

Aplicabilidade da espectroscopia vibracional na análise de biópsia líquida após teste de contra-relógio no ciclismo

Applicability of vibrational spectroscopy in the analysis of liquid biopsy after a cycling time-trial test

Leandro dos Santos¹, Marcia Helena Cassago Nascimento², Leonardo Barbosa Leal², Ian Manhoni Baiense², Ana Luiza de Castro Lopes³, Amanda Piaia Silvatti⁴, Richard Diego Leite², Valerio Garrone Barauna²

1. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, PE, Brasil

2. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil

3. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

4. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

RESUMO

Introdução: A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR-FTIR) é uma técnica utilizada para analisar alterações bioquímicas em amostras biológicas. Entretanto, são necessários métodos quimiométricos e uso de ferramentas de inteligência artificial (IA) para análise desses dados. **Objetivo:** Investigar se o ATR-FTIR pode ser usado para caracterizar o perfil bioquímico de atletas antes e após um teste de ciclismo. **Métodos:** Estudo transversal com 10 ciclistas realizando um teste contra o relógio de 20 km. **Resultados:** Os dados de ATR-FTIR combinado com abordagens de reconhecimento de padrões permitiram identificar diferenças bioquímicas entre os momentos pré e pós-teste. Após remoção de duas amostras outliers, análise de componentes principais (PCA) revelou uma separação distinta de pré e pós-teste a partir da região espectral fingerprint (1800 – 900 cm⁻¹). A análise com amostragem pelo método de Monte Carlo associado ao algoritmo genético e análise discriminante (MC-GA-LDA) identificou regiões espectrais específicas relacionadas a essas diferenças, indicando as variações bioquímicas mais relevantes (bandas de 1338-1308, estiramento C-H assimétrico – amida III; e 1125-1108, estiramento assimétrico C-O - lactato). Esses resultados demonstram a sensibilidade do ATR-FTIR em detectar alterações metabólicas e sugerem sua aplicabilidade como ferramenta para monitorar respostas fisiológicas em atividades esportivas. A técnica pode ser útil no acompanhamento personalizado da carga de treinamento e identificação de marcadores específicos de desempenho, fadiga ou estresse fisiológico. **Conclusão:** A técnica espectroscópica ATR-FTIR associada à quimiometria pode ser uma abordagem promissora para caracterizar e distinguir o perfil bioquímico de atletas em resposta a estímulos físicos.

Palavras-chave: ciclismo; espectroscopia vibracional; ATR-FTIR; quimiometria

ABSTRACT

Introduction: Fourier-transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (ATR-FTIR) is a technique that analyzes biochemical changes and monitors physiological responses; however, chemometric methods are required for its analysis. **Aim:** To investigate whether ATR-FTIR, combined with multivariate analyses, can be used to characterize and distinguish the biochemical profile of athletes before and after a cycling test. **Methods:** Cross-sectional study with 10 cyclists performing a 20 km time trial. **Results:** The results revealed that ATR-FTIR, in conjunction with pattern recognition approaches, allowed the identification of biochemical differences between pre- and post-test moments. After the removal of two outlier samples, principal component analysis (PCA) revealed a distinct separation in the fingerprint region of the spectrum. An analysis using a Monte Carlo sampling associated with genetic algorithm-based discriminant analysis (MC-GA-LDA) identified specific spectral regions related to these differences, indicating that the athletes' physiological variations were reflected in the spectra. The most relevant regions were in the bands of 1338-1308, asymmetric C-H stretching that can be assigned to amide III bond, and 1125-1108, asymmetric C-O stretching assigned to lactate biomolecule. These results demonstrate the sensitivity of ATR-FTIR in detecting metabolic changes and suggest its applicability as a tool for monitoring physiological responses. The technique can be useful in personalized training load monitoring and the identification of specific performance, fatigue, or physiological stress markers. **Conclusion:** ATR-FTIR technique combined with multivariate analyses can be a promising approach to characterize and distinguish the biochemical profile of athletes in response to physical stimuli.

