pais, e irmão, visto que é nestas alturas que mais precisamos do apoio familiar, e como sempre, este foi incondicional, nunca permitindo que nada me faltasse e sendo sempre extremosos nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas de estágio pedagógico, cujas vivências ao longo deste ano, tornaram-me ainda mais forte, e cuja amizade e apoio foram um marco nesta minha curta vida.

A ti Rafaela, que tanto sofreste ao longo deste ano com a minha ausência. Quero-te dizer que foste, és e sempre serás a pessoa mais importante da minha vida, e que o orgulho e o amor que sinto por ti atinge proporções desconhecidas do Mundo actual.

A Todos, o meu muito Obrigado!!!

RESUMO

O objectivo do presente estudo aborda o estudo da variação do cortisol e da testosterona salivar, e subsequentemente do rácio Testosterona/ Cortisol ao longo de 24 horas, e como resposta a um esforço anaeróbio – Teste de Wingate. Para tal, foram reunidos 12 nadadores do sexo masculino de nível competitivo nacional, com média de idades igual a $17,03 \pm 0,89$ anos, com um volume de treino médio anual de $1450 \pm 70,71$ km e com $7,08 \pm 1,16$ anos de competição.

O protocolo adoptado incluiu a realização do teste de Wingate, que permitiu determinar a potência máxima, potência mínima e índice de fadiga. Foram recolhidas seis amostras de saliva em seis momentos diferentes: a primeira antes da aplicação do teste, a segunda 15min após o teste, a terceira e quarta, 1h30min e 2h30min após o teste, respectivamente, a quinta na manhã do dia seguinte e a sexta 24 horas após o teste.

O tratamento estatístico dos dados compreendeu a análise descritiva (mínimos, máximos e desvios padrão), e o método estatístico não paramétrico (Wilcoxon Test) para comparar os seis momentos. Foi estabelecido um nível de significância de 0,05.

Em relação ao cortisol, não foram verificados aumentos significativos na sua concentração. No entanto, do período antes do teste para os 15min após o teste, o valor de cortisol aumenta acentuadamente, diminuindo posteriormente até à 1h30min depois do teste. Da 1h30min após o teste, até à manhã do dia seguinte, dá-se novamente um aumento da sua concentração, diminuindo de seguida até ao período de 24 horas após o teste, atingindo valores muito semelhantes aqueles encontrados no período inicial.

Quanto aos níveis de testosterona, verificou-se um aumento significativo desde o período antes do teste, para o período de 15min após o teste ($p=0,013$). Dos 15min e das 2h30min após o teste, para com a manhã do dia seguinte, foram encontrados aumentos significativos na concentração de testosterona, que de alguma forma indiciam uma elevação dos processos anabólicos.

No que concerne ao rácio T/C, verificou-se uma pequena diminuição do seu valor entre o período antes do teste, para com os 15min após o teste. Dos 15min após o teste, até às 2h30 após o teste, há um aumento acentuado do rácio, que reflecte um fenómeno anabólico. A diminuição dos valores do rácio das 2h30min após o teste, até às 24 horas depois do teste, são resultado das variáveis circadianas.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICOS	v
ÍNDICE DE TABELAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
ABREVIATURAS	viii
CAPÍTULO I:.....	1
INTRODUÇÃO:.....	2
CAPÍTULO II:.....	3
REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Cortisol	5
2.2 Testosterona.....	6
2.3 Exercício Físico e Cortisol	8
2.3.1 Exercício Físico e Cortisol na Actividade Intensa e de curta duração	12
2.4 Exercício Físico e Testosterona	15
2.4.1 Exercício Físico e Testosterona na Actividade Intensa e de curta duração	17
2.5 Rácio Testosterona/ Cortisol	18
2.6 Teste de Wingate	20
CAPÍTULO III:	23
METODOLOGIA.....	24
3.1. Caracterização da Amostra	24
3.2. Procedimentos	26
3.3. Enquadramento Temporal	26
3.4. Teste de Wingate	26
3.4.1. Equipamentos Utilizados	26
3.4.1.1. Calibração do Aparelho	26
3.4.2. Altura do Selim.....	27
3.4.3. Correias de Fixação	27
3.4.4. Aquecimento.....	27
3.4.5. Realização do Teste Propriamente dito.	27
3.4.6. Variáveis Obtidas	28
3.5. Recolha da Saliva	28
3.6. Recolha da Microamostra para a determinação do lactato	29
3.7. Procedimentos Laboratoriais	29
3.8. Procedimentos Estatísticos	33
CAPÍTULO IV:	34
APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	35
4.1. Teste de Wingate	35
4.2. Parâmetros Fisiológicos.....	36
4.3. Parâmetros Hormonais	36

CAPÍTULO V:	40
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	41
5.1. Discussão dos resultados relativos ao Teste de Wingate.....	41
5.2. Parâmetros Fisiológicos.....	42
5.3. Parâmetros Hormonais	42
5.3.1. Variação do Comportamento do Cortisol Salivar.....	42
5.3.2. Variação do Comportamento da Testosterona Salivar	44
5.3.3. Variação do Comportamento do Rácio Testosterona/ Cortisol	46
CAPÍTULO VI:	47
CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	48
6.1. Conclusões.....	48
6.2. Recomendações	50
CAPÍTULO VII:	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1: Pequena Secção do Testículo Humano. Adaptado de Vander <i>et al.</i> (2001)	6
Figura II.2: Valores do Cortisol nos períodos antes do teste, no momento do teste, e a cada 5 minutos de teste, até perfazer 15 minutos, com uma intensidade de 36% da potência máxima da perna. Adaptado de Kraemer <i>et al.</i> (1989).....	13
Figura II.3: Comportamento do Cortisol num esforço anaeróbio com a duração de 1min. Adaptada de Schwarz e Kinderman (1990).....	14
Figura II.4: Comportamento do Cortisol num esforço anaeróbio com a duração de 1min, e noutro tipo de exercício com um aumento gradual da intensidade, e com uma maior duração. Adaptada de Schwarz e Kinderman (1990).....	15
Figura III.1: Minishaker Modelo MS2 Ika.....	30
Figura III.2: Amostras colocadas ordenadamente para uma posterior análise.....	30
Figura III.3: Preparação da Solução Diluente.....	31
Figura III.4: Leitor de Elisa ELx 800 (Universal Microplate Reader, Bio – tek instruments).....	32
Figura III.5: Lavagem dos poços com solução de lavagem.....	33

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico IV.1: Variação Média da Concentração de Cortisol ao longo dos diferentes momentos do estudo.....	37
Gráfico IV.2: Variação Média da Concentração da Testosterona ao longo dos diferentes momentos do estudo.....	38
Gráfico IV.3: Variação Média do Rácio Testosterona/ Cortisol ao longo dos diferentes momentos do estudo.....	39

INDICE DE TABELAS

Tabela III.1: Mínimos, máximos, médias e desvios padrão da Idade Decimal, dos anos de treino, do volume de nado por ano e das provas mais pontuadas.....	25
Tabela III.2: Mínimos, máximos, médias e desvios padrão da Massa Corporal, da Altura Sentado, da Envergadura e do Somatório das Pregas (somatório das 6 pregas corporais).....	25
Tabela III.3: Protocolo dos diferentes momentos de recolha da saliva.....	29
Tabela IV.1: Valores mínimos, máximos, médios e desvios padrão da potência mínima, da potência máxima relativa, da potência média, da potência média relativa e do índice de fadiga.....	35
Tabela IV.2: Valores mínimos, máximos, médios e desvios padrão da frequência cardíaca e do lactato.....	36
Tabela IV.3: Valores mínimos, máximos, médios e desvios padrão da concentração de Cortisol Salivar (pg.ml^{-1}).....	36
Tabela IV.4: Valores mínimos, máximos, médios e desvios padrão da concentração da Testosterona Salivar (pg.ml^{-1}).....	38
Tabela IV.5: Valores mínimos, máximos, médios e desvios padrão da concentração do Rácio Testosterona/ Cortisol.....	39

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Protocolo de Recolha das Amostras de Saliva
- Anexo 2.** Dados: Caracterização da Amostra
- Anexo 3.** Dados: Resultados do Teste do Wingate Anaerobic Test
- Anexo 4.** ELISA competitivo
- Anexo 5.** Tratamento Estatístico

ABREVIATURAS

Rácio T/C	Rácio Testosterona/ Cortisol
%	Porcentagem
ACTH	Hormona Corticotrófica
LH	Hormona Luteinizante
m	Metros
min	Minutos
h	Hora
NPD	Natação Pura Desportiva
TAPER	Do Inglês Tapering – off - afinamento
s	Segundos
1RM	Uma repetição máxima
WanT	Teste de Wingate (Wingate Anaerobic Test)
Kg	Kilogramas
ATP	Adenosina Trifosfato
bpm	Batimentos por Minuto
W	Watts
mm	Milímetros
rpm	Rotações por minuto
PAnM	Potência anaeróbia máxima
CA	Capacidade Anaeróbia
IF	Índice de Fadiga
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
Pg.ml	Picogramas por mililitro
FC	Frequência Cardíaca

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Ao longo dos tempos, a vontade de vencer, inerente à condição humana e aos próprios princípios do Desporto actual, levam os diferentes agentes desportivos a enveredarem e a investirem na investigação, focalizada nos parâmetros que de alguma forma melhorem o rendimento do atleta. Assim, contribuindo para um melhor conhecimento científico, propusemo-nos realizar uma investigação que aborda o comportamento do cortisol, da testosterona e do rácio Testosterona/ Cortisol, ao longo de 24 horas, após a execução do Wingate anaerobic test.

A existência de tarefas de treino com características idênticas ao protocolo utilizado durante a investigação, justificam a pertinência deste estudo. Por outro lado, os marcadores controlados através da análise salivar, justificam pelo seu carácter não invasivo a curiosidade dos investigadores.

A resposta destes marcadores carece de maior investigação, já que não são unânimes as conclusões apontadas até à data. Assim, a possibilidade de utilizar uma amostra constituída por atletas treinados, de elevado rendimento fundamenta os resultados obtidos.

Numa primeira parte do nosso trabalho, fazemos referência a todos os estudos encontrados por nós, e que numa fase final poderão suportar ou refutar os resultados por nós obtidos. De seguida, apresentaremos toda a metodologia adoptada, e todos os resultados obtidos, bem como a posterior discussão desses resultados, e de uma forma muito sintética, as conclusões e recomendações retiradas deste estudo.

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

No nosso ponto de vista, antes de passar à abordagem deste capítulo, julgamos pertinente justificar o modo como orientaremos a revisão da literatura publicada e por nós consultada sobre o tema. Serão objecto da nossa investigação, estudos utilizando amostras constituídas por atletas de diversas modalidades, que de alguma forma ajudem à clarificação dos nossos objectos de estudo.

Todos os estudos que aqui recebem menção, foram criteriosamente escolhidos atendendo à especificidade dos objectivos estudados.

Numa fase inicial, torna-se essencial caracterizar o cortisol e a testosterona relativamente ao local onde estas hormonas são produzidas e suas características mais importantes, e posteriormente a função que cada uma exerce dentro do organismo. É indispensável referir aqui, que todo o conhecimento exposto ao longo da caracterização destas duas hormonas, foi retirado de Vander *et al.* (2001).

Depois de definidos e caracterizados os diferentes objectos de estudo, incidimos a nossa abordagem e a nossa atenção no comportamento que estes evidenciam como resposta a diferentes tipos de exercício. Neste ponto, estudamos a resposta aguda (imediate) do cortisol, da testosterona e do rácio Testosterona/ Cortisol.

Vale a pena referir que a generalidade dos trabalhos publicados que usam estes marcadores hormonais avaliam a sua concentração no sangue. No nosso estudo utilizaremos a concentração salivar como procedimento. Dada a reduzida difusão desta metodologia, a literatura disponível que referencia trabalhos com métodos de determinação destes parâmetros fisiológicos revelou-se escassa.

Embora grande parte da literatura publicada incida sobre o comportamento destes parâmetros hormonais associado à resposta crónica (prolongada), e porque acreditamos que este conhecimento permite uma melhor compreensão do papel desempenhado por estas hormonas, apresentamos alguns trabalhos publicados sobre este assunto.

Não poderíamos deixar também de caracterizar o Wingate Anaerobic Test, o protocolo utilizado neste estudo bem como os sistemas energéticos requeridos.

2.1 – Cortisol

O cortisol, é o principal glucocorticóide, secretado pelo córtex supra – renal. Os glucocorticóides, receberam este nome porque possuem a capacidade de aumentar a concentração sanguínea da glicose. Estes, são responsáveis pela resistência humana aos diferentes tipos de stress físico, mental e às doenças de menor gravidade, como as infecções das vias respiratórias. Pelo menos 95% da actividade glucocorticóide decorre da secreção do cortisol.

Esta hormona, é regulada pela hormona corticotrópica (ACTH), que é secretada pela glândula da hipófise anterior.

O cortisol, apresenta um conjunto de efeitos sobre o metabolismo de diferentes substâncias.

Esta hormona é responsável, no metabolismo dos hidratos de carbono, pela estimulação da glicogénese (formação de glicose a partir das proteínas) pelo fígado, aumentando de 6 a 10 vezes mais a intensidade da glicogénese; é responsável pela diminuição da utilização da glicose pelas células; garante a elevação da concentração sanguínea da glicose.

No que toca aos efeitos do cortisol, sobre o metabolismo das proteínas, verifica-se uma diminuição em praticamente todas as células corporais, à excepção das do fígado. Esta redução é causada tanto pela diminuição da síntese proteica, como pelo maior catabolismo das proteínas já presentes nas células. É também responsável pelo aumento da quantidade de aminoácidos no sangue, em consequência da diminuição do transporte destes para as células extra – hepáticas e aumentando o transporte para as células hepáticas.

O cortisol, apresenta efeitos também sobre o metabolismo lipídico. Um dos mais conhecidos, é a sua capacidade de mobilização de ácidos gordos, a partir do tecido adiposo, aumentando a sua concentração no plasma, o que só por si aumenta a utilização para fins energéticos. O cortisol também aumenta moderadamente a oxidação dos

testosterona que é fixada nos tecidos é convertida no interior das células em didrotestosterona, e é sob essa forma que a testosterona interfere em muitas das suas funções intracelulares.

A testosterona é responsável pelas características distintivas do corpo masculino, no entanto, esta substância é também responsabilizável por outros aspectos, nomeadamente:

- Desenvolvimento dos órgãos masculinos, e pela descida do testículo (descem para o escroto, a partir dos dois últimos meses de gravidez).
- Desenvolve as características sexuais primárias e secundárias do adulto, nomeadamente a distribuição dos pelos corporais, a calvície, o efeito sobre a voz e sobre a pele.
- Inibe a secreção de LH, actuando na pituitária anterior.
- Estimula o anabolismo proteico, o desenvolvimento muscular, o crescimento ósseo e de retenção do cálcio.
- Aumenta o metabolismo, e subsequentemente o número de hemácias.
- Estimula a secreção de eritropoetina.

A testosterona não apresenta um comportamento específico ao longo do dia. No entanto, poderão haver oscilações na sua concentração como resposta à temperatura e como resposta a uma situação stressante (Hoogeven. e Zonderland., 1996).

Segundo Hakkinen e Pakarinen. (1991), os valores de testosterona à tarde são algumas vezes maiores do que aqueles encontrados pela manhã.

2.3 – Exercício Físico e Cortisol

Ao longo desta revisão, podemos conferir que existem opiniões contraditórias, devidamente fundamentadas, acerca do comportamento do cortisol. Muitas das investigações aqui citadas referem aumento ou redução na concentração embora nem sempre os procedimentos utilizados para a determinação do cortisol sejam concordantes. Seria inadequado da nossa parte neste momento, precisar quais os estudos em que há um aumento ou diminuição desses níveis, sem que se refira a metodologia e procedimentos adoptados em cada estudo.

O cortisol parece ser um indicador potencialmente interessante para aceder aos efeitos do treino e do sobretreino.

Vários factores estão intimamente relacionados com as variações nas concentrações de cortisol, dentro destes conta-se com a influência das cargas de treinos.

Ao longo desta revisão, pretendemos abordar os principais trabalhos publicados por nós consultados, e que de alguma forma contribuem para a compreensão da variação dos níveis da concentração desta hormona.

Costill *et al.* (1991), Fry *et al.* (1991) e Flynn *et al.* (1994), defendem que o stress induzido pelo exercício de treino, poderá ser estimado a partir da concentração de cortisol, ao longo da época desportiva.

Os níveis deste parâmetro aumentam durante o exercício, de acordo com o seu tipo, a intensidade, a duração e o nível de treino dos indivíduos. No entanto, segundo Guezzenec *et al.* (1995), estes níveis poderão aumentar, se o indivíduo se encontrar numa situação de “stress” fisiológico e psicológico.

Foi realizado um estudo com 24 nadadores masculinos, divididos em dois grupos de nível diferente, em que o objectivo era comparar os efeitos do treino, no plano psicológico e do desempenho, durante uma época de competição. O planeamento englobava 25 semanas de treino, para ambos os grupos. Nas primeiras quatro semanas,

os atletas dos dois grupos treinavam juntos, uma vez por dia. Entre a 5^a e a 11^a semana, um dos grupos treinou duas vezes por dia, enquanto que o outro mantinha a frequência de treino.

Os resultados obtidos concluíram que no grupo em que houve aumento do número de treinos, e conseqüentemente um aumento do volume de nado, constatou-se um aumento significativo na concentração de cortisol, durante o período de alteração de volume. O grupo que manteve menor exposição ao volume de treino apresentou resultados estáveis ao longo das 25 semanas do estudo. Assim, os autores do estudo concluíram que durante períodos de treino intenso, os sujeitos tendem a aumentar os níveis de cortisol podendo experimentar sintomas de fadiga crónica. (Costill *et al.* 1991).

Existem no entanto um conjunto de trabalhos publicados que relativamente ao comportamento do cortisol não concordam com o seu incremento associado ao aumento da quantidade de treino.

Os resultados obtidos por Houmard *et al.* (1990), num estudo em que houve uma redução no volume e frequência de treino ao longo de três semanas, em corredores de atletismo, suportam uma eventual redução do “stress”, associado ao treino, embora os valores de cortisol se tenham mantido inalteráveis, durante esta fase de redução. Aliás Barron *et al.* (1985), defendem que a diminuição dos níveis de cortisol, aparece somente em resultado de uma diminuição drástica ao nível dos factores de treino. Num estudo realizado pelo mesmo, foram observados valores elevados de cortisol em atletas masculinos, mas que voltaram aos valores normais, após quatro dias de descanso. No entanto, os valores de cortisol elevaram-se após duas semanas de treino intenso, e não diminuíram após duas semanas de treino normal.

Para além do “stress” que certas actividades exortam, o volume, a intensidade e a frequência do exercício, são factores que influenciam fortemente os níveis de concentração do cortisol. Existem um conjunto de trabalhos, que abordam esta temática, e que irei sucintamente expor de seguida, sem nunca desprezar os aspectos psicológicos, que estão relacionados com as diferentes componentes do treino.

Um estudo desenvolvido em 18 semanas, com 10 nadadoras e 9 nadadores, teve como objectivo, examinar o comportamento do cortisol plasmático, durante períodos de treino

intensivo. Foram feitas três medições, uma antes da época, uma após as primeiras 9 semanas de treino (volume de 5.500m/dia), e enfim após as restantes 9 semanas onde se assistiu a um aumento do volume de treino (8.300m/dia). As concentrações de cortisol nos homens, da 1ª para a 2ª medição decresceram significativamente, enquanto que com o aumento do volume de treino, a concentração do mesmo aumentou significativamente, até atingir valores semelhantes aos iniciais. (Tyndall *et al.* 1996).

Um estudo realizado por Lac *et al.* (1997), já citado anteriormente, pretende evidenciar o comportamento do cortisol. Neste estudo, foram realizadas as seguintes medições: a) antes do teste, b) às 10 horas da manhã (hora de início do teste), c) a cada 5 minutos de teste (teste com duração de 30 minutos), d) 30 minutos, e) 1 hora e 30 minutos, f) 5 horas após o teste. O protocolo utilizou um esforço sub – máximo, em cicloergómetro, com uma amostra de 9 estudantes de Educação Física. Não se verificaram diferenças significativas entre os valores de a), para os valores de referência b), mas 5 minutos após o começo do teste, o valor de cortisol era significativamente elevado. Os valores acabaram por cair um pouco, mas continuaram altos em relação aos valores de b), às 11 horas e às 12 horas (30 minutos e 1 hora e 30 minutos após o término do teste respectivamente). Depois de 5 horas, os valores voltaram aos valores de referência. O aumento de 88%, desde o período antes do teste, até aos 5 minutos, poderá ser explicado pela influência do “stress” dos alunos, associado ao facto de estarem num ambiente desconhecido. Segundo o autor, os altos valores de cortisol atingidos aos 10 minutos de teste, são explicados pelo aumento da temperatura corporal do indivíduo, associados a uma diminuição dos valores de PH.

Bonifazi *et al.* (1995), com a ajuda de 8 nadadores de topo, realizaram um estudo durante 24 semanas, depois do início de época. Foram realizadas 3 sessões, constituídas por 15 repetições de 200m estilos, com velocidade de nado pré – determinada (associada a 4 mmol⁻¹ de lactato, calculado dias antes da realização do teste). A concentração de Cortisol aumentou após o exercício, e, aquando do período de recuperação houve uma diminuição na sua concentração, embora os valores se tenham mantido elevados. A concentração de cortisol foi maior na 2ª sessão do que nas restantes, e a explicação que os autores dão para este facto, está relacionada com a condição stressante, induzida por um aumento das variáveis do treino, em consonância com um aumento da performance aeróbia. Em contraste, na 3ª sessão encontramos os

valores mais baixos de cortisol, que poderão estar relacionados com uma melhoria da performance, como uma adaptação ao trabalho desenvolvido. A grande conclusão que retiramos deste estudo, diz-nos que diferentes períodos de treino, com os seus correspondentes níveis de performance, podem afectar os valores hormonais.

A preparação para as competições importantes, normalmente coincide com um período de redução de volume e de intensidade. Na Teoria geral de planeamento e periodização do treino em Natação Pura Desportiva (NPD), esta estratégia é denominada TAPER (do inglês Tapering – off – afinamento) (Maglisho., 2003).

Bonifazi *et al.* (2000), concluíram que, a diminuição dos valores de cortisol, verificável nos períodos de preparação terminal em N.P.D, está intimamente relacionado com uma melhoria do desempenho. A diminuição do cortisol, no fim de um período de treino, poderá ser considerado como um índice de adaptação ao trabalho, verificável em melhores desempenhos. Estes resultados foram obtidos, num estudo realizado pelo mesmo autor, com dois grupos de nadadores de elite, em que houve um período de TAPER antes da principal competição. Todos os nadadores estudados, participavam em distâncias superiores a 400 metros, onde o metabolismo aeróbio é considerado relevante. (Capelli *et al.*, 1998).

Costill *et al.* (1991), também referem que a concentração de cortisol aumenta após o treino intensivo, e decresce durante o período de redução da carga de treino.

No entanto, Tanaka *et al.* (1993), não encontraram diferenças nas concentrações de Cortisol, durante 6 semanas de aumento progressivo do treino, e de 2 semanas de diminuição progressiva do treino.

Neste sentido, vão os estudos conduzidos por Mujika *et al.* (1996), num trabalho de investigação com oito nadadores masculinos bem treinados, ao longo de 26 semanas, durante a época de Inverno em que as concentrações de cortisol, não foram significativamente diferentes, nos diferentes períodos estudados, que os autores denominaram de “mid – season” (10ª semana), pré – taper (22ª semana) e pós – taper (26ª semana). Estes concluíram que o treino intensivo, e o período de redução das cargas de treino, não têm efeito no sistema endócrino dos nadadores, que se adaptam ao programa de treino, sem evidenciarem sinais de fadiga crónica. Em termos de

desempenho, houve uma não significativa diminuição dos seus valores entre a “mid – season” e o pré – taper, enquanto que o período de redução das cargas de treino, resultou num significativo aumento da performance dos nadadores.

Posto isto, estamos perante dois tipos de resultados distintos. Bonifazi *et al.* (2000) e Costill *et al.* (1991), sugerem que há uma diminuição dos valores de concentração do cortisol no período de redução das cargas de treino, enquanto que Tanaka *et al.* (1993) e Mujika *et al.* (1996), concluíram que as concentrações de cortisol não variam, desde um período de treino intensivo, para um período de redução das cargas de treino. No entanto, Bonifazi *et al.* (2000); Costill *et al.* (1991); Mujika *et al.* (1996) e Tanaka *et al.* (1993), são unânimes em concluir que, uma diminuição do volume, está associada a um aumento da performance, nas competições seguintes.

Para além dos aspectos quantificáveis da carga de treino que parecem assumir relevância na concentração do cortisol, também os factores psicológicos tendem a ser considerados como factor perturbador na quantidade de circulante desta hormona.

Lac *et al.* (1997), sugerem que o facto dos valores de cortisol salivar aumentarem significativamente após um exercício, estão associados a factores psicológicos indutores de “stress”.

Grande parte da componente de fadiga que surge como resposta ao “stress”, é psicológica, podendo estar associada a um síndrome de sobretreino, desencadeando um aumento da concentração de cortisol (Passelergue *et al.* 1999).

2.3.1 – Exercício Físico e Cortisol na actividade intensa e de curta duração.

Antes de iniciar a abordagem deste sub – capítulo, será importante explicar a pertinência do mesmo. Este, surge como uma aproximação ao tipo de exercício desenvolvido no nosso estudo, onde referimos as investigações que melhor se enquadram no mesmo.

Hoofman *et al.* (1997), conduziram um estudo, constituído por uma amostra de 8 homens activos, que consistia na realização de 2 séries de 5 repetições de 15s, do teste

de Wingate, com um período de recuperação activa entre repetições de 30s, e com uma recuperação passiva entre séries de 60 minutos.

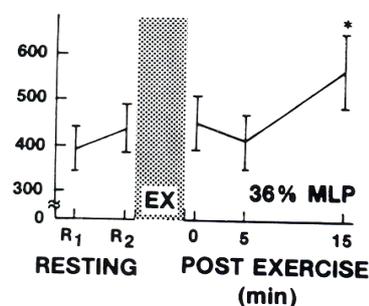
Os autores puderam verificar, que houve um decréscimo significativo da concentração de cortisol, entre o período pré – exercício, e imediatamente após. No entanto, do período imediatamente após para os 15min depois do exercício houve um aumento da concentração de cortisol, mantendo-se constante até 45min após a conclusão do teste.

Segundo Elias *et al.* (1991), uma elevação na concentração de cortisol, é geralmente vista imediatamente após um exercício de longa duração (mais de 10 minutos), e com alta intensidade.

Durante um exercício intenso de curta duração (2 minutos), constatou-se que as concentrações de cortisol não aumentam imediatamente após o exercício, mas sim 15 minutos após o término do mesmo (Buono *et al.* 1986).

A investigação conduzida por Kraemer *et al.* (1989), suporta e apoia os resultados obtidos por Buono *et al.* (1986). Assim, estes autores desenvolveram um estudo, com dez indivíduos activos, em que o objectivo era saber, qual a resposta do cortisol, a um exercício de curta duração e alta intensidade. Para tal, utilizou um protocolo de exercícios máximos, com quatro intensidades diferentes (36%; 55%; 73% e 100% da potência máxima da perna). Foram feitas recolhas plasmáticas, antes do teste e 5 minutos após cada teste, até perfazer um total de 15 minutos pós teste.

Figura II.2 – Valores do Cortisol nos períodos antes do teste, no momento do teste, e a cada 5 minutos de teste, até perfazer 15 minutos, com uma intensidade de 36% da potência máxima da perna. Adaptado de Kraemer *et al.* (1989).

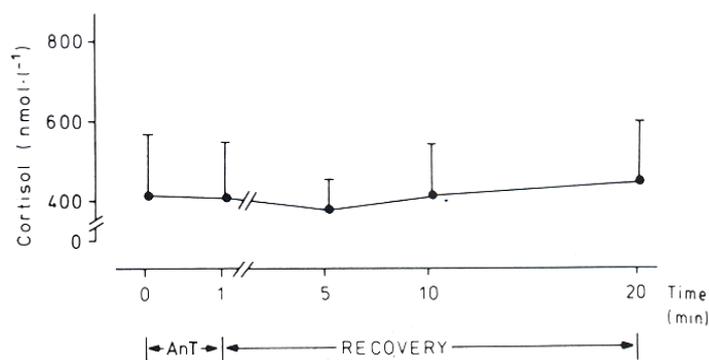


O único aumento significativo dos valores de cortisol, foi observado aos 15min do período pós – exercício, e com uma intensidade de 36% da potência máxima da perna. (Figura II.2)

Nas restantes intensidades estudadas, não se registaram alterações significativas nas concentrações de cortisol, do período de repouso, para os períodos após o teste.

Um trabalho publicado, e desenvolvido por Schwarz e Kinderman (1990), concorda com alguns estudos anteriormente citados. Assim, estes investigadores, concluíram que num esforço anaeróbio, com a duração de 1 minuto, não houveram alterações significativas nos níveis de cortisol, no período pós teste (Fig II.3).

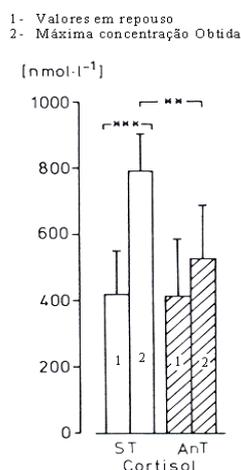
Figura II.3 – Comportamento do Cortisol num esforço anaeróbio com a duração de 1min. Adaptada de Schwarz e Kinderman (1990).



No mesmo estudo, os autores abordaram outro tipo de exercício, caracterizado por um aumento gradual da intensidade, e com uma maior duração (21 minutos). Os resultados obtidos, permitiram concluir que houve um aumento significativo dos valores de cortisol, no período pós exercício.

Comparando o comportamento do cortisol, nos dois tipos de exercício estudados, concluíram que os valores basais desta hormona são idênticos nos dois tipos de exercício, mas o valor máximo alcançado é significativamente diferente.

Figura II.4 – Comportamento do Cortisol num esforço anaeróbio com a duração de 1min, e noutro tipo de exercício com um aumento gradual da intensidade e com uma maior duração. Adaptada de Schwarz e Kinderman (1990).



Segundo Hoofman *et al.* (1997), a resposta ao cortisol, poderá estar mais dependente da duração, e menos da intensidade do exercício. Estes, num dos estudos anteriormente citados, defendem, que a repetição de períodos de exercício de curta duração, e alta intensidade, não desencadeiam diferenças significativas nas respostas do cortisol.

2.4 – Exercício Físico e Testosterona

Neste capítulo, as conclusões retiradas pelos diferentes autores são que após um determinado tipo de exercício, as concentrações de testosterona diminuem, ou em alguns casos não se encontram diferenças significativas entre os períodos antes, e pós teste. No entanto, e para melhor fundamentar esta revisão, é importante analisar todo o conteúdo deste capítulo, relativamente à metodologia adoptada e às conclusões retiradas pelos diferentes autores.

Trabalhos publicados por Fry *et al.* (1991) e Flynn *et al.* (1994), propõem a testosterona como marcador de monitorização do stress induzido pelo treino. Segundo estes, esta avalia as respostas do treino sobre a recuperação, e, prediz a capacidade de desempenho do atleta.

Outros autores defendem que uma das formas de medir o “stress”, que o treino induz sobre os atletas, pode ser feita utilizando as concentrações de testosterona ao longo da época desportiva (Costill *et al.*, 1991). Estes, desenvolveram um estudo com dois grupos de nadadores, que aqui denominamos de G1 e G2, ao longo de 25 semanas de treino. Entre as semanas 0 - 4 e 10 – 25, foi usado o mesmo programa de treino para os dois grupos de controlo. Entre as semanas 5 – 10, o grupo G1 treinava duas vezes por dia, e o grupo G2 somente uma vez por dia. Os autores do estudo concluíram que a concentração de testosterona diminuiu como consequência directa do treino, não havendo no entanto diferenças nas concentrações desta, nos dois grupos estudados.

Opiniões semelhantes têm Tyndall *et al.* (1996), que ao longo de 18 semanas de treino, verificaram que as concentrações de testosterona diminuíram, em consequência do aumento do volume de treino. Neste estudo, ao longo das 9 primeiras semanas, os nadadores nadavam cerca de 5.500m, aumentando para 8.300m/ dia a partir da 9ª semana.

Bonifazi *et al.* (1995), sustentam que, após um esforço intenso e prolongado, já citado anteriormente por via da análise do comportamento do cortisol, os valores da testosterona diminuem ao longo do período de recuperação (medição realizada uma hora após a conclusão do teste). Num estudo desenvolvido com oito nadadores de topo, estes autores verificaram e concluíram que há um aumento da concentração de testosterona logo após a realização do exercício, e uma diminuição após o período de recuperação. Estes resultados foram reportados depois da execução de exercícios intensos, e com uma duração superior a 90 minutos.

Tal como referimos relativamente ao cortisol, também aqui alguns trabalhos vão contra esta tendência no comportamento da concentração da testosterona .

Destacamos os resultados encontrados por, Mujika *et al.* (1996), que não encontraram diferenças na concentração de testosterona entre períodos de treino intenso e de redução da carga de treino (caracterizado por uma diminuição do volume).

2.4.1 – Exercício Físico e Testosterona na actividade intensa e de curta duração.

Numa aproximação à metodologia que irá ser adoptada por nós para a concretização deste estudo, efeito do exercício de curta duração e elevada intensidade, referimos e analisamos uma investigação desenvolvida por Hoffman *et al.* (1997). Esta investigação foi desenvolvida com a colaboração de 8 homens “activos”. O teste consistia na realização de duas séries de cinco repetições de 15s do teste de Wingate, com períodos de recuperação activa entre repetições de 30s, e entre séries, uma recuperação passiva de 60min. As amostras sanguíneas foram retiradas antes do exercício (1); imediatamente após (2); 15min após (3); 30min após (4); 45min após (5) e 60min após (6).

Os resultados obtidos indicam-nos que houve um aumento da concentração de testosterona desde (1), até (3). De (3) para (4), deu-se uma descida acentuada dos valores de testosterona, com uma descida lenta destes valores de (4) para (5). De (5) para (6), houve novamente uma ligeira subida dos valores de testosterona.

Com o objectivo de examinar as respostas de alguns parâmetros hormonais a exercícios de alta intensidade, Kraemer *et al.* (1991), constituiu dois grupos de controlo para a materialização da sua investigação. Assim, o grupo de controlo denominado de P1, teria de realizar entre três a cinco séries de cinco repetições máximas (80 a 95% de 1RM), em oito tipos de diferentes situações, com um período de recuperação entre séries de 3min. O grupo de controlo P2, executava três séries de dez repetições, novamente em oito tipos de situações diferentes, com uma intensidade localizada entre 70 a 85% de 1RM. O tempo de recuperação entre séries era de 1min.

Foram recolhidas amostras sanguíneas antes do teste (a); a meio do teste – aquando da passagem pela 4ª situação (b); logo após o teste (c); 5min após o teste (d); 15min após o teste (e); 30min após o teste (f) e 60min após o teste (g).

Na situação P1, caracterizada por uma grande intensidade e um período de recuperação assinalável, os valores da testosterona aumentaram desde (a) até (c). A partir de (c), e até (f), a concentração de testosterona diminuiu, aumentando ligeiramente de (f) para (g). Em P2, o comportamento da testosterona é muito diferente da situação P1. Assim, de (a) para (b), há uma subida significativa da sua concentração, de (b) para (c), uma

diminuição, havendo logo um aumento de (c) para (d). De (d) para (g), a concentração da testosterona diminuiu significativamente.

Segundo este autor, o aumento da concentração de testosterona é mediado pela acção da glândula pituitária testicular, pelo aumento das secreções testiculares, ou por alterações nos fluidos sanguíneos testiculares.

2.5 – Rácio Testosterona/ Cortisol

Antes de incidirmos a abordagem na temática aqui exposta, é importante referir que grande parte dos estudos aqui citados, são os mesmos referenciados nos pontos anteriores da nossa revisão. Muitos autores, no desenvolvimento dos seus estudos, abordam simultaneamente o comportamento da testosterona e do cortisol, e subsequentemente o rácio T/C.

Em grande parte dos estudos analisados, os autores fazem referência a dois conceitos, que de alguma forma estão inerentes à abordagem e ao cálculo do rácio.

Assim, o metabolismo é o conjunto de reacções bioquímicas, e pode ser dividido em termos conceptuais em anabolismo e catabolismo. A quebra de moléculas de grandes dimensões, em moléculas de pequenas dimensões, associada à libertação de energia, é designada de catabolismo. O fenómeno inverso designa-se de anabolismo. A degradação das proteínas em aminoácidos é um exemplo de catabolismo, enquanto que a formação de proteínas a partir dos aminoácidos é um processo anabólico. (Tavares *et al.* 2003).

Passelergue e Lac. (1999), num estudo desenvolvido com atletas de Wrestling, concluíram, que o rácio testosterona/ cortisol, reflecte estados de anabolismo quando se encontra alto, e estados de catabolismo quando está baixo. O mesmo autor, refere que os valores do rácio poderão ter diferentes interpretações: por um lado, a fadiga resultante do fenómeno de sobre-treino, associada a um diminuição do rácio, e por outro lado, a fadiga resultante de um esforço de curta duração, mas de grande intensidade, associada a um aumento do rácio.

Esta ideia é suportada por Hoffman *et al.* (1997) que, num estudo anteriormente citado com o teste de Wingate, concluiu que houve um aumento do rácio testosterona/ cortisol, do período pré – exercício, para o período logo após o exercício, havendo depois uma diminuição brusca dos seus níveis. Estes resultados, concordam o estudo anterior, visto estarmos a abordar um tipo de esforço caracterizado pela sua curta duração, e uma grande intensidade.

Estudos desenvolvidos, encontraram diversos factores que poderão alterar a performance dos indivíduos, tendo como base os valores do rácio, e consequentemente os valores do cortisol e da testosterona.

Assim, Mujika *et al.* (1996), conclui que um aumento do rácio T/C, está positivamente correlacionado com o aumento da performance de nado. Este estudo, de uma forma indirecta é patrocinado, por Bonifazi *et al.* (1995), que na sua investigação observou uma diminuição na concentração de cortisol, em que a testosterona não sofreu alterações, contribuindo para um aumento do rácio, e um aumento da performance dos atletas.

O mesmo autor, constatou que os níveis de cortisol não se modificaram significativamente ao longo da época, tanto nos períodos de mid – season, como no pré e pós período de redução da carga de treino, mas a testosterona diminui aquando do treino intensivo, contribuindo para uma diminuição do rácio. No entanto, durante as 2 semanas de treino regular e de redução das cargas de treino, os valores da testosterona aumentaram, aumentando o rácio, e a performance dos indivíduos.

No entanto, Tanaka *et al.* (1993), constatou que o rácio não é influenciado por alterações no volume e na intensidade de treino, indo contra aquilo que Mujika *et al.* (1996); e Bonifazi *et al.* (1995), constataram.

Na mesma directiva do trabalho de Tanaka *et al.* (1993), vai Houmard *et al.* (1990). Neste estudo foi introduzida uma redução no volume de treino, de cerca de 70%, bem como da sua frequência (17%), ao longo de 3 semanas, em corredores de atletismo. Verificou-se que não houveram alterações nos níveis do rácio. Um factor que poderá contribuir para que os níveis de testosterona se mantenham baixos, é o facto de o

cortisol se manter elevado. Cumming *et al.* (1983), citado por Houmard *et al.* (1990), observou uma supressão dos níveis de testosterona, quando os níveis de cortisol são elevados. Os resultados deste estudo sugerem, que os baixos valores de concentração da testosterona, poderão estar associados aos elevados níveis de cortisol durante os períodos de treino normal, e de carga reduzida. (Houmard *et al.* 1990).

2.6 – Teste de Wingate

O teste de Wingate (WanT) é o teste anaeróbio mais popular e mais utilizado em todo o mundo. Inbar *et al.* (1996), desenvolveram este teste para estimular o interesse pela capacidade anaeróbia, como componente da aptidão física, avaliando as capacidades anaeróbias de curta e média duração.

Este teste cifra-se na realização de um esforço supramáximo de 30 segundos em cicloergómetro de marca Monark, com uma carga constante (resistência) proporcional à massa corporal do indivíduo. O valor da resistência a aplicar durante o teste é de 0,075kg. Kg⁻¹ da massa corporal do sujeito. Esta força mantém-se constante ao longo do teste mas, como é tão elevada, o sujeito não consegue manter a velocidade inicial por um período superior a alguns segundos (Does., 2005). No entanto, este valor tem sido alvo de acesas discussões e controvérsias. Segundo Armstrong *et al.* (1997), este valor não permite otimizar a performance em adultos.

A determinação do valor adequado da resistência externa a aplicar, é um aspecto de extrema importância, mas de difícil cálculo e aplicação, uma vez que a potência resulta do produto da força pela velocidade. Os valores máximos da potência máxima e da capacidade anaeróbia só são realmente alcançados consoante a aplicação da resistência óptima (valor mais elevado possível da potência anaeróbia).

O ideal seria que a força óptima fosse determinada de acordo com a massa muscular dos membros requisitados na realização do teste, porém, tal sugestão é impraticável, sendo por isso normalmente utilizada a massa corporal.

Este teste está incluído na categoria dos testes de curta duração, permitindo a determinação da maior potência mecânica máxima alcançada durante o teste (“*peak*

power”) que ocorre normalmente durante os primeiros 3 – 5 segundos; a capacidade anaeróbia (“*mean power*”) que é a potência média suportada ao longo dos 30s; o trabalho total (produto do número de rotações por minuto pela força de resistência – carga durante o teste) e o índice de fadiga (“*rate of fatigue*”) que é calculado através da taxa de decréscimo que ocorre entre o ponto de PAnM e o fim do teste.

Segundo Green (1994), citado por Chia (2000), a potência anaeróbia traduz a taxa máxima à qual o ATP é sintetizado pelo metabolismo anaeróbio e por todo o organismo durante um tipo específico de exercício máximo de curta duração. A capacidade anaeróbia por sua vez, traduz a “quantidade máxima de ATP sintetizada pelo metabolismo anaeróbio, por todo o organismo durante um tipo específico de exercício máximo de curta duração. Assim, a potência reflecte a energia máxima gerada pelo sistema por unidade de tempo, durante um exercício de máxima intensidade, enquanto que a capacidade é a energia total cedida pelo sistema para a realização de qualquer actividade máxima.

Bouchard *et al.* (1991) suporta que a capacidade anaeróbia pode ser avaliada através de três componentes, consoante a duração do exercício máximo. Assim, temos a capacidade anaeróbia de curta duração, a capacidade anaeróbia de média duração, em que os exercícios máximos utilizados têm uma duração até 30 segundos, e a capacidade anaeróbia de longa duração.