Keywords: bicycling; spectroscopy; athlete; FTIR; chemometrics

Recebido em: 30 de março de 2024; Aceito em: 30 de outubro de 2024.

Correspondência: Leandro dos Santos, leandro.santos79@gmail.com

Introdução

A espectroscopia de infravermelho (IV) é um método que mede a absorção de radiação na região do IV dependendo dos grupos funcionais específicos das moléculas presentes na amostra. A radiação IV excita essas moléculas e a frequência dessas vibrações correspondem à frequência da luz absorvida. A base teórica da IV é descrita em detalhes em várias revisões [1-3] e a capacidade de identificar a presença de grupos funcionais é uma das vantagens desta técnica. É uma análise rápida, que requer preparação mínima da amostra, com capacidade de analisar qualquer biofluido em menos de 1 minuto. É considerada uma opção viável para a análise de alterações químicas em processos biológicos e para a avaliação de metabólitos em biofluidos [4]. Embora a espectroscopia de infravermelho não seja tão específica quanto outras técnicas, ela é capaz de analisar a amostra como um todo, no conjunto de todas as macromoléculas presentes (carboidratos, proteínas, lipídios, DNA, RNA...), formando um tipo de impressão digital metabólica da amostra [2,3].

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy-Attenuated Total Reflection, ATR-FTIR*) é um tipo de espectroscopia de infravermelho que tem sido utilizada para uma ampla variedade de estudos na área da saúde. Aplicações recentes incluem análises de sangue total [5], lágrima [6] e isolados específicos como exossomos [7]. O ATR-FTIR também provou ser útil no monitoramento do estresse oxidativo em condições de estresse psicológico crônico em células mononucleares de ratos [8]. Bujok *et al.* [9] usaram o FTIR-ATR na avaliação da oxidação de proteínas no plasma sanguíneo de cavalos após realizar exercício físico. Os resultados obtidos da análise dos espectros por ATR-FTIR foram semelhantes com o ensaio espectrofotométrico padrão ouro de carbonila utilizando DNPH, sugerindo assim o ATR-FTIR como uma ferramenta mais barata e rápida para o estudo da oxidação de proteínas induzidas pelo exercício.

Atletas de alto rendimento contam com treinamento especializado de forma a alcançarem os mais altos níveis de eficiência em suas modalidades. Para alcançar melhores resultados, o excesso de treinamento pode levar esses atletas a um estado conhecido como *overtraining* que resulta no efeito contrário do esperado como a perda de desempenho [10]. A identificação do momento de treinamento que induz melhores resultados ou a queda na produtividade é tênue. Portanto, é fundamental avaliar esses indivíduos ao final de suas atividades, sejam competições ou treinos, a fim de monitorar suas respostas. Existem muitas metodologias para avaliar as respostas bioquímicas dos atletas. É comum medi-los a partir de variáveis cardiorrespiratórias, como o consumo de oxigênio, bem como dos metabólitos no soro e urina (lactato, ureia, creatinina, creatina kinase e corpos cetônicos) [11]. Esses metabólitos estão relacionados às respostas metabólicas durante a atividade. Porém, eles requerem métodos às vezes caros, demorados, além de ser um método para cada metabólito analisado.

A técnica padrão para avaliação desses metabólitos, como ureia, creatinina, glicose e corpos cetônicos na urina, baseia-se em medições colorimétricas (absorção). Nesse processo, um reagente específico reage com a molécula de interesse, que tem absorção em um determinado comprimento de onda e isso é utilizado para identificar e quantificar o componente desejado. A grande desvantagem é que os resultados podem demorar horas ou dias para serem disponibilizados e são inespecíficos para alguns analitos (principalmente proteínas). Há uma busca contínua por uma técnica rápida, minimamente invasiva e com alta sensibilidade e especificidade que possa ser utilizada nessa situação. Uma das vantagens de se utilizar o ATR-FTIR nesse contexto é que ele permite a análise das modificações de todas essas substâncias (macromoléculas) de uma vez só ao invés de analisá-las individualmente [12]. E é devido a essa grande quantidade de informações no espectro de FTIR-ATR que se faz necessário o uso de ferramentas de inteligência artificial e quimiometria para a análise desses dados.