O protocolo deste teste engloba um pequeno aquecimento de 3 minutos, logo seguido de 1 minuto de recuperação passiva (sentado na bicicleta ergométrica). Este deverá ser realizado a uma intensidade moderada, elevando os batimentos cardíacos para 150 – 160 batimentos por minuto (bpm). De seguida, e ao longo de 30s, serão calculados todos os índices já referidos anteriormente. No final do teste, os sujeitos continuam a pedalar a uma intensidade moderada, e durante um período de tempo que o sujeito ache necessário.

Em termos fisiológicos este teste depende essencialmente da actividade simultânea dos sistemas de metabolismo anaeróbio (Adams, 1998). No entanto, o metabolismo aeróbio durante a execução do teste não deixa de ser significativo (Inbar *et al.*, 1996).

Segundo Does (2005), este teste poderá informar atletas e treinadores acerca do desempenho muscular dos atletas, bem como da população em geral. Poderá ser utilizado como um meio de aferir se o planeamento que foi adoptado está a ser o mais adequado, e possibilitar possíveis reajustamentos no mesmo.

Inbar et al. (1996), desenvolveram um estudo, utilizando uma amostra constituída por atletas de diversas modalidades, dividindo-os entre as mesmas, e comparando os resultados obtidos entre modalidades. O que se constatou, e relativamente aos nadadores, foi que estes apresentaram uma potência média relativa de aproximadamente 9 W.kg^{-1} , e uma potência máxima relativa de $11,3 \text{ W.kg}^{-1}$.

CAPÍTULO III

METODOLOGIA

Toda a metodologia desenvolvida nesta investigação, vai ser aqui descrita por nós, para uma melhor compreensão de todo este processo. Neste capítulo, faremos uma caracterização de todos os passos desenvolvidos ao longo da nossa investigação. Para tal, faremos uma caracterização da amostra, uma análise a todos os procedimentos efectuados, o enquadramento temporal, a descrição do teste utilizado, os diferentes procedimentos inerente à recolha das salivas e do sangue, bem como dos procedimentos laboratoriais e estatísticos.

3.1 – Caracterização da Amostra

A amostra deste estudo é constituída por 12 atletas do sexo masculino, praticantes de Natação Pura Desportiva (N.P.D) de elevado nível competitivo.

Todos os procedimentos efectuados na recolha destas medidas antropométricas, para caracterização da amostra estão de acordo com Sobral e Silva (1997).

Foram retiradas as seguintes medidas antropométricas: estatura, peso e envergadura, bem como o somatório de 6 pregas subcutâneas (tricipital, subescapular, suprailíaca, abdominal, crural e geminal).. O índice de massa corporal e a idade cronológica (decimal) dos atletas também foram calculados, bem como todos os dados referentes ao regime de treino de cada um e do seu valor competitivo determinada segundo a sua prestação de acordo, com a melhor marca desportiva (pontos IPS - International Point Score).

Foram utilizados os seguintes instrumentos para a caracterização antropométrica dos indivíduos: fita métrica, balança, adipómetro e ficha de registo de todos os dados retirados.

Tabela III.1 Mínimos, máximos, médias e desvios padrão da **Idade Decimal**, dos **anos de treino**, do **volume de nado por ano** e das **provas mais pontuadas**.

* Pontuação calculada com base no “*International Point Score SC 2004*”

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Idade Decimal	15,33	18,64	17,03	0,89
Anos de Treino (anos)	5	9	7,08	1,16
Volume de nado/ ano (Km)	1400	1500	1450	70,71
Provas mais pontuadas*	585	760	674,08	51,47

De acordo com esta tabela, a média da idade decimal dos atletas, é de 17 anos, em que o atleta mais velho tem 18 anos, e o mais novo 15 anos. Como o desvio padrão apresenta um valor muito baixo, podemos considerar que a nossa amostra é muito homogênea, no que concerne à sua idade cronológica. Como se pretendia, a experiência da nossa amostra é significativa o valor médio de anos de treino é de 7 anos, e o volume de nado médio anual é de 1450 km.

Tabela III.2 Mínimos, máximos, médias e desvios padrões da **Massa Corporal**, da **altura**, da **altura sentado** da **envergadura** e do **somatório das Pregas** (somatório das 6 pregas corporais).

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Massa Corporal (Kg)	55,2	79,6	66,5	7,2
Altura (cm)	164,5	191,6	177,11	7,17
Altura Sentado (cm)	84	95,1	90,87	3,20
Envergadura (cm)	171	194	182,17	8,54
Somatório das Pregas (mm)	32	69	47,25	10,36

Como podemos aferir da análise da tabela III.2, a média da massa corporal da nossa amostra encontra-se nos 66,5kg, com um desvio padrão de 7,17Kg. A média da altura é de 177,11cm com um desvio padrão de 7,17cm. Comparando estes valores com os da média dos nadadores a nível nacional (77,4kg e 183,8cm) observamos que a nossa amostra tem valores de massa corporal e de altura mais baixos. (Sobral e Silva, 1997)

3.2 – Procedimentos

Antes da recolha dos dados, os atletas foram devidamente informados sobre todos os procedimentos a que iriam ser submetidos. Para tal, foi entregue a todos os atletas um termo de consentimento, que deveria ser assinado pelos próprios, ou pelos pais (caso os atletas fossem menores de idade), para aceitar ou autorizar a participação neste estudo.

Foram dadas indicações aos atletas para que não ingerissem alimentos, mastigassem pastilhas ou rebuçados, e para não escovarem os dentes num período de 30 – 40min antes do teste.

3.3 – Enquadramento Temporal

Quanto à aplicação do teste de Wingate, cada individuo foi avaliado individualmente entre as 16:30 e as 18:00h para eliminar a influência das variáveis circadianas.

3.4 – Teste de Wingate

3.4.1 – Equipamentos utilizados

O teste de Wingate foi realizado num cicloergómetro Monark 824E, que se encontrava ligado a um sensor fotoelétrico com ligação a um computador.

Antes de se realizar qualquer teste, o cicloergómetro foi verificado, de modo a certificarmos que tudo estava dentro dos parâmetros necessários.

3.4.1.1 – Calibração do Aparelho

Antes da realização de cada teste procedemos à verificação da posição da fita de tensão de resistência: deve estar colocada na superfície de contacto da roda. De seguida, procedeu-se à calibração do cesto, em que se colocava 4kg no cesto, girando se seguida a roda com a mão. Com este movimento, o cesto deveria elevar-se a partir da posição estática entre 3 a 8cm (valores recomendados nas instruções do fabricante). Caso

contrário, o comprimento da corda deveria ser ajustado aumentando ou diminuindo, consoante o caso.

3.4.2 – Altura do Selim

A altura do selim foi ajustada para cada sujeito, de modo a que o joelho ficasse ligeiramente flectido, quando o pedal se encontrasse na parte mais baixa da sua trajectória.

3.4.3 – Correias de Fixação

Foram utilizadas correias para fixar os pés do sujeito ao pedal.

3.4.4 – Aquecimento

O aquecimento consistia na realização de 4min a pedalar, a 60rpm num cicloérgometro (Monark), intercalado com três sprints máximos no final do 1º, 2º e 3º min, com uma duração de 2 a 3 segundos cada, contra uma resistência de 0,075kg. Kg⁻¹ da massa corporal. Todos os sprints são precedidos de uma contagem decrescente “3, 2, 1, Vai”. A expressão “Vai”, marca o início do sprint. No final deste aquecimento de 4min, foi pedido aos atletas que executassem alguns exercícios de alongamentos pré – definidos envolvendo os músculos quadricipital, isquiotibiais e adutores. Posteriormente, foi pedido ao atleta que regressasse ao cicloérgometro para se dar início ao teste.

3.4.5 – Realização do Teste propriamente dito

A todos os sujeitos foram dadas instruções estandardizadas para pedalarm o mais rápido possível desde o início do teste, e para manterem a velocidade máxima ao longo do período de 30s. Com o comando “partida”, os sujeitos pedalavam o mais rápido possível com uma aplicação de força constante que foi equivalente a 0,075Kg. Kg⁻¹ da massa corporal.

Quinze segundos antes do início do teste, o cesto foi levantado para reduzir a tensão da corda na roda da bicicleta sendo o sujeito solicitado a pedalar a um ritmo constante

(60rpm) contra uma resistência mínima. Alcançado esse objectivo, foi dado o sinal ao sujeito para se preparar. No momento em que se proferiu “Vai”, o sujeito iniciou o exercício e foi nesse momento que se libertou o cesto da roda da bicicleta. O sujeito inicia o exercício afim de alcançar o pico de velocidade o mais rápido possível. Durante o sprint, o sujeito foi incentivado veemente a pedalar o mais rápido possível, com o intuito de atingir o pico de velocidade, durante todo o teste (30s), não devendo levantar-se do selim, pois tal comportamento poderia influenciar os resultados.

Após a realização do teste, os sujeitos pedalarão durante alguns minutos sem resistência, facilitando a recuperação.

3.4.6 – Variáveis Obtidas

A realização deste teste permite determinar o valor máximo de potência alcançado pelo sujeito (PAnM), a capacidade anaeróbia (CA), o tempo em que a PAnM é atingida, o índice de fadiga e o trabalho mecânico total realizado no teste. A potência anaeróbia máxima (PAnM) é considerada como a potência mecânica mais elevada conseguida aproximadamente nos primeiros 5 a 8 segundos do teste, e que traduz a capacidade que o sujeito tem de produzir a maior quantidade de trabalho possível no menor tempo. A Capacidade anaeróbia (CA) é a potência media calculada durante o período de 30s. O índice de fadiga (IF) reflecte o decréscimo do valor da potência ao longo do teste, sendo expresso em valor percentual. Concluindo, o trabalho total é o trabalho desenvolvido pelo sujeito na realização do teste.

No final do teste foi registada a frequência cardíaca e efectuada a colheita de uma microamostra de sangue, para determinação do lactato.

3.5 – Recolha da Saliva

Os níveis de cortisol e testosterona foram recolhidos em seis momentos diferentes, de acordo com a tabela (**tabela III.3**).

Além disto, foi-lhes entregue o protocolo de salivacão (ver anexo) de forma a garantir a fidelidade das amostras. A saliva foi recolhida para uma salivete SARSTEDT[®], que é um tubo próprio para o efeito, com um rolo de algodão no seu interior.

Tabela III.3. Protocolo dos diferentes momentos de recolha da saliva

Identificação do Momento	Descrição do Momento
1	Antes do Aquecimento
2	15m após o teste
3	1h 30m após o teste
4	2h 30m após o teste
5	Manhã seguinte ao acordar
6	24h depois do teste (antes do treino)

3.6 – Recolha da Microamostra para a determinação do lactato

A colheita da microamostra de sangue para a determinação sérica do lactato foi realizada ao 3º minuto após o término do teste. Como instrumento de determinação recorremos ao Sport Tests, que usa um método amperimétrico com uma enzima eléctrodo. Automaticamente aspira uma amostra de 50ul e analisa os níveis de lactato em 60 segundos.

A escolha do terceiro minuto pós – exercício máximo de curta duração, concorda com estudos que demonstram ser necessário aguardar algum tempo, para que ocorra a difusão do lactato produzido no tecido muscular funcionante.

3.7 – Procedimentos Laboratoriais

Todos os procedimentos laboratoriais encetados para a análise dos valores da concentração do cortisol e da testosterona, estão aqui bem referenciados, e seguem uma sequência lógica de realização (Consultar Anexo).

O método utilizado foi um ELISA competitivo (Salimetrics, USA).

Assim, relativamente à análise laboratorial da concentração de cortisol, foram seguidos os seguintes procedimentos:

1. Descongelação das amostras de saliva.
2. Mistura das amostras, realizadas no *Minishaker Modelo MS 2 Ika*, na rotação máxima (Fig. III.1).

Figura III.1 – Minishaker Modelo MS 2 Ika



3. Centrifugação, durante 10 minutos, à temperatura de 4°C, a uma rotação de 3000rpm na *Labofuge 400 R Heraeus*.
4. Colocação das amostras ordenadamente para uma posterior análise (fig. III.2).

Figura III.2 – Amostras colocadas ordenadamente para uma posterior análise



5. Realização da grelha de controlo relativamente aos:
 - a) Standards

- b) Zeros
 - c) NSB (poços azuis, que não possuíam anticorpos)
 - d) 1 control H (concentração elevada) e um control L (concentração baixa)
 - e) Amostras e os momentos.
6. Pipetação de 25 microlitros de standards, zeros, e amostras para os poços.
 7. Preparação de 24 mililitros da solução diluente, juntamente com 15 microlitros de cortisol conjugado com enzima – “horseradish peroxidase” (Fig. III.3).

Figura III.3 – Preparação da solução diluente



8. Colocação de 200 microlitros da solução anterior em cada poço, com uma pipeta *Multichanel “Eppendorf Research”* com 8 pontas (com uma capacidade de 30 a 300 microlitros).
9. Preparação da solução de lavagem, PSB (Wash Buffer Concentrate 10x, que contém albumina) + 1000ml de água pura.
10. Seguidamente bateram-se os poços para se retirar as substâncias que poderiam possuir em excesso, como por exemplo, bolhas de ar.
11. Lavagem dos poços 4 vezes, com a solução de lavagem.
12. Colocação de 200 microlitros de substrato tetrametilbezidina nos poços. De seguida colocam-se os poços num local totalmente escuro durante 30 minutos (sem luz, já que esta degrada o substrato e a quantidade diminui, não reagindo tão bem com as amostras).
13. Após esses 30 minutos, colocam-se 50 microlitros da STOP solution (10 minutos a dissolver em água ultra-pura) em cada poço.

14. Por último, coloca-se no aparelho *Leitor de Elisa ELx 800 (Universal Microplate Reader, Bio-tek instruments)* para determinar a densidade óptica das amostras. (Fig. III.4).

Figura III.4 – Leitor de Elisa ELx 800 (Universal Microplate Reader, Bio – tek instruments).



Relativamente à análise laboratorial da concentração de testosterona, foram realizados os seguintes procedimentos:

1. Realização da grelha de controlo com o número de amostras;
2. Diluição em série (150 microlitros no 1º tubo, 100 microlitros no 2º, 100 microlitros no 3º tubo e assim sucessivamente);
3. Passagem do standard pela salivete, deixando esta a absorver e depois centrifugar durante 15 minutos na *Labofuge 400 R Heraeus*;
4. Pipetação de 50 microlitros de standards e amostras para os poços;
5. Preparação de 18 mililitros de solução diluente, juntamente com 7 microlitros de testosterona conjugada com enzima;
6. Colocação em cada poço de 150 microlitros da solução conjugada anterior;
7. Deixar os poços repousar durante uma hora sobre o agitador de placas, a uma rotação de 500 por minuto.
8. Lavagem por 4 vezes dos poços, com a solução de lavagem (50 mililitros de Wash Buffer Concentrate em 500 mililitros de água ultra-pura) (Fig. III.5).

Figura III.5 – Lavagem dos poços com solução de lavagem.



9. Colocação do substrato tetrametilbezidina nos poços e posteriormente leva-se a amostra durante 5 minutos, ao agitador de placas ficando esta posteriormente num local escuro durante 30 minutos.
10. Após estes 30 minutos, coloca-se 50 microlitros da STOP solution em cada poço.
11. Seguidamente vai durante 3 minutos ao agitador de placas.
12. Por último, coloca-se no aparelho *Leitor de Elisa* para determinar a densidade óptica das amostras.

3.8 – Procedimentos Estatísticos

Para tratamento e análise dos dados foi utilizado o programa estatístico “Statistical Package for Social Sciences – SPSS”, versão 12.0 para Windows.

Foi utilizada a estatística descritiva na caracterização da amostra e nos dados obtidos durante o teste. Para tal, foi usada a média aritmética, como medida de tendência central, e três medidas de dispersão (desvio padrão, mínimos e máximos).

Dada a dimensão da amostra e uma vez que algumas das variáveis não respeitavam um padrão de normalidade na distribuição, padrão esse testado através dos valores da curtose e do achatamento, foi usado para análise dos valores de cortisol, testosterona e rácio Testosterona/ Cortisol nos seis momentos, o teste de Wilcoxon, um método estatístico não paramétrico, que é utilizado para a comparação dos valores médios em amostras relacionadas com um grau de significância de $p < 0,05$.

CAPÍTULO IV

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

O presente capítulo irá incluir todos os resultados por nós obtidos ao longo deste estudo. Todo o procedimento deste capítulo segue uma ordem lógica de execução. Assim, numa primeira fase serão apresentados os resultados obtidos no protocolo utilizado - teste de Wingate, no que diz respeito à potência máxima, potência mínima, potência média e índice de fadiga. De seguida, apresentaremos os resultados dos parâmetros fisiológicos da frequência cardíaca e dos níveis de lactato sanguíneo, obtidos ao longo do teste. Numa última parte, faremos uma análise descritiva dos parâmetros hormonais, no que toca às concentrações de cortisol e testosterona, e do rácio T/C nos diferentes momentos da nossa investigação.

4.1 - Teste de Wingate

Tabela IV.1 Valores mínimos, máximos, médias e desvios padrão da **potência mínima**, da **potência máxima**, da **potência máxima relativa**, da **potência média**, da **potência média relativa** e do **índice de fadiga**.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Potência Mínima (W)	390,00	586,00	481,00	62,26
Potência Máxima (W)	527,00	859,00	656,08	96,98
Potência Máxima Relativa (W.kg⁻¹)	8,77	11,18	9,73	0,75
Potência Média (W)	458,00	715,00	569,67	77,08
Potência Média Relativa (W.kg⁻¹)	7,3	9,67	8,46	0,62
Índice Fadiga (%)	18,50	35,50	26,41	4,80

De acordo com os dados apresentados na tabela IV.1, verificamos que a potência média obtida pela nossa amostra no teste de Wingate foi de $569,67 \pm 77,08$ W. Como valor de potência máxima registamos 859W. Relativamente à potência mínima e ao índice de fadiga, no que concerne aos seus valores médios, pudemos auferir respectivamente $26,41 \pm 4,80\%$ e $481 \pm 62,26$ W. Para a potência máxima relativa, obtivemos como valor médio $9,73 \pm 0,75$ W.kg⁻¹, enquanto que na potência média relativa o resultado médio foi de $8,46 \pm 0,62$ W.kg⁻¹.

4.2 - Parâmetros Fisiológicos

Tabela IV.2 Valores mínimos, máximos, médias e desvios padrão da **frequência cardíaca** e do **lactato**.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
FC (bpm)	151	183	165	10
Lactato (mmol⁻¹)	6,20	12,70	10,01	2,01

A tabela IV.2 apresenta de uma forma muito simples os valores correspondentes aos parâmetros fisiológicos. Nesta, pode observar-se que o valor mínimo e máximo de lactato, medidos logo após o esforço foram respectivamente 6,20 e 12,70 mmol⁻¹, enquanto que o valor médio foi de 10,01 mmol⁻¹.

Relativamente à frequência cardíaca, ao longo do teste os valores mínimos e máximos obtidos foram respectivamente 151 e 183 bpm, com um valor médio de 165 bpm.

Apesar da intensidade elevada, a duração reduzida dos testes implica, que os valores destes parâmetros não sejam de maior expressão.

4.3 - Parâmetros Hormonais

Tabela IV.3 Valores Mínimos, máximos, médias e desvios padrão da **Concentração de Cortisol Salivar** (pg.ml⁻¹).

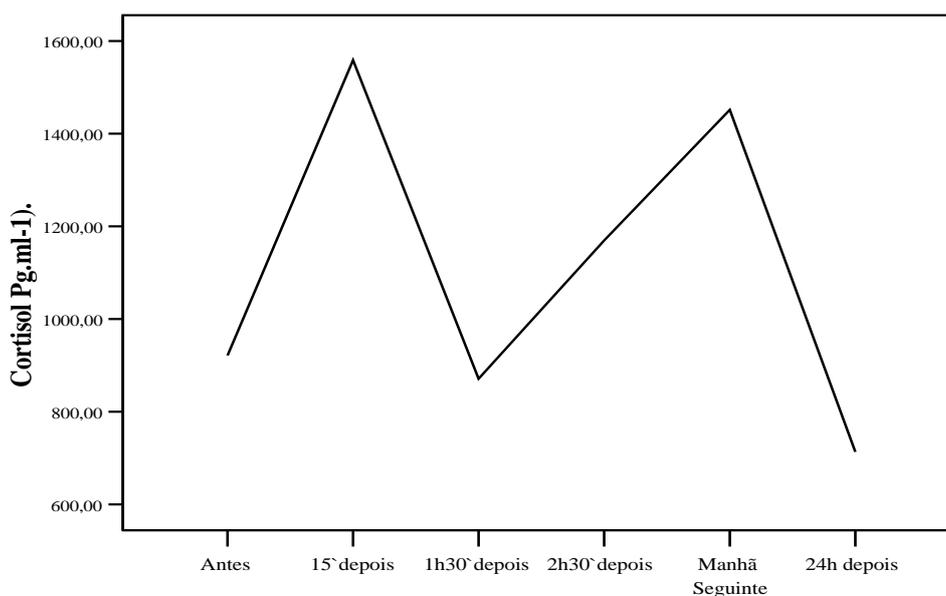
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Momento 1	20,71	3583,88	921,49	1126,14
Momento 2	42,76	6121,27	1558,59	2002,42
Momento 3	19,25	6032,55	871,11	1664,66
Momento 4	3,96	5830,51	1169,57	2023,90
Momento 5	0,00	6879,65	1451,49	2316,41
Momento 6	18,16	3710,00	713,40	1029,88

Na tabela IV.3 é possível observar o comportamento da concentração de cortisol salivar, ao longo dos diferentes momentos do nosso estudo. Assim, pudemos constatar que foram nos momentos 2 (15`depois), 5 (manhã seguinte) e 4 (2h30`depois) que se obtiveram as maiores concentrações de cortisol salivar. Os resultados foram respectivamente 1558,59±2002,42; 1451,49± 2316,41; 1169,57±2023,90 pg.ml⁻¹.

Os valores aqui apresentados revelam uma grande dispersão nos resultados obtidos neste estudo.

O gráfico IV.1 apresenta de uma forma mais clara, a variação média da concentração de cortisol, ao longo das 24 horas do estudo.

Gráfico IV.1 Variação média da Concentração do Cortisol ao longo dos diferentes momentos do estudo.



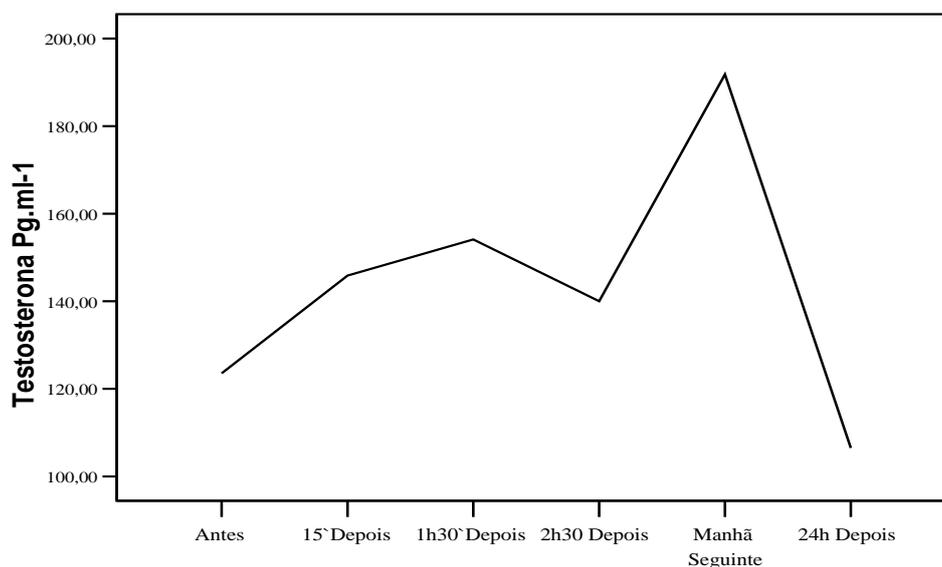
Imediatamente após o teste (15`depois), verifica-se um aumento acentuado da concentração média de cortisol, seguida de uma diminuição registada uma hora e meia depois do teste, atingindo aqui valor inferior aquele que se verificava antes do teste. Do momento 3 para a manhã do dia seguinte há uma subida acentuada da concentração de cortisol, no entanto, esta é menos significativa do que aquela que se verificou do momento 1 para o momento logo após o exercício. Da manhã do dia seguinte para as 24 horas após o teste, constatamos que houve uma diminuição muito acentuada da concentração de cortisol, atingindo os valores mais baixos até então.

Tabela IV.4 Valores mínimos, máximos, médias e desvios padrão da **Concentração de Testosterona Salivar** (pg.ml^{-1}).

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Momento 1	68,62	206,77	123,53	41,07
Momento 2	88,83	215,02	145,85	35,74
Momento 3	101,47	255,39	154,11	48,93
Momento 4	90,94	176,82	140,02	31,10
Momento 5	139,77	300,99	191,80	41,84
Momento 6	36,71	201,87	106,50	40,35

O comportamento da testosterona ao longo de 24 horas de estudo, está bem patente na tabela IV.4. Pudemos verificar que os valores médios de testosterona são muito semelhantes entre si. No entanto, o momento 5 (manhã seguinte), foi aquele onde a concentração de testosterona atingiu o maior valor médio. Pelo contrário, verificamos que 24 horas depois, a concentração de testosterona era a que apresentava valores médios mais baixos.

Gráfico IV.2 Variação média da Concentração da Testosterona ao longo dos diferentes momentos do estudo.



O gráfico IV.2, mostra o comportamento da concentração de testosterona ao longo das 24 horas do estudo. Verificamos que do momento 1 (antes do teste), até ao momento 3 (1h 30`depois) há um aumento lento da sua concentração média. No entanto, do momento 3 para o momento 4, há uma diminuição do seu valor, voltando a aumentar na

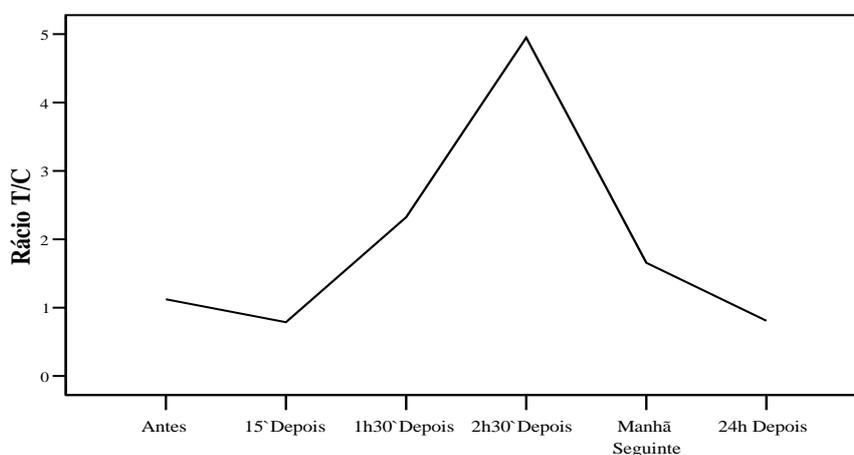
manhã do dia seguinte, onde atinge o valor médio mais elevado deste estudo. 24 horas após o teste, há uma diminuição brusca destes valores, atingindo uma concentração final, inferior aos valores basais da testosterona.

Tabela IV.5 Valores mínimos, máximos, médias e desvios padrão do Rácio Testosterona/ Cortisol.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Momento 1	0,04	7,71	1,04	2,19
Momento 2	0,02	4,04	0,88	1,21
Momento 3	0,04	11,26	2,15	3,69
Momento 4	0,02	32,92	4,54	9,25
Momento 5	0,02	9,39	1,66	2,76
Momento 6	0,05	5,31	0,98	1,60

A tabela IV.5 mostra o comportamento do rácio Testosterona/ Cortisol, ao longo das 24 horas do estudo. Verifica-se que os valores médios mais elevados deste parâmetro, foram atingidos nos momentos 4 e 3 respectivamente $4,54 \pm 9,25$; $2,15 \pm 3,69$.

Gráfico IV.3 Variação média do Rácio Testosterona/ Cortisol ao longo dos diferentes momentos do estudo.



No que concerne ao comportamento do rácio T/C, observa-se que desde o período antes, para o período imediatamente após, há uma diminuição pouco significativa. No entanto, a partir deste momento, e até às duas horas e trinta minutos depois do teste, há um aumento acentuado do valor do rácio. Deste período, e até à manhã seguinte, os valores médios do rácio diminuem muito significativamente, continuando a descer até ao período de 24 horas após o teste, só que de forma menos acentuada.

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Importa agora, analisar os resultados obtidos e confrontá-los com estudos realizados e citados por nós na revisão da literatura.

Na discussão dos resultados, optamos por confrontar inicialmente os resultados obtidos no teste de Wingate, de seguida faremos uma pequena reflexão acerca dos aspectos fisiológicos, e por fim, centraremos a nossa análise nos parâmetros hormonais, que constituem o núcleo principal do nosso estudo.

5.1 – Discussão dos resultados relativos ao Teste de Wingate

Apesar de se constatar uma variação média evidente nos parâmetros controlados achamos por bem mencionar, que não foram encontradas correlações estatisticamente significativas entre a Potência Máxima, a Potência Média, o Índice de Fadiga e os valores do Cortisol e da Testosterona, o que se compreende pela dimensão desta amostra, e pela variabilidade individual na resposta hormonal.

Para uma melhor discussão relativa a este ponto, iremos confrontar os resultados obtidos pela nossa amostra relativamente à potência máxima relativa, e à potência média relativa, com um estudo desenvolvido por Inbar *et al.* (1996).

Assim, relativamente à potência máxima relativa, obtivemos um valor de $9,73 \pm 0,75$ W.kg⁻¹, enquanto que na potência média relativa o resultado médio foi de $8,46 \pm 0,62$ W.kg⁻¹.

Estes resultados encontram-se de alguma forma dentro dos valores que Inbar *et al.* (1996) apresentaram. Na sua investigação, estes autores concluíram que os nadadores apresentaram uma potência média relativa de aproximadamente 9 W.kg⁻¹, e uma potência máxima relativa de $11,3$ W.kg⁻¹. Comparando os resultados obtidos nos dois estudos, verificamos a sua semelhança.

5.2 – Parâmetros Fisiológicos

Relativamente à frequência cardíaca (FC), ao longo do teste os valores mínimos e máximos obtidos foram respectivamente 151 e 183 bpm, com um valor médio de 165 ± 10 bpm.

Apesar da intensidade elevada, a duração reduzida dos testes (30s) implica, que a FC não atinja valores muito elevados.

O valor médio da lactatemia está de acordo com o tipo de exercício realizado

5.3 – Parâmetros Hormonais

5.3.1 – Variação do Comportamento do Cortisol Salivar

Tal como descrito na metodologia, dada a distribuição não normal de algumas variáveis, e a reduzida dimensão da amostra, utilizaremos o teste de Wilcoxon, na análise do comportamento deste parâmetro hormonal. Constatamos que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de cortisol obtidas nos diferentes momentos.

Posto isto, vamos centrar a nossa análise e discussão, nos valores médios obtidos, relativamente a esta hormona e no seu comportamento ao longo das 24 horas do nosso estudo.

A utilização do momento de recolha relativa aos 15min após o teste, é apoiada por alguns autores, e reflecte a elevação dos valores de cortisol, 15min após a realização do teste. Hoofman *et al.* (1997), verificou que houve um decréscimo significativo da concentração de cortisol entre o período pré – exercício e o imediatamente após. No entanto, também conferiu que há um aumento da concentração de cortisol desde o período imediatamente após, para os 15min depois do teste. Durante a realização de um exercício intenso e de curta duração, Bueno *et al.* (1986), comprovou que a concentração de cortisol não aumenta imediatamente após o exercício, mas sim 15min

após o desfecho deste. Kraemer *et al.* (1989), também concluiu que o único aumento significativo dos valores de cortisol, aconteceu aos 15min do período pós – exercício. Num estudo conduzido por Lac *et al.* (1997), a concentração de cortisol aumentou acentuadamente desde o período antes do teste, para os 15min após o teste. Estes autores sugerem que o facto de os valores de cortisol salivar aumentarem imediatamente após o exercício, poderão estar associados a factores psicológicos indutores de “stress”. Ainda relativamente a este estudo, constatou-se que os valores de cortisol salivar aumentaram significativamente após o teste, diminuindo um pouco até à 1h30min depois do teste, mas mantendo-se elevados em relação ao momento inicial. O aumento da temperatura corporal do indivíduo, associado a uma diminuição do seu pH, é a explicação dada por estes, para explicar as altas concentrações de cortisol atingidas, 10min após o teste.

Bonifazi *et al.* (1995) também constatou que a concentração de cortisol aumenta como resposta ao exercício, embora os seus valores diminuam 1h após o término deste, mantendo-se no entanto elevados em relação aos valores iniciais. No entanto, no nosso estudo verificamos que do momento 2 (15min após o teste), para o momento 3 (1h 30min após o teste), a concentração de cortisol diminui acentuadamente, atingindo valores inferiores aos evidenciados no momento 1 (antes do teste), indo de alguma forma contra aquilo que Lac *et al.* (1997) e Bonifazi *et al.* (1995) concluíram no seu estudo.

Pelo contrário, Schwarz e Kinderman (1990), utilizando um tipo de exercício anaeróbio com duração de 1min, constataram que não houveram alterações significativas nos níveis de cortisol durante o período pós – teste. No entanto, estes mesmos autores concluíram que o cortisol aumenta significativamente no período pós – exercício, quando se encontra sujeito a um tipo de exercício com uma duração superior.

Do momento 3 (1h 30min após o teste) para o momento 4 (2h30min após o teste), há novamente um aumento da concentração de cortisol. Do momento 4 para a manhã do dia seguinte (momento 5), a concentração de cortisol continua a aumentar. Da manhã do dia seguinte para o momento 6 (24h depois do teste), há uma diminuição da concentração de cortisol, atingindo um valor inferior aquele que se verificou no período antes do teste. Estas variações nas concentrações de cortisol, segundo Lac *et al.* (1997) e Hoogeveen e Zonderland (1996), são explicadas pelo ritmo circadiano desta hormona,

em que as taxas de secreção mais altas são atingidas de manhã cedo, que se encontram associadas ao acordar, e as mais baixas durante a tarde e à noite. Este efeito resulta de uma alteração cíclica de 24h nos sinais a partir do hipotálamo, que desencadeiam a secreção de cortisol.

5.3.2 – Variação do Comportamento da Testosterona Salivar

Ao comparar os resultados obtidos nos diferentes momentos de recolha, encontramos um aumento significativo da testosterona entre o momento 1 (antes do teste) e 15min após a realização do teste de Wingate ($Z=-2490$; $p=0,013$).

Estes resultados obtidos, vão de encontro aquilo que Bonifazi *et al.* (1995), relataram num estudo desenvolvido com oito nadadores de topo. Estes verificaram que a concentração de testosterona aumenta após a realização de um exercício intenso e com uma duração superior a 90min. Os valores aumentam desde o período antes do teste, até 1h após o término do mesmo. Hoofman *et al.* (1997), concluiu que após um exercício intenso e de curta duração (15s), a concentração de testosterona aumenta até aos 15min posteriores à execução do teste.

No entanto, Kraemer *et al.* (1991), contrariam os resultados que foram obtidos na nossa investigação. Estes verificaram que a concentração de testosterona aumenta somente até 5min após o teste. A partir desse momento, e até se perfazerem 60min após o teste, os valores da testosterona diminuem.

Apesar da concentração de testosterona do momento 1 (antes do teste), ser inferior aquela que se verificou nos momentos 3 (1h30min depois) e 4 (2h30min depois), não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes momentos. A explicação existente para este facto, localiza-se na grande dispersão de valores existentes no nosso estudo, no que concerne a estes momentos.

Relativamente ao nosso estudo, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre o momento prévio ao teste, e o valor correspondente à manhã seguinte ($Z= - 2,824$; $p= 0,005$). De alguma forma, esta elevada concentração pela

manhã, contrariam os resultados apresentados por Hakkinen e Pakarinen (1991). Segundo estes, os valores da testosterona à tarde são algumas vezes mais elevados, do que aqueles que são encontrados pela manhã.

As diferenças significativas existentes entre os diferentes momentos estudados, quando confrontados com o momento correspondente à manhã do dia seguinte, são bem explícitas da interferência que as variáveis circadianas têm sobre esta hormona. Assim, estudando a relação existente entre os resultados obtidos do momento 2 (15min após o teste) e do momento 4 (2h30min após o teste), para com o momento 5 (manhã do dia seguinte), verificamos que existem diferenças estatisticamente significativas entre estes momentos ($Z = -2,510; p = 0,012$ e $Z = -3,059; p = 0,002$). Estes resultados parecem indicar uma elevação dos processos anabólicos, no período de repouso. O que concluímos perante estes dados, é que estudando a relação existente entre os momentos 2 e 4 para com o momento 5, há um aumento significativo da concentração de testosterona, podendo haver no entanto uma diminuição desta do momento 3 para o momento 4.

Foram também encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o momento 2 (15min após o teste) e 24 horas após o teste ($Z = -2,275; p = 0,023$), entre o momento 3 (1h30 após o teste) e o momento 6 ($Z = -2,589; p = 0,010$), e, finalmente entre o momento 5 (manhã seguinte) e as 24 horas após o teste ($Z = -2,981; p = 0,003$). Em todos estes casos, a concentração de testosterona diminuiu. As conclusões que podemos retirar relativamente às diferenças encontradas, é que tal como acontece no cortisol, a testosterona nas 24 horas após o teste, tem tendência a diminuir o seu valor, voltando a atingir concentrações próximas daquelas que foram verificadas no período antes do teste.

24 horas após a realização do teste de Wingate, os valores da testosterona apresentam-se semelhantes aos iniciais, e significativamente mais baixos que os obtidos no momento 2 (15min depois), no momento 3 (1h30min depois), e no momento 5 (manhã seguinte).

5.3.3 – Variação do Comportamento do Rácio Testosterona/ Cortisol

No que se refere a este parâmetro, ao compararmos os resultados obtidos nos diferentes momentos de recolha, encontramos diferenças estatisticamente significativas entre o momento 1 (antes do teste) e 1h30min após o teste ($Z = -2,040$; $p = 0,041$).

O comportamento do rácio T/C, está dependente das concentrações de Testosterona e Cortisol ao longo das 24 horas do estudo. O que pudemos verificar do momento 1 (antes do teste), para o momento 2 (15min após o teste), foi que o rácio diminuiu como consequência do maior aumento do cortisol, apesar da testosterona ver os seus valores aumentados. Passelergue e Lac (1999), concluíram relativamente ao rácio, que este reflecte estados de anabolismo quando se encontra alto, e estados de catabolismo quando está baixo. Suportando-nos na definição de catabolismo (Tavares *et al.* 2003), que reflecte a quebra de moléculas de grandes dimensões em pequenas dimensões, podemos concluir que do período antes do teste, para o momento 2, desencadeou-se um processo catabólico de libertação de energia. Hoofman *et al.* (1997), concluiu que houve um aumento do rácio do período pré – exercício, para o período logo após, havendo depois uma diminuição brusca dos seus níveis.

O aumento do rácio do momento 2 (15min após o teste), aos momentos 3 e 4 (1h30min e 2h30min após o teste), poderá ser explicado segundo Tavares *et al.* (2003), como um fenómeno anabólico de formação de proteínas a partir dos aminoácidos, repondo de alguma forma as reservas energéticas requeridas durante o Wingate teste. Passelergue e Lac (1999), sugerem que o aumento do rácio poderá ser verificado em esforços de curta duração e de alta intensidade.

A diminuição do rácio desde o momento 4 (2h30 após o teste) até ao momento 6 (24h depois), é explicada pelo maior aumento da concentração de cortisol, relativamente à testosterona, resultante das variáveis circadianas.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Chegados ao término deste estudo, tentaremos resumir neste capítulo as principais conclusões, que advêm da ulterior análise dos resultados obtidos, e, fazer algumas recomendações para futuros estudos desta natureza.

6.1 – Conclusões

Toda a nossa análise ao longo deste estudo, tem-se guiado por uma sequência lógica de acontecimentos. Assim, tendo como ponto de partida a análise do objectivo do estudo, pudemos constatar que efectivamente o tipo de teste utilizado desencadeou alterações nas concentrações de cortisol e testosterona.

As formas mais comuns de avaliação da intensidade do exercício, são a FC e o nível de lactatemia evidenciada pelos atletas aquando do exercício. No entanto, os valores obtidos para estes parâmetros não se coadunam com um tipo de exercício de alta intensidade. A explicação dada para este facto, localiza-se na reduzida duração do exercício, que não é suficiente para que haja uma adaptação tanto da FC, como dos níveis de lactatemia.

Em relação à variação da concentração de cortisol ao longo das 24 horas o estudo, as principais conclusões que podemos retirar, prendem-se com o seu aumento acentuado, desde a primeira recolha, até ao segundo momento estudado (15min após o teste).

A partir dos 15min após o teste, a concentração de cortisol começa a diminuir acentuadamente, atingindo 1h30min após o teste, concentrações inferiores aquelas que foram verificadas 15min após o teste. Desde 1h30min, até à manhã do dia seguinte, os valores de cortisol aumentaram, sofrendo no entanto nova descida desde a manhã seguinte para as 24 horas depois. O aumento da concentração de cortisol, no nosso entender explica-se pela influência das variáveis circadianas.

O que podemos concluir neste estudo, e relativamente ao cortisol, é que este experimenta alterações agudas no seu comportamento. No entanto, no nosso entender, e

de alguma forma suportado pelos resultados obtidos, o cortisol evidencia um comportamento cíclico e imediato, isto é, num período de 24 horas apresenta variações na sua concentração, mas no final, a sua concentração encontra-se próxima dos valores iniciais.

A testosterona ao longo das 24 horas do estudo, evidenciou um comportamento algo similar ao do cortisol. Como resposta ao estímulo (exercício), os níveis de testosterona aumentaram significativamente desde o momento antes do teste até aos 15min após o teste. Estes resultados indicam-nos que o exercício intenso e de curta duração, estimula a produção de testosterona.

De certa forma surpreendente foi o aumento da concentração de testosterona das 2h30min após o teste, até à manhã do dia seguinte, e pela sua diminuição desde este momento, até às 24 horas após o teste.

Tal como no cortisol podemos concluir que a Testosterona evidencia um comportamento diferenciado, mas em que a sua concentração 24 horas após o teste, é muito próxima daquela que foi verificada na recolha inicial, suportando a ideia de que a testosterona apresenta uma taxa menos variável e não muito modificável no período das 24horas após o teste.

O comportamento do Rácio T/C encontra-se dependente das concentrações de testosterona e de cortisol ao longo das 24 horas do estudo. As principais conclusões que podemos retirar daqui, permitem-nos dizer que do momento anterior ao teste para os 15min após o teste, desencadeia-se um processo catabólico de produção de energia, enquanto que dos 15min após o teste, para a 1h30min e 2h30min depois do teste, o mecanismo hormonal incute um processo anabólico. A diminuição do rácio das 2h30min após o teste, para as 24horas depois do teste, pode ser explicada pela variação circadiana das hormonas estudadas.