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar se a espectroscopia ATR-FTIR, juntamente com análises de I.A. e quimiométricas, é uma técnica capaz de fornecer uma nova visão bioquímica de caracterização e distinção do perfil de atletas antes e após uma prova de ciclismo.

Métodos

Participantes

Dez ciclistas recreativos, categoria master, do sexo masculino (42 ± 6 anos, 75 ± 7 kg, 174 ± 7 cm) praticantes há 20 ± 10 anos foram convidados a participar do estudo. Participavam de corridas de ciclismo (competitivas) e treinavam ciclismo em média 11 ± 2 horas semanais. Os participantes foram instruídos a se abster de atividades extenuantes pelo menos 72 h antes do Teste de Ciclismo 20 km (TT20), evitar o uso de quaisquer medicamentos analgésicos (anti-inflamatórios) e manter sua ingestão alimentar e hábitos de vida normais ao longo do estudo. Foi informado e assinado por escrito um termo de consentimento além da obtenção de um questionário de história clínica de todos os sujeitos. Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos (59773616.0.0000.5153). Como critérios de inclusão foram convidados ciclistas do sexo masculino com pelo menos 5 anos de experiência em atividades esportivas de competição de nível regional. Como critério de exclusão foram adotados aqueles que usavam algum tipo de esteroide anabolizante, drogas de abuso ou medicamentos com potencial efeito na performance esportiva.

Teste de Ciclismo (TT20)

Os ciclistas realizaram um aquecimento de 10 minutos com pedal livre, em ritmo próprio, e depois mais 5 minutos de descanso. Em seguida, os participantes realizaram um teste contrarrelógio individualizado de 20 km usando suas bicicletas acopladas a um *CompuTrainer ProLab 3D* (Racermate), que mediu o desempenho du-

rante o teste. Todos foram instruídos a terminar o TT20 o mais rápido possível. Foi fornecido um incentivo verbal durante todo o evento, mas estavam cegos para feedback como tempo, cadência, potência e frequência cardíaca, pois esses poderiam interferir no esforço de estimulação. O percurso foi configurado no *software Computrainer 3D* com controle automático do modo de carga constante, além disso foi configurado um peso (bicicleta + ciclista) individualmente. O teste de ciclismo foi realizado no Laboratório de Força e Condicionamento (LAFEC) da Universidade Federal do Espírito Santo com temperatura controlada entre 20°C e 22°C.

Análise da frequência cardíaca

A frequência cardíaca (FC) foi monitorada durante o teste usando o transmissor de frequência cardíaca H7 Bluetooth ao redor do tórax abaixo do peitoral maior (Polar, EUA) e conectado ao *software HRV*[®]. Os dados registrados foram posteriormente analisados por meio de um programa de computador (*software Kubios, HRV standard 3.3.0*[®]), que permite a seleção de períodos específicos da corrida. A frequência cardíaca máxima (FC_{máx}) foi determinada pela FC mais alta alcançada e mantida por 30 segundos durante o teste.