6.2 – Recomendações

Com o objectivo de aprofundar o conhecimento relativo aos efeitos do exercício físico sobre os nossos objectos de estudo, serão apresentadas de seguida algumas recomendações:

- Alargar o número de elementos da amostra;
- Utilizar indivíduos do sexo feminino, para que se comparem os resultados obtidos entre os diferentes géneros;
- Utilizar um grupo de controlo sem actividade física regular, que realize as mesmas recolhas para posterior comparação;
- Aumentar o número de colheitas de saliva, ao longo das 24 horas;
- Prolongar o estudo até às 48 seguintes, para que se constate se os valores de cortisol e testosterona neste momento, já se encontram dentro dos valores iniciais;
- Comparar dois grupos de controlo em que um é caracterizado por realizar um tipo de exercício intenso e de curta duração, enquanto que o outro desenvolve um caracterizado pela sua duração.
- Realizar recolha sanguínea como forma de avaliação de outros parâmetros bioquímicos;
- Realizar um controlo de dieta e um possível uso de fármacos;
- Eventual avaliação da qualidade do sono, para que se expliquem melhora as variações das concentrações das duas hormonas, após uma noite de sono.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFIA

- Adams, G. (1998). *Exercise Physiology Laboratory Manual* (3th Edition). Mc Graw – Hill.
- Armstrong, N., Welsman, J. e Kirby, B. J. (1997). Performance on the Wingate Anaerobic Test and Maturation. *Pedriatic Exercise Science*. **9**: 253 – 261.
- Barron, J. L., Noakes, T. D., Levy, W., Smith, C. e Millar, R. P. (1985). Hypothalamic dysfunction in overtrained athletes. *J Clin Endocrinol Metabol.* **60**: 803 - 807
- Bonifazi, M., Bela, E., Carli, G., Lodi, G., Martelli, G., Zhu, B. e Lupo, C. (1995). Influence of training on the response to androgen plasma concentrations to exercise in swimmers. *Eur J Appl Physiol.* **70**: 109 – 114.
- Bonifazi, M., Sardella, F. e Lupo, C. (2000). Preparatory versus main competition: differences in performances, lactate responses and pré – competition plasma cortisol concentrations in elite male swimmers. *Eur J Appl Physiol.* **82**: 368 – 373.
- Bouchard, C., Taylor, A. W., Simoneau, J. e Dulac, S. (1991). Testing anaerobic power and capacity. In: Macdougall, J. D., Wengen, H. e Green, H. J. (Eds). *Physiological testing of the high – performance athlete*. 175 – 221. Champaign, IL., Human Kinetics: Canadian Association of Sports Sciences.
- Buono, M.J., Yeager, J.E. e Hodgson, J.A. (1986). Plasma adrenocorticotropin and cortisol responses to brief high intensity exercise in humans. *J Appl Physiol* **61**(4): 1337 – 1339.
- Capelli, C., Pendergast, D.R., e Termin, B. (1998). Energetics of swimming at maximal speed in humans. *Eur J Appl Physiol.* **78**: 385 – 393.
- Chia, M. (2000). Assessing Young People`s Exercise Using Anaerobic Performance Tests. *European Journal of Physical Education.* **5**, 2: 231 – 258.

-
- Costill, D.L., Thomas, R., Robergs, R.A., Pascoe, D., Lambert, C., Barr, S. e Fink, W.J. (1991). Adaptations to Swimming training: influence of training volume. *Med Sci Sports Exerc.* **23**: 371 – 377.
- Does, M. (2005). High Performance Exercise Testing. Wingate sprint test and Pedal Force Measurement: a practical approach. *10th Annual Congress of European College of Sports Science*. Belgrade
- Elias, N.A., Wilson, A.F., Pandian, M.R., Chun, G., Utsumi, A., Kayate, R. e Stone, S.C. (1991). Corticotropin releasing hormone and gonadotropin secretion in physically active males after acute exercise. *Eur. J. Appl Physiol* **62**: 171 – 174;
- Flynn, M.G., Pizza, F.X., Boone, J.B. Jr., Andres, F.F., Michaud, T.A. e Rodriguez – Zayas, J.R. (1994). Indices of training stress during competitive running and swimming seasons. *Int J Sports Med.* **15** (1): 21 – 26.
- Fry, R.W., Morton, A.R., Garcia – Webb, P. e Keast, D. (1991). Monitoring exercise stress by changes in metabolic and hormonal responses over a 24 – h period. *Eur J Appl Physiol.* **63**: 228 – 234.
- Guezennec, C.Y., Lafarge, J.P., Bricout, V.A., Merino, D. e Serrurier, B. (1995). Effect of competition stress on tests used to assess testosterone administration in athletes. *Int J Sports Med.* **16** (6): 368 – 373.
- Guyton, A. C. e Hall, J.E. (1997). Fisiologia do Esporte. In: Guanabara Koogan S. A (Eds), *Tratado de Fisiologia médica* (968 – 970). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.
- Hakkinen. K. e Pakarinen, A. (1991). Serum hormones in male strength athletes during intensive short – term strenght training. *Eur J Appl Physiol.* **63**: 194 – 199.
- Hoffman, J.R., Falk, B., Isaac, S.R., Weinstein, Y., Magazanik, A., Wang, Y. e Yarom, Y. (1997). The Effect of environmental temperature on testosterone and cortisol

- responses to high intensity, intermittent exercise in humans. *Eur J Appl Physiol.* **75**: 83 – 87.
- Hoogeveen, A.R. e Zonderland, M.L. (1996). Relationships Between Testosterone, Cortisol and Performance in Professional Cyclists. *Int. J. Sports Med.* **17**:423 – 428.
- Houmard, J. A., Costill, D. L., Mitchell, J. B., Park, S. H., Fink, W. J. e Burns, J. M. (1990). Testosterone, Cortisol and Creatine Kinase Levels in Male Distance Runners During Reduced Training. *Int J Sports Med.* **11**: 41 – 45.
- Houmard, J.A. e Johns, R.A. (1994). Effects of taper on swim performances. Practical implications. *Sports Med.* **17**: 224 – 232.
- Inbar, O., Bar – Or, O e Skinner, J. S. (1996). *The Wingate Anaerobic Test*. Champaign, IL.: Human Kinetics.
- Kraemer, W.J., Patton, J.F., Knuttgen, H.G., Marchitelli, L.J., Cruthirds, C., Damokosh, A., Harmon, E., Frykman, P. e Dziados, J. (1989) Hypothalamic pituitary – adrenal responses to short duration high intensity cycle exercise. *J Appl Physiol.* **66** (1): 161 – 166.
- Kraemer, W.J., Gordon, S. E., Fleck, S. J., Marchitelli, L. J., Mello, R., Dziados, J. E., Friedl, K., Harman, E., Maresh, C. e Fry, A. C. (1991). Endogenous Anabolic Hormonal and Growth Factor Responses to Heavy Resistance Exercise in Males and Femals. *Int J Sports Med.* **12**: 228 – 235.
- Lac, D., Pantelidis, D. e Robert, A. (1997). Salivary cortisol response to a 30mn submaximal test adjusted to a constant herat rate. *J Sports Med Phys Fitness.* **37**: 56 – 60.
- Maglisho, E. D. (2003) *Swimming Fastest – The essential reference on technique, training, and program design*. Champaign: Human Kinetics.

- Mujika, I., Chatard, J – C. e Geysant, A. (1996). Effects of Training and Taper on Blood Leucocyte Populations in Competitive Swimmers: Relationships with cortisol and performance. *Int J Sports Med.* **17** (3): 213 – 217.
- Passelergue, P. e Lac, G. (1999). Saliva Cortisol, Testosterone and T/C Ratio Variations during a Wrestling Competition, and during the Post – Competitive Recovery Period. *Int J Sports Med.* **20**: 109 – 113.
- Schwarz, L. e Kindermann, W. (1990) Endorphin, adrenocorticotrophic hormone, cortisol and catecholamines during aerobic and anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol.* **61**: 165 – 171.
- Sobral, F. e Silva, M. (1997). *Cineantropometria – Curso Básico*. Coimbra: FCDEF - UC
- Tanaka, H., Costill, D.L., Thomas, R., Fink, W.J. e Widrick, J.J. (1993). Dry – land resistance training for competitive swimming. *Med Sci Sports Exerc.* **25**: 952 – 959.
- Tavares, C., Raposo, F. E. e Marques, R. (2003). *Prescrição de Exercício em Health Club*. Cacém, A. Manz Produções.
- Tyndall, G.L., Kobe, R. W. e Houmard, J. A. (1996). Cortisol, testosterone, and insulin action during intense swimming training in humans. *Eur J Appl Physiol.* **73**: 61 – 65.
- Vander, A., Sherman, J., Luciano, D. (2001). *Human Physiology: the mechanisms of body function*. 8th edition. McGraw - Hill
- Vervoorn, C., Vermulst, L. J. M., Boelens – Quist, A. M., Koppeschaar, H. P. F., Erich, W. B. M., Thijssen, J. H. H. e de Vries, W. R. (1992). Seasonal changes in performance and free testosterone: cortisol ratio of elite female rowers. *Eur J Appl Physiol.* **64**: 14 – 21.

ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo de Recolha das Amostras da Saliva

PROTOCOLO DE RECOLHA DAS AMOSTRAS DE SALIVA

As instruções em seguida apresentadas deverão ser cumpridas de forma a assegurar a viabilidade dos dados recolhidos.

Em cada um dos dias de realização do estudo as recolhas de amostra de saliva serão realizadas em 6 momentos diferentes:

Identificação do Momento	Descrição do Momento	Horas
1	Antes do Aquecimento	
2	15min depois do teste	
3	1h30min depois do teste	
4	2h30min depois do teste	
5	Manhã seguinte ao acordar	
6	24h depois do teste	

A última recolha de amostra de saliva será combinada no dia de realização do protocolo.

Atenção:

- Antes de realizar a recolha das amostras de saliva os indivíduos não deverão ingerir alimentos, mastigar pastilhas elásticas ou rebuçados no período de 30 – 45 minutos que antecedem a recolha.
- Não se deverão lavar os dentes com pasta dentrífica antes das recolhas, sendo apenas permitido bocejar a boca com água.
- O tempo de recolha das amostras, onde cada indivíduo deverá mastigar o algodão, deverá ser de rigorosamente 2 minutos. Após o qual será colocado no recipiente próprio (tubo ensaio) e ir directamente para o congelador, mantendo-se lá até à sua recolha por parte dos investigadores.

A recolha das amostras no domicílio dos elementos da amostra será previamente combinada.

Em caso de qualquer dúvida, deverá contactar o investigador.

Obrigado pela tua colaboração!

ANEXO 2

Dados: Caracterização da Amostra

Tabela 1 – Anos de Treino (anos), volume médio anual (km) e prova mais pontuada.

Sujeitos	Anos de Treino	Volume Médio Anual	Prova mais Pontuada
01	8	1400	200m – 669
02	8	1400	400m – 676
03	7	1400	220m – 724
04	6	1400	50m – 760
05	6	1400	100m – 637
06	5	1400	100m – 687
07	8	1500	100m – 632
08	8	1500	100m – 672
09	9	1500	100m – 753
10	7	1500	200m – 585
11	7	1500	100m – 659
12	6	1500	1500m - 635

Tabela 2 – Massa Corporal (kg), Altura (cm), Altura Sentado (cm), Envergadura (cm).

Sujeitos	Massa Corporal	Altura	Altura Sentado	Envergadura
01	55,2	164,5	84,0	171
02	65,0	182,5	92,2	193
03	58,0	174,0	87,0	184
04	79,6	191,6	95,1	194
05	59,4	177,4	91,5	190
06	69,4	171,5	88,4	173
07	59,8	172,6	91,5	174
08	68,0	173,7	91,2	175
09	72,0	183,0	95,0	190
10	72,8	179,6	89,6	181
11	68,2	182,6	9,5	187
12	70,0	172,3	92,4	174

Tabela 3 – Pregas sub – escapular, supra – ilíaca, tricipital, abdominal, geminal e crural.

Sujeitos	Sub - escapular	Supra - ilíaca	Tricipital	Abdominal	Geminal	Crural
01	7	4	7	7	7	12
02	6	6	6	9	9	9
03	6	5	6	7	10	7
04	7	7	8	7	6	9
05	6	5	4	8	3	6
06	9	7	7	9	11	14
07	9	8	9	8	11	14
08	9	7	7	8	9	10
09	7	6	7	6	7	8
10	7	7	8	7	11	9
11	6	6	5	7	5	7
12	11	10	11	12	10	15

Tabela 4 – Somatótipo da Amostra.

Sujeitos	Endo	Meso	Ecto	Categorias
01	1,61	3,65	3,05	Mesomorfo - Ectomorfo
02	1,84	1,51	4,65	Ectomorfo Equilibrado
03	1,61	2,02	4,32	Ectomorfo Equilibrado
04	2,48	1,50	4,02	Ectomorfo Equilibrado
05	1,39	2,15	4,70	Mesoectomorfo
06	2,30	3,41	1,97	Mesomorfo Equilibrado
07	2,66	2,10	3,73	Endoectomorfo
08	2,33	3,38	2,57	Mesomorfo Equilibrado
09	2,10	2,32	3,62	Ectomorfo Equilibrado
10	2,30	2,60	2,91	Ectomorfo Equilibrado
11	1,71	2,34	4,14	Mesoectomorfo
12	3,32	1,96	2,02	Ectomorfo Equilibrado

ANEXO 3

Dados: Resultados do Teste Anaeróbico de Wingate

Tabela 1 - Carga Solicitada, Potência Máxima, Potência Mínima, Potência Média e Índice de Fadiga.

Sujeitos	Carga	Potência Máxima (W)	Potência Mínima (W)	Potência Média (W)	Índice de fadiga
1	4,14	572	428	499	25,2
2	4,97	623	470	557	24,6
3	4,43	527	390	458	26,0
4	6,01	859	577	715	32,8
5	4,51	590	445	513	24,6
6	5,18	610	497	556	18,5
7	4,60	615	457	538	25,7
8	5,16	679	513	593	24,4
9	5,44	812	586	702	27,8
10	5,56	712	491	599	31,0
11	5,22	654	518	590	20,8
12	5,30	620	400	516	35,5

ANEXO 4

ELISA competitivo



101 Innovation Blvd., Suite 302
State College, PA 16803 USA
(T) 800-790-2258 (F) 814-234-1608
www.salimetrics.com
techservices@salimetrics.com

HIGH SENSITIVITY SALIVARY CORTISOL ENZYME IMMUNOASSAY KIT

Catalog No. 1-0102/1-0112, 96-Well Kit

For Research Use Only, Not For Diagnostic Use

Intended Use

Salimetrics HS-Cortisol kit is a competitive immunoassay specifically designed for the quantitative measurement of salivary cortisol. It is not intended for use with serum/plasma or for diagnostic use. It is intended only for research use with saliva. Please read the complete kit insert before performing this assay. For further information about this kit, its application, or the procedures in this insert, please contact the technical service team at Salimetrics.

Introduction

At Salimetrics, we know that the current market approach to the application of immunoassay techniques in the measurement of biomarkers in saliva is problematic. This assay kit has been designed to specifically address the following three problems. First, the majority of available immunoassays for saliva cortisol are modifications of protocols developed for the use with serum/plasma. The standards used in those assay kits are suspended in a human serum matrix. Given that the composition of serum is markedly different from saliva, these standards are likely to produce results that are influenced by matrix differences. To ensure the most accurate results, this salivary immunoassay is designed using a matrix that matches saliva. Second, the level of cortisol in saliva is significantly lower than levels in the general circulation. The use of a standard curve developed to capture the range of values expected in serum/plasma samples is often not sensitive enough to capture the complete range of individual differences in the level expected in saliva. This assay is designed to capture the full range of salivary cortisol levels while using only 25 μ L of saliva per test. Third, the pH of saliva is easily lowered or raised by the consumption of food or drink. Performance of immunoassays becomes compromised as the pH of samples to be tested drops below 4 (1). This results in artificially inflated levels. This assay system is designed to be very sensitive to the effects of interference caused by collection techniques that affect pH. In addition, a built-in pH indicator warns the user of acidic or basic samples.

Test Principle

A microtitre plate is coated with rabbit antibodies to cortisol. Cortisol in standards and unknowns compete with cortisol linked to horseradish peroxidase for the antibody binding sites. After incubation, unbound components are washed away. Bound cortisol peroxidase is measured by the reaction of the peroxidase enzyme on the substrate tetramethylbenzidine (TMB). This reaction produces a blue color. A yellow color is formed after stopping the reaction with sulfuric acid. Optical Density is read on a standard plate reader at 450 nm. The amount of cortisol peroxidase detected is inversely proportional to the amount of cortisol present (2).

Special Feature

A pH indicator in the assay diluent alerts the user to samples with high or low pH values. Acidic samples will turn the diluent yellow. Alkaline samples will turn the diluent purple. Dark yellow or purple wells indicate that a pH value for that sample should be obtained using pH strips. Cortisol values from samples with a pH \leq 3.5 or \geq 9.0 may be artificially inflated or lowered (1).

Precautions

1. Stop Solution is a solution of sulfuric acid. This solution is caustic; use with care.
2. This kit uses break-apart microtitre strips. Unused wells must be stored at 2-8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
3. Do not mix components from different lots of kits.

4. When using a multichannel pipette, reagents should be added to duplicate wells at the same time. Follow the same sequence when adding additional reagents so that incubation time with reagents is the same for all wells.
5. See Material Safety Data at the end of procedure.
6. As for all quantitative assays for salivary analytes, we recommend that samples be screened for possible blood contamination (3,4). This can be efficiently and economically accomplished using Salimetrics Blood Contamination EIA Kit (Cat No: 1-1302/1-1312). For a description of this assay or an assay kit insert see www.salimetrics.com.
7. Routine calibration of pipettes is critical for the best possible assay performance.
8. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible (without interruption) across the plate.
9. When running multiple plates, or multiple sets of strips, a standard curve should be run with each individual plate and/or strips.
10. The temperature of the laboratory may affect assays. Salimetrics' kits have been validated at 70°F (21.1°C). Higher or lower temperatures will cause an increase or decrease in OD values, respectively.

Storage All components of this kit are stable at 2-8°C until the kit's expiration date.

Reagents and Reagent Preparation

1. **Anti-Cortisol Coated Plate:** A ready to use microtitre plate pre-coated with antibodies in a resealable foil pouch.
2. **Cortisol Standards:** Six vials, 500 µL each, labeled A-F, containing cortisol concentrations of 1.8, 0.600, 0.200, 0.067, 0.022, and 0.007 µg/dL, in a synthetic saliva matrix with a non-mercury preservative. (Values in nmol/L are 49.66, 16.55, 5.52, 1.84, 0.61, and 0.20 nmol/L respectively.)
3. **Wash Buffer:** A 10X phosphate buffered solution containing detergents and a non-mercury preservative. Dilute the wash buffer concentrate 10 fold with room temperature deionized water (100 ml of 10X wash buffer to 900 ml of deionized H₂O). (**If precipitate has formed in the concentrated wash buffer, it may be heated to 60°C for 15 minutes. Cool to room temperature before use in assay.*)
4. **Assay Diluent:** A phosphate buffered solution containing a pH indicator and a non-mercury preservative.
5. **Enzyme Conjugate:** A solution of cortisol labeled with horseradish peroxidase.
6. **Tetramethylbenzidine (TMB):** A non-toxic ready to use solution.
7. **Stop Solution:** A solution of sulfuric acid in distilled water. (USA customers only). Stop solution is provided in powdered form to customers outside the USA. Reconstitute the powdered stop solution with 12.5 mL of deionized water. Let sit for 10 minutes before use.
8. **Non-specific Binding Wells:** These wells do not contain anti-cortisol antibody. In order to support multiple-use, a strip of NSB wells is included. They are located in the foil pouch. Wells may be broken off and inserted where needed.

Note: The quantity of reagent provided with break-apart kits is sufficient for three individual runs. The volume of diluent and conjugate used for assays using less than a full plate should be scaled down accordingly, keeping the same dilution ratio.

Materials Needed But Not Supplied

- Precision pipette to deliver 25 µL
- Precision multichannel pipette to deliver 50 µL, and 200 µL
- Vortex
- Plate rotator (if unavailable, tap to mix)
- Plate reader with a 450 nm filter
- Log-linear graph paper or computer software for data reduction
- Deionized water
- Reagent reservoirs
- One disposable tube capable of holding 24 mL
- Pipette tips
- Serological pipette to deliver up to 24 mLs

Specimen Collection

The preferred saliva collection method (5,6) is to use plain (non-citric acid) cotton Salivettes (Sarstedt). Freeze all saliva samples prior to assay in order to precipitate mucins. Thaw completely, vortex, and centrifuge at 1500 x g (@3000 rpm) for 15 minutes. Pipette clear sample into appropriate wells.

Procedure

Bring all reagents to room temperature.

Step 1: Determine your plate layout. Here is a suggested layout.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.80 Std	1.80 Std	Control H	Control H								
B	.600 Std	.600 Std	Control L	Control L								
C	.200 Std	.200 Std	Sample 1	Sample 1								
D	.067 Std	.067 Std	Sample 2	Sample 2								
E	.022 Std	.022 Std	Sample 3	Sample 3								
F	.007 Std	.007 Std	Sample 4	Sample 4								
G	Zero	Zero	Sample 5	Sample 5								
H	Nsb	Nsb	Sample 6	Sample 6								

Step 2: Keep the desired number of strips in the strip holder and place the remaining strips back in the foil pouch. If you choose to place non-specific binding wells in H-1, 2, remove strips 1 and 2 from the strip holder and break off the bottom wells. Place the strips back into the strip holder leaving H-1, 2 blank. Break off 2 NSB wells from the strip of NSBs included in the foil pouch. Place in H-1, 2. Alternatively, NSBs may be placed wherever you choose on the plate. Reseal the zip-lock and refrigerate the pouch at 2-8°C.

Caution: Extra NSB wells should not be used for determination of standards or unknowns.

Step 3:

- Pipette 24 mLs of assay diluent into a disposable tube. Set aside for Step 5.

Step 4:

- Pipette 25 µL of standards and unknowns into appropriate wells. Standards and samples should be assayed in duplicate.
- Pipette 25 µL of assay diluent into 2 wells to serve as the zero.
- Pipette 25 µL of assay diluent into each NSB well.

Step 5: Make a 1:1,600 dilution of the conjugate, by adding 15 µL of the conjugate to the 24 mL of assay diluent prepared in Step 3, (full plate only). Immediately mix the diluted conjugate solution and pipette 200 µL into each well using a multichannel pipette.

Step 6: Mix plate on rotator for 5 minutes at 500 rpm (or tap to mix) and incubate at room temperature for an additional 55 minutes.

Step 7: Wash the plate 4 times with 1X wash buffer. A plate washer is recommended. However, washing may be done by gently squirting wash buffer into each well with a squirt bottle or by pipetting 300µL of wash buffer into each well, and then discarding the liquid by inverting the plate over a sink. After each wash, the plate should be thoroughly blotted on paper towels before being turned upright. *If using a plate washer, blotting is still recommended after the last wash.*

Step 8: Add 200 µL of TMB solution to each well with a multichannel pipette.

Step 9: Mix on a plate rotator for 5 minutes at 500 rpm (or tap to mix) and incubate the plate in the dark at room temperature for an additional 25 minutes.

Step 10: Add 50 µL of stop solution with a multichannel pipette.

Step 11:

- Mix on a plate rotator for 3 minutes at 500 rpm (or tap to mix). **Caution: *DO NOT* mix at speeds over 600 rpms. Wells are very full!**
- Wipe off bottom of plate with a water-moistened lint-free cloth and wipe dry.
- Read in a plate reader at 450 nm. Read plate within 10 minutes of adding stop solution (correction at 492 to 620 is desirable).

Calculations

1. Compute the average Optical Density (OD) for all duplicate wells.
2. Subtract the average OD for the NSB wells from the average OD of the zero, standards, and unknowns.
3. Calculate the percent bound (B/BO) for each standard and unknown by dividing the average OD (B) by the average OD for the zero (BO).
4. If calculating the results by hand, plot B/BO on the vertical axis against the log of the concentration on the horizontal axis for each standard and draw a straight line through the points. Determine the concentrations of the unknowns by interpolation.
5. If using software capable of logistics, use a 4 parameter sigmoid minus curve fit. Otherwise, use log-linear regression.

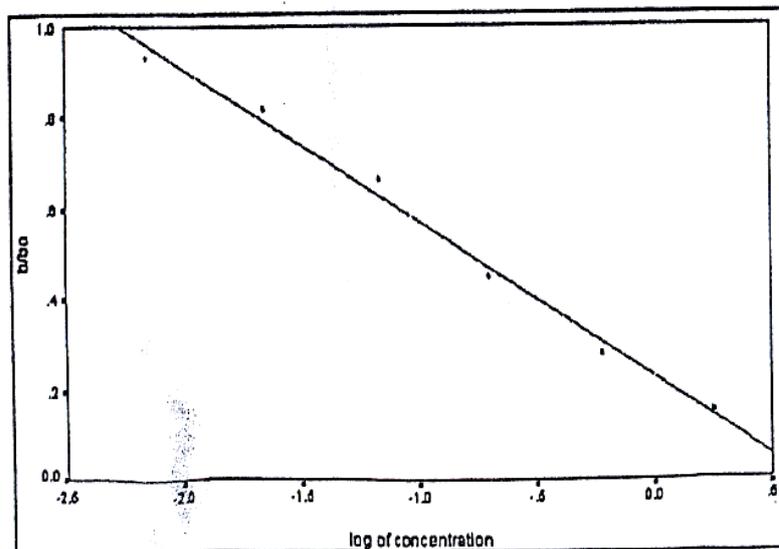
Typical Results

The following charts and graphs are for illustration only and **SHOULD NOT** be used to calculate results from another assay.

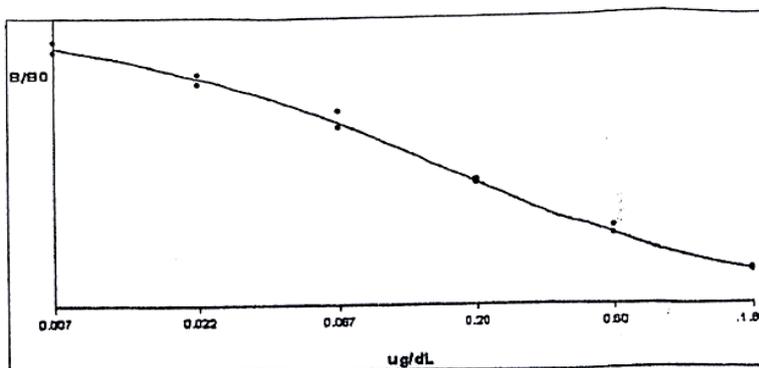
Well	Sample	Average OD	B	B/Bo	Cortisol ug/dL
A1,A2	S1	0.229	0.205	0.1207	1.613
B1,B2	S2	0.419	0.395	0.2326	0.757
C1,C2	S3	0.737	0.713	0.4199	0.214
D1,D2	S4	1.090	1.066	0.6278	0.052
E1,E2	S5	1.330	1.306	0.7691	0.020
F1,F2	S6	1.561	1.537	0.9052	0.008
G1,G2	B0	1.722	1.698	NA	
H1,H2	NSB	0.024	NA	NA	

Example: Standard Curves

Log-Linear Regression



Cortisol 4-Parameter Sigmoid MINUS Curve fit



Material Safety Data*

Hazardous Ingredients

Stop Solution is a solution of sulfuric acid. This solution is caustic; use with care. We recommend the procedures listed below for all kit reagents.

Handling

Follow good laboratory procedures when handling kit reagents. Laboratory coats, gloves, and safety goggles are recommended. Wipe up spills using standard absorbent materials while wearing protective clothing. Follow local regulations for disposal.

Emergency Exposure Measures

In case of contact, immediately wash skin or flush eyes with water for 15 minutes. Remove contaminated clothing. If inhaled, remove individual to fresh air. If individual experiences difficulty breathing, give oxygen and call a physician.

*The above information is believed to be accurate but is not all-inclusive. This information should only be used as a guide. Salimetrics shall not be liable for accidents or damage resulting from contact with reagents.

References

1. Schwartz, E.B., Granger, D.A., Susman, E.J., Gunnar, M.R., & Laird, B. (1998). Assessing salivary cortisol in studies of child development. *Child Development*, 69, 1503-1513.
2. Chard, T. (1990). *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*. Amsterdam: Elsevier.
3. Kivlighan, K. T., Granger, D. A., Schwartz, E. B., Nelson, V., & Curran, M. (2004). Quantifying blood leakage into the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. *Hormones and Behavior*, 46, 39-46.
4. Schwartz, E., & Granger, D. A. (2004). Transferrin enzyme immunoassay for quantitative monitoring of blood contamination in saliva. *Clinical Chemistry*, 50, 654-656.
5. Clements, A.D., & Parker, C.R. (1998). The relationship between salivary cortisol concentrations in frozen versus mailed samples. *Psychoneuroendocrinology*, 23, 613-616.
6. Kirschbaum, C., Read, G.F., & Hellhammer, D.H. (1992). *Assessment of hormones and drugs in saliva in biobehavioral research*. Kirkland, WA: Hogefé & Huber.

HS Cortisol EIA Assay Performance Characteristics

Recovery: Two saliva samples containing different levels of endogenous cortisol were spiked with known quantities of cortisol and assayed.

Sample	Endogenous (ug/dL)	Added (ug/dL)	Expected (ug/dL)	Observed (ug/dL)	Recovery (%)
1	0.41	0.54	0.95	0.825	86.8%
		0.04	0.450	0.390	86.7%
2	0.111	0.54	0.651	0.614	94.3%
		0.04	0.151	0.136	90.1%



101 Innovation Blvd., Suite 302
State College, PA 16803 USA
(T) 814-234-7748, (F) 814-234-1608
800-790-2258 (USA & Canada only)
www.salimetrics.com
techservices@salimetrics.com

SALIVARY TESTOSTERONE ENZYME IMMUNOASSAY KIT

Catalog No. 1-1402/1-1412, 96-Well Kit

For *in vitro* Research Use

Intended Use

Salimetrics' testosterone kit is a competitive immunoassay specifically designed for the quantitative measurement of salivary testosterone. It is not intended for use with serum/plasma or for diagnostic use. It is intended for research use with saliva. Please read the complete kit insert before performing this assay. For further information about this kit, its application, or the procedures in this insert, contact the technical service team at Salimetrics.

Introduction

Measurement of hormones in saliva has excited interest because of numerous potential applications in developmental and health-oriented behavioral studies (1). Although salivary assays for some hormones (e.g., cortisol) are widely available and used, the availability and use of salivary testosterone has been more restricted. A recent paper (2) reveals a need for a sensitive, efficient, reliable, and commercially available assay system for the measurement of salivary testosterone. This assay kit fills that need with a protocol that the research community can use to improve the next generation of their studies. It has been designed to specifically address the following five issues. First, all available immunoassays for salivary testosterone are modifications of protocols developed for the use with serum/plasma. The standards used in those assay kits are suspended in a human serum matrix. Given that the composition of serum is markedly different from saliva, these standards are likely to produce results that are influenced by matrix differences. To ensure the most accurate results, this salivary immunoassay is designed using a matrix that matches saliva. Second, the level of testosterone in saliva (pg/mL) is significantly lower than levels in the general circulation (ng/mL). The use of a standard curve developed to capture the range of values expected in serum/plasma samples is often not sensitive enough to capture individual differences in the level expected in saliva. This assay has been designed to do so. Third, the test volume of published modified serum immunoassays for use with salivary testosterone ranges from 200 μ L to 1 mL per test. The current protocol uses only 50 μ L of saliva per test. Fourth, no separation or extractions are necessary. Fifth, the pH of saliva is easily lowered or raised by the consumption of food or drink. Immunoassay performance can be compromised as the pH of samples to be tested drops below 4 (3). This assay system is designed to be very sensitive to the effects of interference caused by collection techniques that affect pH.

Test Principle

A microtitre plate is coated with rabbit antibodies to testosterone. Testosterone in standards and unknowns compete with testosterone linked to horseradish peroxidase for the antibody binding sites. After incubation, unbound components are washed away. Bound testosterone peroxidase is measured by the reaction of the peroxidase enzyme on the substrate tetramethylbenzidine (TMB). This reaction produces a blue color. A yellow color is formed after stopping the reaction with 2 molar sulfuric acid. Optical Density is read on a standard plate reader at 450 nm. The amount of testosterone peroxidase detected is inversely proportional to the amount of testosterone present (4).

Revision Date: 10-14-05

Special Feature

As in all Salimetrics assays for use with saliva, a pH indicator in the assay diluent alerts the user to samples with high or low pH values. Acidic samples will turn the diluent yellow. Alkaline samples will turn the diluent purple. Dark yellow or purple wells indicate that a pH value for that sample should be obtained using a pH strip/meter. Testosterone values from samples with a $\text{pH} \leq 4.0$ or ≥ 9.0 may be artificially inflated or lowered (3).

Precautions

1. Stop Solution is a 2 molar solution of sulfuric acid. This solution is caustic; use with care.
2. This kit uses break-apart microtitre strips. Unused wells must be stored at 2-8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
3. Do not mix components from different lots of kits.
4. When using a multichannel pipette, reagents should be added to duplicate wells at the same time. Follow the same sequence when adding additional reagents so that incubation time with reagents is the same for all wells.
5. See 'Material Safety' Data at the end of procedure.
6. We recommend that samples be screened for possible blood contamination (5,6) using a reliable screening tool such as the Salimetrics Blood Contamination EIA Kit (Cat No: 1-1302/1-1312). Do not use dipsticks, which result in false positive values due to salivary enzymes.
7. Routine calibration of pipettes is critical for the best possible assay performance.
8. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible (without interruption) across the plate.
9. When running multiple plates, or multiple sets of strips, a standard curve should be run with each individual plate and/or strips.
10. The temperature of the laboratory may affect assays. Salimetrics' kits have been validated at 68 -74°F (20 - 23.3°C). Higher or lower temperatures will cause an increase or decrease in OD values, respectively. Salimetrics cannot guarantee test results outside of this temperature range.

Storage All components of this kit are stable at 2-8°C until the kit's expiration date.

Reagents and Reagent Preparation

1. **Anti-Testosterone Coated Plate:** A ready-to-use 96-well microtitre plate pre-coated with rabbit anti-testosterone antibodies in a resealable foil pouch.
2. **Testosterone Standard:** 1 mL of testosterone in a saliva-like matrix with a non-mercury preservative, at a concentration of 360 pg/mL.
3. **Wash Buffer:** 100 mL of a 10X phosphate buffered solution containing detergents and a non-mercury preservative. Dilute the wash buffer concentrate 10-fold with room temperature deionized water (100 mL of 10X wash buffer to 900 mL of deionized H₂O). (NOTE: *If precipitate has formed in the concentrated wash buffer, it may be heated to 60°C for 15 minutes. Cool to room temperature before use in assay.*)
4. **Assay Diluent:** 63 mL of a phosphate buffered solution containing a pH indicator and a non-mercury preservative.
5. **Enzyme Conjugate:** 50 µL of a solution of testosterone labeled with horseradish peroxidase. Dilute prior to use with assay diluent.
6. **Tetramethylbenzidine (TMB):** 25 mL of a non-toxic ready-to-use solution.
7. **Stop Solution:** 12.5 mL of a 2 molar solution of sulfuric acid in distilled water (US customers only). Stop solution is provided in powdered form to customers outside the US. Reconstitute the powdered stop solution with 12.5 mL of deionized water. Let sit for 10 minutes before use.
8. **Non-specific Binding Wells:** These wells do not contain anti-testosterone antibody. In order to support multiple-use, a strip of NSB wells is included. They are located in the foil pouch. Wells may be broken off and inserted where needed.

NOTE: *The quantity of reagent provided with break-apart kits is sufficient for three individual runs. The volume of diluent and conjugate used for assays using less than a full plate should be scaled down accordingly, keeping the same dilution ratio.*

Materials Needed But Not Supplied

- Precision pipette to deliver 7 μL , 50 μL , 100 μL and 200 μL
- Precision multichannel pipette to deliver 50 μL , 150 μL , and 200 μL
- Vortex
- Plate rotator (assay sensitivity may be affected if a rotator is not used)
- Plate reader with a 450 nm filter
- Computer software for data reduction
- Deionized water
- Reagent reservoirs
- One 20 mL disposable tube
- Five small disposable tubes
- Pipette tips
- 25 mL serological pipette

Specimen Collection

The preferred saliva collection method is by unstimulated passive drool. **Do not use any cotton absorbent material, such as Salivettes®, Sorbettes and cotton ropes or swabs to collect samples (1,7), as false high readings will result.** Do not use polyester versions of the Salivette device, or the Salisaver device. **Do not add sodium azide to saliva samples as a preservative.** Freeze at -20°C or lower for long-term storage. Contact the technical service team at salimetrics for more detailed information on specimen collection.

Saliva samples should be frozen prior to assay to precipitate the mucins. On day of assay, thaw completely, vortex, and centrifuge at $1500 \times g$ (@3000 rpm) for 15 minutes. It is important to avoid additional freeze-thaws cycles. Pipette clear sample into appropriate wells. Particulate matter may interfere with antibody binding, leading to falsely elevated results.

Procedure

Bring all reagents to room temperature.

Step 1: Determine your plate layout (see below).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	360 Std	360 Std	Ctrl H	Ctrl H								
B	144 Std	144 Std	Ctrl L	Ctrl L								
C	57.6 Std	57.6 Std	S 1	S 1								
D	23.0 Std	23.0 Std	S 2	S 2								
E	9.2 Std	9.2 Std	S 3	S 3								
F	3.7 Std	3.7 Std	S 4	S 4								
G	Zero	Zero	S 5	S 5								
H	NSB	NSB	S 6	S 6								

Step 2: Keep the desired number of strips in the strip holder and place the remaining strips back in the foil pouch. If you choose to place non-specific binding wells in H-1, 2, remove strips 1 and 2 from the strip holder and break off the bottom wells. Place the strips back into the strip holder leaving H-1, 2 blank. Break off 2 NSB wells from the strip of NSBs included in the foil pouch. Place in H-1, 2. Alternatively, NSBs may be placed wherever you choose on the plate. Reseal the pouch and refrigerate at $2-8^{\circ}\text{C}$.

Caution: Extra NSB wells should not be used for determination of standards or unknowns.

Step 3:

- Label five microcentrifuge tubes or other small tubes 2 through 6.
- Pipette 150 μL of assay diluent in tubes 2 through 6.
Serially dilute the standard 2.5X by adding 100 μL of the 360 pg/mL standard (tube 1) to tube 2. Mix well. After changing pipette tips, remove 100 μL from tube 2 to tube 3. Mix well. Continue for tubes 4, 5, and 6. The final concentrations of standards for tubes 1 through 6 respectively are 360 pg/mL, 144 pg/mL, 57.6 pg/mL, 23.0 pg/mL, 9.20 pg/mL, and 3.70 pg/mL. Standard concentrations in pmol/L are 1248.3, 499.3, 199.7, 79.8, 31.9 and 12.8.

- Pipette 18 mL of assay diluent into the disposable tube. Set aside for Step 5.

Step 4:

- Pipette 50 μ L of standards and unknowns into appropriate wells. Standards and samples should be assayed in duplicate.
- Pipette 50 μ L of assay diluent into 2 wells to serve as the zero.
- Pipette 50 μ L of assay diluent into each NSB well.

Step 5: Dilute the enzyme conjugate by adding 7 μ L of the conjugate to the 18 mL of assay diluent prepared in Step 2. Immediately mix the diluted conjugate solution and add 150 μ L to each well using a multichannel pipette.

Step 6: Mix plate on a plate rotator for 60 minutes at 500 rpm at room temperature.

Step 7: Wash the plate 4 times with 1X wash buffer. A plate washer is recommended. However, washing may be done by gently squirting wash buffer into each well with a squirt bottle or by pipetting 300 μ L of wash buffer into each well and then flipping the liquid into a sink. After each wash, the plate should be thoroughly blotted on paper towels before turning upright. If using a plate washer, blotting is still recommended after the final wash.

Step 8: Add 200 μ L of TMB solution to each well with a multichannel pipette.

Step 9: Mix on a plate rotator for 5 minutes at 500 rpm (or tap to mix) and incubate the plate in the dark at room temperature for an additional 25 minutes.

Step 10: Add 50 μ L of stop solution with a multichannel pipette.

Step 11: Mix on a plate rotator for 3 minutes at 500 rpm (or tap to mix). Be sure all wells have turned yellow. If green color remains, continue mixing until green color turns to yellow.

Caution: *DO NOT* mix at speeds over 600 rpms. Wipe off bottom of plate with a water-moistened lint-free cloth and wipe dry. Read in a plate reader at 450 nm. Read plate within 10 minutes of adding stop solution (correction at 492 to 620 is desirable).

Calculations

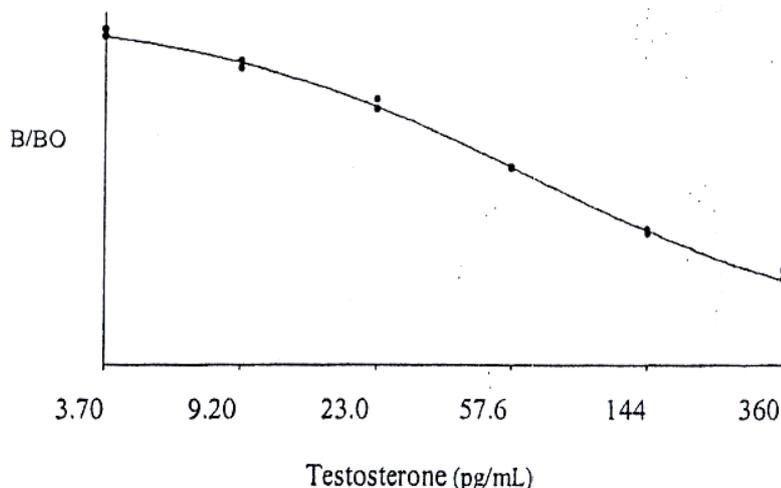
1. Compute the average optical density (OD) for all duplicate wells.
2. Subtract the average OD for the NSB wells from the average OD of the zero, standards, and unknowns/samples.
3. Calculate the percent bound (B/Bo) for each standard and unknown by dividing the average OD (B) by the average OD for the zero (Bo).
4. Determine the concentrations of the unknowns/samples by interpolation using software capable of logistics. We recommend using a 4-parameter sigmoid minus curve fit.

Typical Results

The following results are shown for illustration only and **SHOULD NOT** be used to calculate results from another assay.

Well	Sample	Average OD	B	B/Bo	Testosterone (pg/mL)
A1, A2	S1	0.304	0.254	0.259	360
B1, B2	S2	0.426	0.376	0.384	144
C1, C2	S3	0.609	0.559	0.571	57.6
D1, D2	S4	0.793	0.743	0.759	23.0
E1, E2	S5	0.905	0.855	0.873	9.20
F1, F2	S6	0.997	0.947	0.967	3.70
G1, G2	Bo	1.029	0.979	NA	NA
H1, H2	NSB	0.05	NA	NA	NA

Example: Testosterone 4-Parameter Sigmoid Minus Curve Fit



Material Safety Data*

Hazardous Ingredients

Stop Solution is a 2 molar solution of sulfuric acid. This solution is caustic; use with care. We recommend the procedures listed below for all kit reagents.

Handling

Follow good laboratory procedures when handling kit reagents. Laboratory coats, gloves, and safety goggles are recommended. Wipe up spills using standard absorbent materials while wearing protective clothing. Follow local regulations for disposal.

Emergency Exposure Measures

In case of contact, immediately wash skin or flush eyes with water for 15 minutes. Remove contaminated clothing. If inhaled, remove individual to fresh air. If individual experiences difficulty breathing, give oxygen and call a physician.

*The above information is believed to be accurate but is not all-inclusive. This information should only be used as a guide. Salimetrics shall not be liable for accidents or damage resulting from contact with reagents.

Performance Characteristics

1. **Recovery** - Saliva samples containing different levels of endogenous testosterone were spiked with known quantities of testosterone and assayed. The average recovery was 105.0% (range 93.3% to 116.3%), 109.12% for males and 99.6% for females.
2. **Intra-assay precision** was determined from the mean of 8 replicates at high (197.3 pg/mL) and low (26.3 pg/mL) testosterone levels. The average intra-assay coefficient of variation was 3.3% and 6.7% for high and low levels.
3. **Inter-assay precision** was determined from the mean of averaged duplicates for 10 separate runs at high (200.7 pg/mL) and low (13.1 pg/mL) testosterone levels. The average inter-assay coefficient of variation was 5.1% for high and 9.6% for low testosterone levels.
4. **Linearity of dilution**- Saliva samples were diluted (range 1:2 to 1:16) with assay buffer and assayed in duplicate. The average recovery was 101.1% (range 88.2% to 120.2%), 102.86% for males and 98.68% for females.
5. **Sensitivity**- The lower limit of sensitivity was determined by interpolating the mean minus 2 SD for 10 sets of duplicates for the 0 pg/mL standard (4). The minimal concentration of testosterone that can be distinguished from 0 is <1.5 pg/mL.

6. **Correlation with serum** – The correlation between saliva and serum free and total testosterone was determined by assaying 32 matched samples (16 adult males and females). The saliva-serum free testosterone correlation was, $r(30) = 0.93$, $p < 0.001$, and the saliva-serum total testosterone correlation was $r(30) = 0.929$, $p < 0.001$. The serum-saliva correlations were stronger for males ($r = 0.80$ to 0.85) than for females ($r = 0.38$ to 0.48).
7. **Method Comparison** – The correlation between the Salimetrics EIA and a published serum RIA modified for use with saliva (2) was evaluated by assaying 32 common samples. For the combined sample, the EIA-RIA results were highly correlated, $r(30) = 0.95$, $p < 0.001$. The EIA-RIA correlation was stronger for males ($r = 0.88$) than for females ($r = 0.54$).

†**Salivary Testosterone Expected Ranges:**

Adult males (mid day*)	70-220 pg/mL
Adult females (mid day*)	5-70 pg/mL
*AM values may be significantly higher	

†To be used as a guide only. Each laboratory should establish its own range.

References

1. Kirschbaum, C., Read, G.F., & Hellhammer, D.H. (1992). *Assessment of hormones and drugs in saliva in biobehavioral research*. Kirkland, WA: Hogefe & Huber.
2. Granger, D. A., Schwartz, E. B., Booth, A., & Arentz, M. (1999). Salivary testosterone determination in studies of child health and development. *Hormones and Behavior*, 35, 18-27.
3. Schwartz, E.B., Granger, D.A., Susman, E.J., Gunnar, M.R., & Laird, B. (1998). Assessing salivary cortisol in studies of child development. *Child Development*, 69, 1503-1513.
4. Chard, T. (1990). *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*. Amsterdam: Elsevier.
5. Kivlighan, K. T., Granger, D. A., Schwartz, E. B., Nelson, V., & Curran, M. (2004). Quantifying blood leakage into the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. *Hormones and Behavior*, 46, 39-46.
6. Schwartz, E., & Granger, D. A. (2004). Transferrin enzyme immunoassay for quantitative monitoring of blood contamination in saliva. *Clinical Chemistry*, 50, 654-656.
7. Shirtcliff, E.A., Granger, D.A., Schwartz, E., & Curran, M.J. (2001). Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: Cotton based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology*, 26, 165-173.

Seller's Limited Warranty

"Seller warrants that all goods sold hereunder will be free from defects in material and workmanship. Upon prompt notice by Buyer of any claimed defect, which notice must be sent within thirty (30) days from date such defect is first discovered and within three months from the date of shipment, Seller shall, at its option, either repair or replace the product that is proved to Seller's satisfaction to be defective. All claims should be submitted in written form. This warranty does not cover any damage due to accident, misuse, negligence, or abnormal use. Liability, in all cases, will be limited to the purchased cost of the kit.

It is expressly agreed that this limited warranty shall be in lieu of all warranties of fitness and in lieu of the warranty of merchantability. Seller shall not be liable for any incidental or consequential damages that arise out of the installation, use or operation of Seller's product or out of the breach of any express or implied warranties."

ANEXO 5

Tratamiento Estadístico

Análise Descritiva

Teste de Wingate

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
PotMáx	12	527,00	859,00	656,08	96,98
Potmed	12	458,00	715,00	569,67	77,08
Índice Fadiga	12	18,50	35,50	26,41	4,80

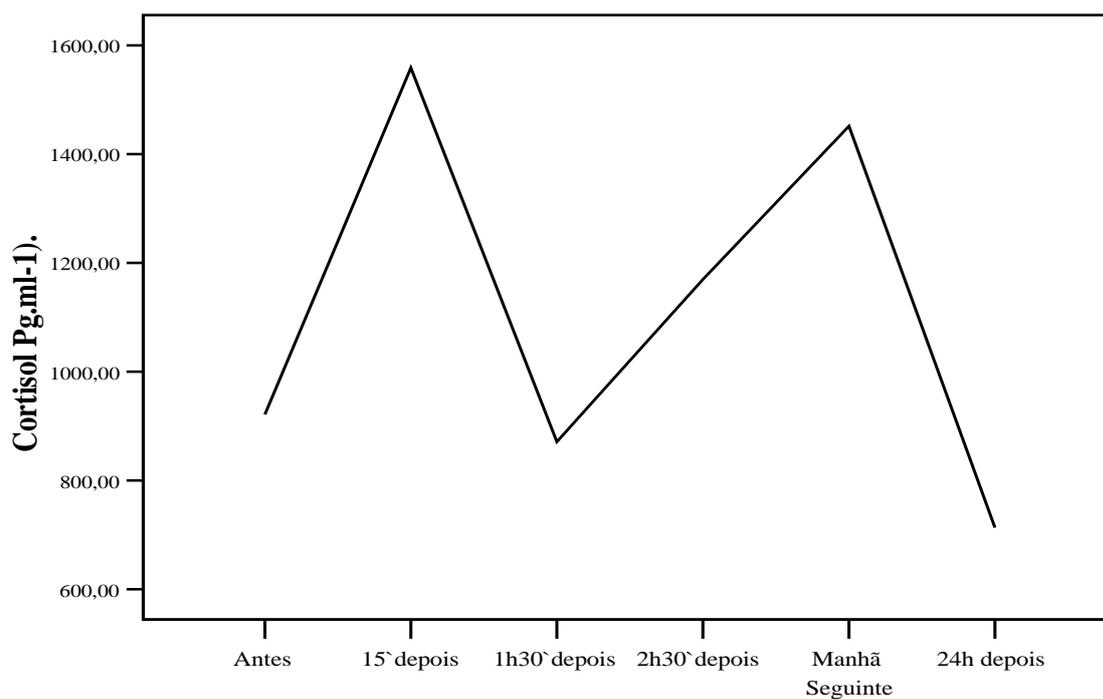
Parâmetros Fisiológicos

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
FC	12	151,00	183,00	165,25	10,07
La	12	6,20	12,70	10,01	2,01

Concentração de Cortisol Salivar

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Cort_1	12	20,71	3583,88	921,49	1126,14
Cort_2	12	42,76	6121,27	1558,59	2002,42
Cort_3	12	19,25	6032,55	871,11	1664,66
Cort_4	12	3,96	5830,51	1169,60	2023,90
Cort_5	12	,00	6879,65	1451,49	2316,41
Cort_6	12	18,16	3710,00	713,40	1029,88

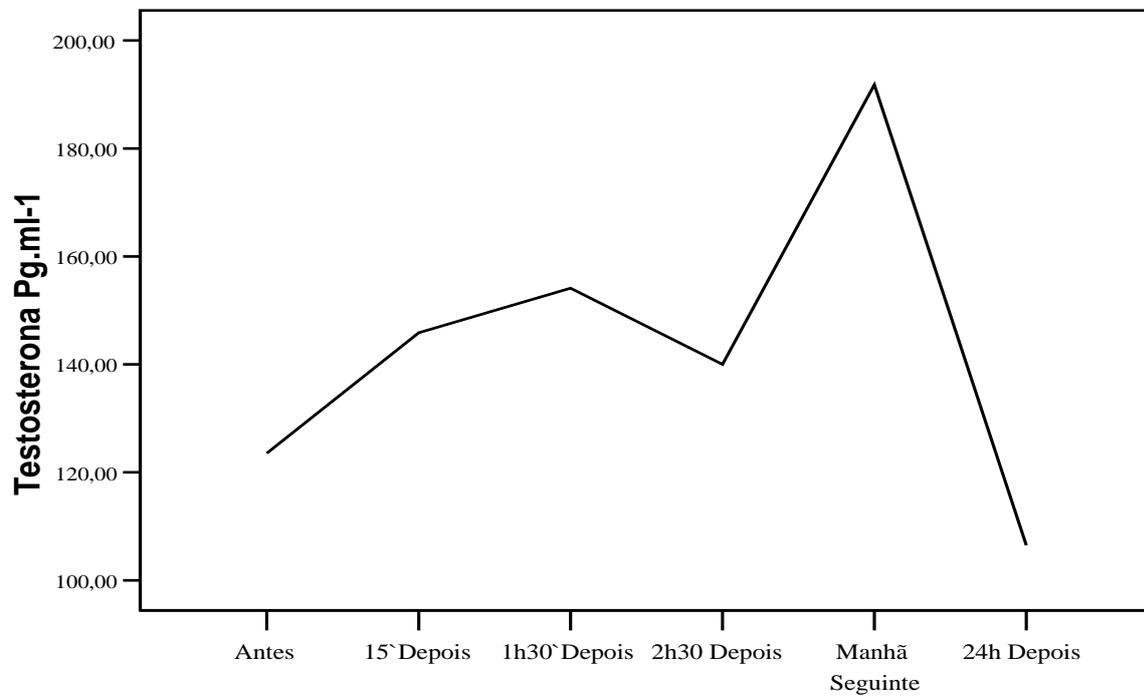
Gráfico da Variação da concentração de Cortisol Salivar ao longo das 24horas



Concentração de Testosterona Salivar

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Test_1	12	68,62	206,77	123,53	41,07
Test_2	12	88,83	215,02	145,85	35,74
Test_3	12	101,47	255,39	154,11	48,93
Tes_4	12	90,94	176,82	140,02	31,10
Test_5	12	139,77	300,99	191,80	41,84
Tes_6	12	36,71	201,87	106,49	40,35

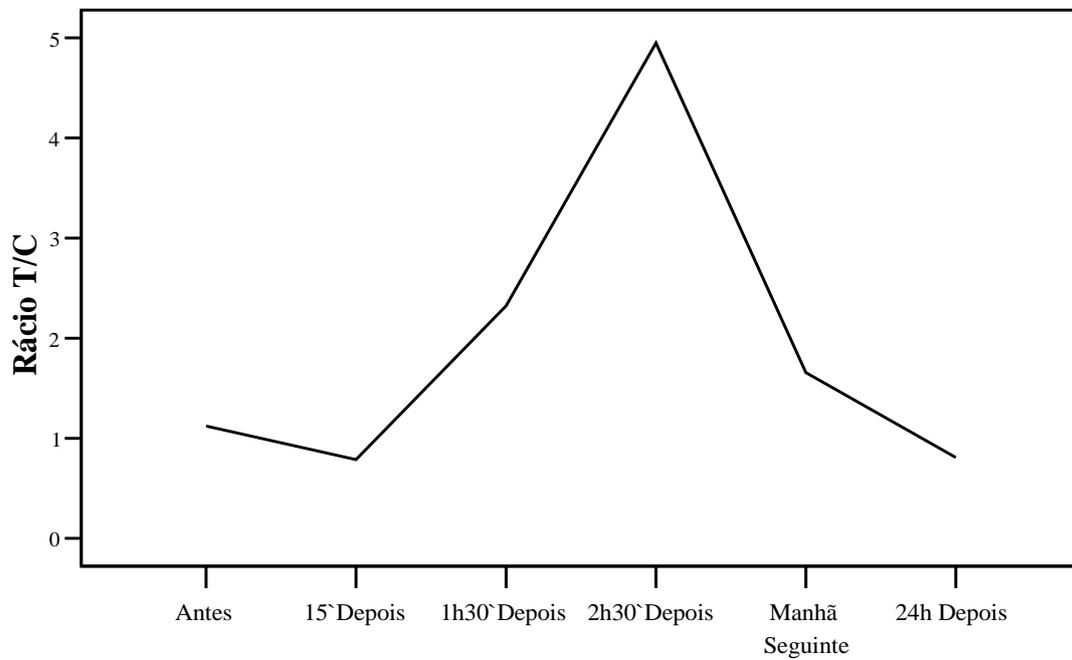
Gráfico da Variação da concentração de Testosterona Salivar ao longo das 24 horas



Rácio Testosterona/ Cortisol

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Rac_1	12	,04	7,71	1,04	2,18
Rac_2	12	,02	4,04	,88	1,20
Rac_3	12	,04	11,26	2,15	3,69
Rac_4	12	,02	32,92	4,54	9,25
Rac_5	11	,02	9,39	1,66	2,76
Rac_6	12	,05	5,31	,98	1,59

Gráfico da Variação do Rácio T/C ao longo das 24horas



Teste não – paramétrico - Wilcoxon Test

		Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cort_2 - Cort_1	Negative Ranks	7(a)	4,57	32,00
	Positive Ranks	5(b)	9,20	46,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Cort_3 - Cort_1	Negative Ranks	7(d)	5,57	39,00
	Positive Ranks	5(e)	7,80	39,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Cort_4 - Cort_1	Negative Ranks	7(g)	5,57	39,00
	Positive Ranks	5(h)	7,80	39,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Cort_5 - Cort_1	Negative Ranks	7(j)	6,00	42,00
	Positive Ranks	5(k)	7,20	36,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Cort_6 - Cort_1	Negative Ranks	5(m)	7,60	38,00
	Positive Ranks	7(n)	5,71	40,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Cort_2 < Cort_1
- b. Cort_2 > Cort_1
- c. Cort_2 = Cort_1
- d. Cort_3 < Cort_1
- e. Cort_3 > Cort_1
- f. Cort_3 = Cort_1
- g. Cort_4 < Cort_1
- h. Cort_4 > Cort_1
- i. Cort_4 = Cort_1
- j. Cort_5 < Cort_1
- k. Cort_5 > Cort_1
- l. Cort_5 = Cort_1
- m. Cort_6 < Cort_1
- n. Cort_6 > Cort_1
- o. Cort_6 = Cort_1

Test Statistics(d)

	Cort_2 - Cort_1	Cort_3 - Cort_1	Cort_4 - Cort_1	Cort_5 - Cort_1	Cort_6 - Cort_1
Z	-,549(a)	,000(b)	,000(b)	-,235(c)	-,078(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,583	1,000	1,000	,814	,937

- a Based on negative ranks.
- b The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.
- c Based on positive ranks.
- d Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cort_2 - Cort_1	Negative Ranks	7(a)	4,57	32,00
	Positive Ranks	5(b)	9,20	46,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Cort_3 - Cort_2	Negative Ranks	6(d)	7,83	47,00
	Positive Ranks	6(e)	5,17	31,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Cort_4 - Cort_2	Negative Ranks	9(g)	6,00	54,00
	Positive Ranks	3(h)	8,00	24,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Cort_5 - Cort_2	Negative Ranks	6(j)	5,83	35,00
	Positive Ranks	6(k)	7,17	43,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Cort_6 - Cort_2	Negative Ranks	7(m)	7,14	50,00
	Positive Ranks	5(n)	5,60	28,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Cort_2 < Cort_1
- b. Cort_2 > Cort_1
- c. Cort_2 = Cort_1
- d. Cort_3 < Cort_2
- e. Cort_3 > Cort_2
- f. Cort_3 = Cort_2
- g. Cort_4 < Cort_2
- h. Cort_4 > Cort_2
- i. Cort_4 = Cort_2
- j. Cort_5 < Cort_2
- k. Cort_5 > Cort_2
- l. Cort_5 = Cort_2
- m. Cort_6 < Cort_2
- n. Cort_6 > Cort_2
- o. Cort_6 = Cort_2

Test Statistics(c)

	Cort_2 - Cort_1	Cort_3 - Cort_2	Cort_4 - Cort_2	Cort_5 - Cort_2	Cort_6 - Cort_2
Z	-,549(a)	-,628(b)	-1,177(b)	-,314(a)	-,863(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,583	,530	,239	,754	,388

- a Based on negative ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cort_3 - Cort_1	Negative Ranks	7(a)	5,57	39,00
	Positive Ranks	5(b)	7,80	39,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Cort_3 - Cort_2	Negative Ranks	6(d)	7,83	47,00
	Positive Ranks	6(e)	5,17	31,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Cort_4 - Cort_3	Negative Ranks	7(g)	6,29	44,00
	Positive Ranks	5(h)	6,80	34,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Cort_5 - Cort_3	Negative Ranks	7(j)	6,29	44,00
	Positive Ranks	5(k)	6,80	34,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Cort_6 - Cort_3	Negative Ranks	6(m)	7,00	42,00
	Positive Ranks	6(n)	6,00	36,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Cort_3 < Cort_1
- b. Cort_3 > Cort_1
- c. Cort_3 = Cort_1
- d. Cort_3 < Cort_2
- e. Cort_3 > Cort_2
- f. Cort_3 = Cort_2
- g. Cort_4 < Cort_3
- h. Cort_4 > Cort_3
- i. Cort_4 = Cort_3
- j. Cort_5 < Cort_3
- k. Cort_5 > Cort_3
- l. Cort_5 = Cort_3
- m. Cort_6 < Cort_3
- n. Cort_6 > Cort_3
- o. Cort_6 = Cort_3

Test Statistics(c)

	Cort_3 - Cort_1	Cort_3 - Cort_2	Cort_4 - Cort_3	Cort_5 - Cort_3	Cort_6 - Cort_3
Z	,000(a)	-,628(b)	-,392(b)	-,392(b)	-,235(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	,530	,695	,695	,814

- a The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cort_4 - Cort_1	Negative Ranks	7(a)	5,57	39,00
	Positive Ranks	5(b)	7,80	39,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Cort_4 - Cort_2	Negative Ranks	9(d)	6,00	54,00
	Positive Ranks	3(e)	8,00	24,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Cort_4 - Cort_3	Negative Ranks	7(g)	6,29	44,00
	Positive Ranks	5(h)	6,80	34,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Cort_5 - Cort_4	Negative Ranks	5(j)	6,60	33,00
	Positive Ranks	7(k)	6,43	45,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Cort_6 - Cort_4	Negative Ranks	5(m)	8,80	44,00
	Positive Ranks	7(n)	4,86	34,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Cort_4 < Cort_1
- b. Cort_4 > Cort_1
- c. Cort_4 = Cort_1
- d. Cort_4 < Cort_2
- e. Cort_4 > Cort_2
- f. Cort_4 = Cort_2
- g. Cort_4 < Cort_3
- h. Cort_4 > Cort_3
- i. Cort_4 = Cort_3
- j. Cort_5 < Cort_4
- k. Cort_5 > Cort_4
- l. Cort_5 = Cort_4
- m. Cort_6 < Cort_4
- n. Cort_6 > Cort_4
- o. Cort_6 = Cort_4

Test Statistics(d)

	Cort_4 - Cort_1	Cort_4 - Cort_2	Cort_4 - Cort_3	Cort_5 - Cort_4	Cort_6 - Cort_4
Z	,000(a)	-1,177(b)	-,392(b)	-,471(c)	-,392(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	,239	,695	,638	,695

- a The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Based on negative ranks.
- d Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cort_5 - Cort_1	Negative Ranks	7(a)	6,00	42,00
	Positive Ranks	5(b)	7,20	36,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Cort_5 - Cort_2	Negative Ranks	6(d)	5,83	35,00
	Positive Ranks	6(e)	7,17	43,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Cort_5 - Cort_3	Negative Ranks	7(g)	6,29	44,00
	Positive Ranks	5(h)	6,80	34,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Cort_5 - Cort_4	Negative Ranks	5(j)	6,60	33,00
	Positive Ranks	7(k)	6,43	45,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Cort_6 - Cort_5	Negative Ranks	4(m)	9,25	37,00
	Positive Ranks	8(n)	5,13	41,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Cort_5 < Cort_1
- b. Cort_5 > Cort_1
- c. Cort_5 = Cort_1
- d. Cort_5 < Cort_2
- e. Cort_5 > Cort_2
- f. Cort_5 = Cort_2
- g. Cort_5 < Cort_3
- h. Cort_5 > Cort_3
- i. Cort_5 = Cort_3
- j. Cort_5 < Cort_4
- k. Cort_5 > Cort_4
- l. Cort_5 = Cort_4
- m. Cort_6 < Cort_5
- n. Cort_6 > Cort_5
- o. Cort_6 = Cort_5

Test Statistics(c)

	Cort_5 - Cort_1	Cort_5 - Cort_2	Cort_5 - Cort_3	Cort_5 - Cort_4	Cort_6 - Cort_5
Z	-,235(a)	-,314(b)	-,392(a)	-,471(b)	-,157(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,814	,754	,695	,638	,875

- a Based on positive ranks.
- b Based on negative ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cort_6 - Cort_1	Negative Ranks	5(a)	7,60	38,00
	Positive Ranks	7(b)	5,71	40,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Cort_6 - Cort_2	Negative Ranks	7(d)	7,14	50,00
	Positive Ranks	5(e)	5,60	28,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Cort_6 - Cort_3	Negative Ranks	6(g)	7,00	42,00
	Positive Ranks	6(h)	6,00	36,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Cort_6 - Cort_4	Negative Ranks	5(j)	8,80	44,00
	Positive Ranks	7(k)	4,86	34,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Cort_6 - Cort_5	Negative Ranks	4(m)	9,25	37,00
	Positive Ranks	8(n)	5,13	41,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Cort_6 < Cort_1
- b. Cort_6 > Cort_1
- c. Cort_6 = Cort_1
- d. Cort_6 < Cort_2
- e. Cort_6 > Cort_2
- f. Cort_6 = Cort_2
- g. Cort_6 < Cort_3
- h. Cort_6 > Cort_3
- i. Cort_6 = Cort_3
- j. Cort_6 < Cort_4
- k. Cort_6 > Cort_4
- l. Cort_6 = Cort_4
- m. Cort_6 < Cort_5
- n. Cort_6 > Cort_5
- o. Cort_6 = Cort_5

Test Statistics(c)

	Cort_6 - Cort_1	Cort_6 - Cort_2	Cort_6 - Cort_3	Cort_6 - Cort_4	Cort_6 - Cort_5
Z	-,078(a)	-,863(b)	-,235(b)	-,392(b)	-,157(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,937	,388	,814	,695	,875

- a Based on negative ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Test_2 - Test_1	Negative Ranks	1(a)	5,00	5,00
	Positive Ranks	10(b)	6,10	61,00
	Ties	1(c)		
	Total	12		
Test_3 - Test_1	Negative Ranks	3(d)	7,00	21,00
	Positive Ranks	9(e)	6,33	57,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Tes_4 - Test_1	Negative Ranks	4(g)	5,25	21,00
	Positive Ranks	8(h)	7,13	57,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Test_5 - Test_1	Negative Ranks	2(j)	1,50	3,00
	Positive Ranks	10(k)	7,50	75,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Tes_6 - Test_1	Negative Ranks	8(m)	6,63	53,00
	Positive Ranks	4(n)	6,25	25,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Test_2 < Test_1
- b. Test_2 > Test_1
- c. Test_2 = Test_1
- d. Test_3 < Test_1
- e. Test_3 > Test_1
- f. Test_3 = Test_1
- g. Tes_4 < Test_1
- h. Tes_4 > Test_1
- i. Tes_4 = Test_1
- j. Test_5 < Test_1
- k. Test_5 > Test_1
- l. Test_5 = Test_1
- m. Tes_6 < Test_1
- n. Tes_6 > Test_1
- o. Tes_6 = Test_1

Test Statistics(c)

	Test_2 - Test_1	Test_3 - Test_1	Tes_4 - Test_1	Test_5 - Test_1	Tes_6 - Test_1
Z	-2,490(a)	-1,412(a)	-1,412(a)	-2,824(a)	-1,098(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013	,158	,158	,005	,272

- a Based on negative ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Test_2 - Test_1	Negative Ranks	1(a)	5,00	5,00
	Positive Ranks	10(b)	6,10	61,00
	Ties	1(c)		
	Total	12		
Test_3 - Test_2	Negative Ranks	6(d)	5,83	35,00
	Positive Ranks	6(e)	7,17	43,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Tes_4 - Test_2	Negative Ranks	7(g)	6,14	43,00
	Positive Ranks	5(h)	7,00	35,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Test_5 - Test_2	Negative Ranks	2(j)	3,50	7,00
	Positive Ranks	10(k)	7,10	71,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Tes_6 - Test_2	Negative Ranks	10(m)	6,80	68,00
	Positive Ranks	2(n)	5,00	10,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Test_2 < Test_1
- b. Test_2 > Test_1
- c. Test_2 = Test_1
- d. Test_3 < Test_2
- e. Test_3 > Test_2
- f. Test_3 = Test_2
- g. Tes_4 < Test_2
- h. Tes_4 > Test_2
- i. Tes_4 = Test_2
- j. Test_5 < Test_2
- k. Test_5 > Test_2
- l. Test_5 = Test_2
- m. Tes_6 < Test_2
- n. Tes_6 > Test_2
- o. Tes_6 = Test_2

Test Statistics(c)

	Test_2 - Test_1	Test_3 - Test_2	Tes_4 - Test_2	Test_5 - Test_2	Tes_6 - Test_2
Z	-2,490(a)	-,314(a)	-,314(b)	-2,510(a)	-2,275(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013	,754	,754	,012	,023

- a Based on negative ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Test_3 - Test_1	Negative Ranks	3(a)	7,00	21,00
	Positive Ranks	9(b)	6,33	57,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Test_3 - Test_2	Negative Ranks	6(d)	5,83	35,00
	Positive Ranks	6(e)	7,17	43,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Tes_4 - Test_3	Negative Ranks	7(g)	7,00	49,00
	Positive Ranks	5(h)	5,80	29,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Test_5 - Test_3	Negative Ranks	4(j)	4,25	17,00
	Positive Ranks	8(k)	7,63	61,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Tes_6 - Test_3	Negative Ranks	9(m)	8,00	72,00
	Positive Ranks	3(n)	2,00	6,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Test_3 < Test_1
- b. Test_3 > Test_1
- c. Test_3 = Test_1
- d. Test_3 < Test_2
- e. Test_3 > Test_2
- f. Test_3 = Test_2
- g. Tes_4 < Test_3
- h. Tes_4 > Test_3
- i. Tes_4 = Test_3
- j. Test_5 < Test_3
- k. Test_5 > Test_3
- l. Test_5 = Test_3
- m. Tes_6 < Test_3
- n. Tes_6 > Test_3
- o. Tes_6 = Test_3

Test Statistics(c)

	Test_3 - Test_1	Test_3 - Test_2	Tes_4 - Test_3	Test_5 - Test_3	Tes_6 - Test_3
Z	-1,412(a)	-,314(a)	-,784(b)	-1,726(a)	-2,589(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,158	,754	,433	,084	,010

- a Based on negative ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tes_4 - Test_1	Negative Ranks	4(a)	5,25	21,00
	Positive Ranks	8(b)	7,13	57,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Tes_4 - Test_2	Negative Ranks	7(d)	6,14	43,00
	Positive Ranks	5(e)	7,00	35,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Tes_4 - Test_3	Negative Ranks	7(g)	7,00	49,00
	Positive Ranks	5(h)	5,80	29,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Test_5 - Tes_4	Negative Ranks	0(j)	,00	,00
	Positive Ranks	12(k)	6,50	78,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Tes_6 - Tes_4	Negative Ranks	9(m)	7,00	63,00
	Positive Ranks	3(n)	5,00	15,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Tes_4 < Test_1
- b. Tes_4 > Test_1
- c. Tes_4 = Test_1
- d. Tes_4 < Test_2
- e. Tes_4 > Test_2
- f. Tes_4 = Test_2
- g. Tes_4 < Test_3
- h. Tes_4 > Test_3
- i. Tes_4 = Test_3
- j. Test_5 < Tes_4
- k. Test_5 > Tes_4
- l. Test_5 = Tes_4
- m. Tes_6 < Tes_4
- n. Tes_6 > Tes_4
- o. Tes_6 = Tes_4

Test Statistics(c)

	Tes_4 - Test_1	Tes_4 - Test_2	Tes_4 - Test_3	Test_5 - Tes_4	Tes_6 - Tes_4
Z	-1,412(a)	-,314(b)	-,784(b)	-3,059(a)	-1,883(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,158	,754	,433	,002	,060

- a Based on negative ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Test_5 - Test_1	Negative Ranks	2(a)	1,50	3,00
	Positive Ranks	10(b)	7,50	75,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Test_5 - Test_2	Negative Ranks	2(d)	3,50	7,00
	Positive Ranks	10(e)	7,10	71,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Test_5 - Test_3	Negative Ranks	4(g)	4,25	17,00
	Positive Ranks	8(h)	7,63	61,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Test_5 - Tes_4	Negative Ranks	0(j)	,00	,00
	Positive Ranks	12(k)	6,50	78,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Tes_6 - Test_5	Negative Ranks	11(m)	7,00	77,00
	Positive Ranks	1(n)	1,00	1,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Test_5 < Test_1
- b. Test_5 > Test_1
- c. Test_5 = Test_1
- d. Test_5 < Test_2
- e. Test_5 > Test_2
- f. Test_5 = Test_2
- g. Test_5 < Test_3
- h. Test_5 > Test_3
- i. Test_5 = Test_3
- j. Test_5 < Tes_4
- k. Test_5 > Tes_4
- l. Test_5 = Tes_4
- m. Tes_6 < Test_5
- n. Tes_6 > Test_5
- o. Tes_6 = Test_5

Test Statistics(c)

	Test_5 - Test_1	Test_5 - Test_2	Test_5 - Test_3	Test_5 - Tes_4	Tes_6 - Test_5
Z	-2,824(a)	-2,510(a)	-1,726(a)	-3,059(a)	-2,981(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005	,012	,084	,002	,003

- a Based on negative ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tes_6 - Test_1	Negative Ranks	8(a)	6,63	53,00
	Positive Ranks	4(b)	6,25	25,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Tes_6 - Test_2	Negative Ranks	10(d)	6,80	68,00
	Positive Ranks	2(e)	5,00	10,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Tes_6 - Test_3	Negative Ranks	9(g)	8,00	72,00
	Positive Ranks	3(h)	2,00	6,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Tes_6 - Tes_4	Negative Ranks	9(j)	7,00	63,00
	Positive Ranks	3(k)	5,00	15,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Tes_6 - Test_5	Negative Ranks	11(m)	7,00	77,00
	Positive Ranks	1(n)	1,00	1,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Tes_6 < Test_1
- b. Tes_6 > Test_1
- c. Tes_6 = Test_1
- d. Tes_6 < Test_2
- e. Tes_6 > Test_2
- f. Tes_6 = Test_2
- g. Tes_6 < Test_3
- h. Tes_6 > Test_3
- i. Tes_6 = Test_3
- j. Tes_6 < Tes_4
- k. Tes_6 > Tes_4
- l. Tes_6 = Tes_4
- m. Tes_6 < Test_5
- n. Tes_6 > Test_5
- o. Tes_6 = Test_5

Test Statistics(b)

	Tes_6 - Test_1	Tes_6 - Test_2	Tes_6 - Test_3	Tes_6 - Tes_4	Tes_6 - Test_5
Z	-1,098(a)	-2,275(a)	-2,589(a)	-1,883(a)	-2,981(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,272	,023	,010	,060	,003

- a Based on positive ranks.
- b Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rac_2 - Rac_1	Negative Ranks	5(a)	6,80	34,00
	Positive Ranks	7(b)	6,29	44,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Rac_3 - Rac_1	Negative Ranks	4(d)	3,25	13,00
	Positive Ranks	8(e)	8,13	65,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Rac_4 - Rac_1	Negative Ranks	6(g)	4,67	28,00
	Positive Ranks	6(h)	8,33	50,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Rac_5 - Rac_1	Negative Ranks	4(j)	6,75	27,00
	Positive Ranks	7(k)	5,57	39,00
	Ties	0(l)		
	Total	11		
Rac_6 - Rac_1	Negative Ranks	7(m)	5,79	40,50
	Positive Ranks	5(n)	7,50	37,50
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Rac_2 < Rac_1
- b. Rac_2 > Rac_1
- c. Rac_2 = Rac_1
- d. Rac_3 < Rac_1
- e. Rac_3 > Rac_1
- f. Rac_3 = Rac_1
- g. Rac_4 < Rac_1
- h. Rac_4 > Rac_1
- i. Rac_4 = Rac_1
- j. Rac_5 < Rac_1
- k. Rac_5 > Rac_1
- l. Rac_5 = Rac_1
- m. Rac_6 < Rac_1
- n. Rac_6 > Rac_1
- o. Rac_6 = Rac_1

Test Statistics(c)

	Rac_2 - Rac_1	Rac_3 - Rac_1	Rac_4 - Rac_1	Rac_5 - Rac_1	Rac_6 - Rac_1
Z	-,392(a)	-2,040(a)	-,863(a)	-,533(a)	-,118(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,695	,041	,388	,594	,906

- a Based on negative ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rac_2 - Rac_1	Negative Ranks	5(a)	6,80	34,00
	Positive Ranks	7(b)	6,29	44,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Rac_3 - Rac_2	Negative Ranks	6(d)	5,33	32,00
	Positive Ranks	6(e)	7,67	46,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Rac_4 - Rac_2	Negative Ranks	3(g)	5,67	17,00
	Positive Ranks	9(h)	6,78	61,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Rac_5 - Rac_2	Negative Ranks	5(j)	4,80	24,00
	Positive Ranks	6(k)	7,00	42,00
	Ties	0(l)		
	Total	11		
Rac_6 - Rac_2	Negative Ranks	5(m)	7,60	38,00
	Positive Ranks	7(n)	5,71	40,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Rac_2 < Rac_1
- b. Rac_2 > Rac_1
- c. Rac_2 = Rac_1
- d. Rac_3 < Rac_2
- e. Rac_3 > Rac_2
- f. Rac_3 = Rac_2
- g. Rac_4 < Rac_2
- h. Rac_4 > Rac_2
- i. Rac_4 = Rac_2
- j. Rac_5 < Rac_2
- k. Rac_5 > Rac_2
- l. Rac_5 = Rac_2
- m. Rac_6 < Rac_2
- n. Rac_6 > Rac_2
- o. Rac_6 = Rac_2

Test Statistics(b)

	Rac_2 - Rac_1	Rac_3 - Rac_2	Rac_4 - Rac_2	Rac_5 - Rac_2	Rac_6 - Rac_2
Z	-,392(a)	-,549(a)	-1,726(a)	-,800(a)	-,078(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,695	,583	,084	,424	,937

- a. Based on negative ranks.
- b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rac_3 - Rac_1	Negative Ranks	4(a)	3,25	13,00
	Positive Ranks	8(b)	8,13	65,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Rac_3 - Rac_2	Negative Ranks	6(d)	5,33	32,00
	Positive Ranks	6(e)	7,67	46,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Rac_4 - Rac_3	Negative Ranks	7(g)	5,14	36,00
	Positive Ranks	5(h)	8,40	42,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Rac_5 - Rac_3	Negative Ranks	5(j)	7,80	39,00
	Positive Ranks	6(k)	4,50	27,00
	Ties	0(l)		
	Total	11		
Rac_6 - Rac_3	Negative Ranks	6(m)	7,83	47,00
	Positive Ranks	6(n)	5,17	31,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Rac_3 < Rac_1
- b. Rac_3 > Rac_1
- c. Rac_3 = Rac_1
- d. Rac_3 < Rac_2
- e. Rac_3 > Rac_2
- f. Rac_3 = Rac_2
- g. Rac_4 < Rac_3
- h. Rac_4 > Rac_3
- i. Rac_4 = Rac_3
- j. Rac_5 < Rac_3
- k. Rac_5 > Rac_3
- l. Rac_5 = Rac_3
- m. Rac_6 < Rac_3
- n. Rac_6 > Rac_3
- o. Rac_6 = Rac_3

Test Statistics(c)

	Rac_3 - Rac_1	Rac_3 - Rac_2	Rac_4 - Rac_3	Rac_5 - Rac_3	Rac_6 - Rac_3
Z	-2,040(a)	-,549(a)	-,235(a)	-,533(b)	-,628(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,041	,583	,814	,594	,530

- a Based on negative ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rac_4 - Rac_1	Negative Ranks	6(a)	4,67	28,00
	Positive Ranks	6(b)	8,33	50,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Rac_4 - Rac_2	Negative Ranks	3(d)	5,67	17,00
	Positive Ranks	9(e)	6,78	61,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Rac_4 - Rac_3	Negative Ranks	7(g)	5,14	36,00
	Positive Ranks	5(h)	8,40	42,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Rac_5 - Rac_4	Negative Ranks	7(j)	6,29	44,00
	Positive Ranks	4(k)	5,50	22,00
	Ties	0(l)		
	Total	11		
Rac_6 - Rac_4	Negative Ranks	8(m)	6,88	55,00
	Positive Ranks	4(n)	5,75	23,00
	Ties	0(o)		
	Total	12		

- a. Rac_4 < Rac_1
- b. Rac_4 > Rac_1
- c. Rac_4 = Rac_1
- d. Rac_4 < Rac_2
- e. Rac_4 > Rac_2
- f. Rac_4 = Rac_2
- g. Rac_4 < Rac_3
- h. Rac_4 > Rac_3
- i. Rac_4 = Rac_3
- j. Rac_5 < Rac_4
- k. Rac_5 > Rac_4
- l. Rac_5 = Rac_4
- m. Rac_6 < Rac_4
- n. Rac_6 > Rac_4
- o. Rac_6 = Rac_4

Test Statistics(c)

	Rac_4 - Rac_1	Rac_4 - Rac_2	Rac_4 - Rac_3	Rac_5 - Rac_4	Rac_6 - Rac_4
Z	-,863(a)	-1,726(a)	-,235(a)	-,978(b)	-1,255(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,388	,084	,814	,328	,209

- a Based on negative ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rac_5 - Rac_1	Negative Ranks	4(a)	6,75	27,00
	Positive Ranks	7(b)	5,57	39,00
	Ties	0(c)		
	Total	11		
Rac_5 - Rac_2	Negative Ranks	5(d)	4,80	24,00
	Positive Ranks	6(e)	7,00	42,00
	Ties	0(f)		
	Total	11		
Rac_5 - Rac_3	Negative Ranks	5(g)	7,80	39,00
	Positive Ranks	6(h)	4,50	27,00
	Ties	0(i)		
	Total	11		
Rac_5 - Rac_4	Negative Ranks	7(j)	6,29	44,00
	Positive Ranks	4(k)	5,50	22,00
	Ties	0(l)		
	Total	11		
Rac_6 - Rac_5	Negative Ranks	7(m)	6,43	45,00
	Positive Ranks	4(n)	5,25	21,00
	Ties	0(o)		
	Total	11		

- a. Rac_5 < Rac_1
- b. Rac_5 > Rac_1
- c. Rac_5 = Rac_1
- d. Rac_5 < Rac_2
- e. Rac_5 > Rac_2
- f. Rac_5 = Rac_2
- g. Rac_5 < Rac_3
- h. Rac_5 > Rac_3
- i. Rac_5 = Rac_3
- j. Rac_5 < Rac_4
- k. Rac_5 > Rac_4
- l. Rac_5 = Rac_4
- m. Rac_6 < Rac_5
- n. Rac_6 > Rac_5
- o. Rac_6 = Rac_5

Test Statistics(c)

	Rac_5 - Rac_1	Rac_5 - Rac_2	Rac_5 - Rac_3	Rac_5 - Rac_4	Rac_6 - Rac_5
Z	-,533(a)	-,800(a)	-,533(b)	-,978(b)	-1,067(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,594	,424	,594	,328	,286

- a Based on negative ranks.
- b Based on positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Rac_6 - Rac_1	Negative Ranks	7(a)	5,79	40,50
	Positive Ranks	5(b)	7,50	37,50
	Ties	0(c)		
	Total	12		
Rac_6 - Rac_2	Negative Ranks	5(d)	7,60	38,00
	Positive Ranks	7(e)	5,71	40,00
	Ties	0(f)		
	Total	12		
Rac_6 - Rac_3	Negative Ranks	6(g)	7,83	47,00
	Positive Ranks	6(h)	5,17	31,00
	Ties	0(i)		
	Total	12		
Rac_6 - Rac_4	Negative Ranks	8(j)	6,88	55,00
	Positive Ranks	4(k)	5,75	23,00
	Ties	0(l)		
	Total	12		
Rac_6 - Rac_5	Negative Ranks	7(m)	6,43	45,00
	Positive Ranks	4(n)	5,25	21,00
	Ties	0(o)		
	Total	11		

- a. Rac_6 < Rac_1
- b. Rac_6 > Rac_1
- c. Rac_6 = Rac_1
- d. Rac_6 < Rac_2
- e. Rac_6 > Rac_2
- f. Rac_6 = Rac_2
- g. Rac_6 < Rac_3
- h. Rac_6 > Rac_3
- i. Rac_6 = Rac_3
- j. Rac_6 < Rac_4
- k. Rac_6 > Rac_4
- l. Rac_6 = Rac_4
- m. Rac_6 < Rac_5
- n. Rac_6 > Rac_5
- o. Rac_6 = Rac_5

Test Statistics(c)

	Rac_6 - Rac_1	Rac_6 - Rac_2	Rac_6 - Rac_3	Rac_6 - Rac_4	Rac_6 - Rac_5
Z	-,118(a)	-,078(b)	-,628(a)	-1,255(a)	-1,067(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,906	,937	,530	,209	,286

- a Based on positive ranks.
- b Based on negative ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test