Percepção subjetiva de esforço

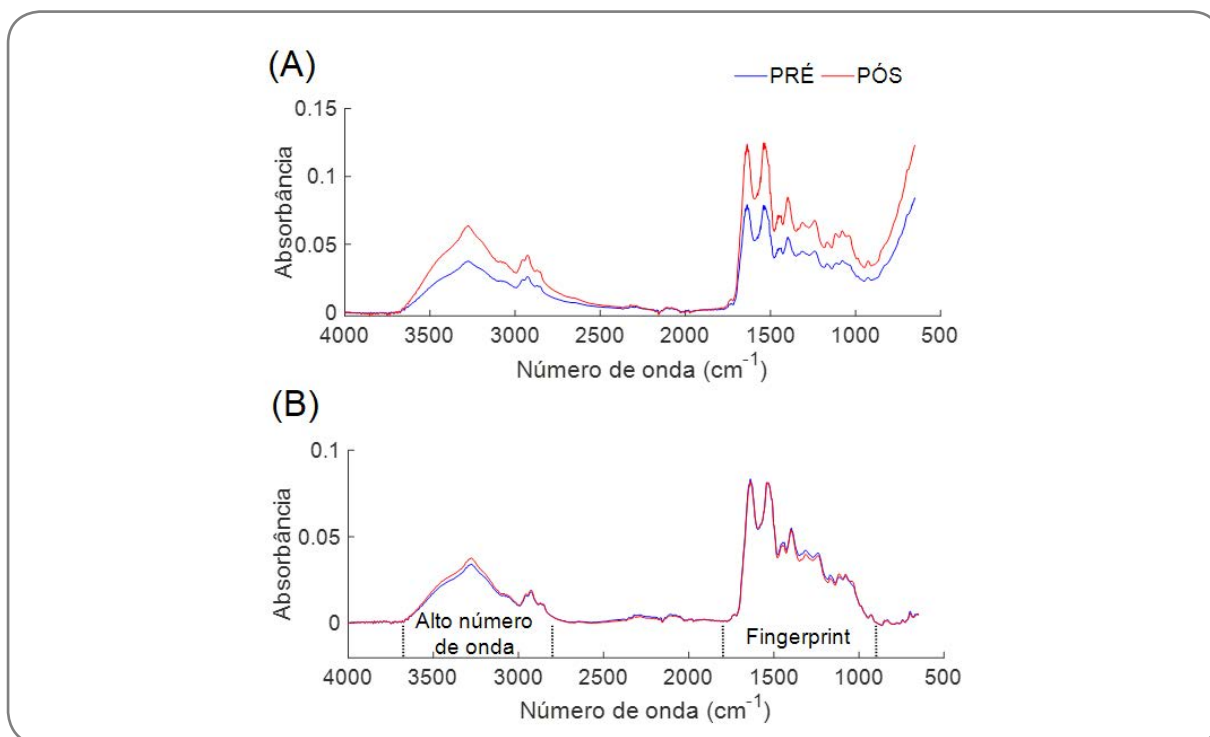
Ao final do TT20, os participantes foram questionados sobre a percepção subjetiva de esforço utilizando a escala de Borg (1-10), sendo 1 correspondente a “sem esforço” e 10 a “esforço máximo/extremo” [13].

Espectroscopia vibracional

A instrumentação da espectroscopia vibracional por infravermelho médio compreende um espectrômetro (*Cary 630 FTIR, Agilent Technologies*) acoplado com um complemento de ATR e cristal de diamante. Os espectros obtidos foram registrados com range de comprimento de número de onda de 650 a 4000 cm⁻¹, com a utilização de 32 espectros para o background e a análise das amostras. Cada espectro contém 1798 pontos de análise (resolução espectral de 1,86 cm⁻¹).

Para realização da espectroscopia, 10µl de plasma dos momentos pré-intervenção (PRÉ) e pós-intervenção (PÓS) foram pipetados três vezes em folha de papel alumínio, em seu lado brilhante; as amostras ficaram em temperatura ambiente “overnight” para secagem. Após secas, as amostras foram analisadas diretamente no cristal, em triplicata, com auxílio da prensa do equipamento, a qual faz uma pressão contínua e igualitária para todas as amostras. Ao final de cada análise, o cristal foi limpo com água deionizada e álcool 70% para remoção de resíduos da amostra anterior.

A figura 1 mostra os espectros brutos e pré-processados antes e após o TT20. A figura 1A representa a média dos espectros brutos no momento PRÉ e PÓS teste, a figura 1B representa a média dos espectros pré-processados com correção de linha de base, suavização Savitzky-Golay e normalização vetorial.



(A) Espectro médio bruto. (B) Espectro médio após pré-processamentos (correção de linha de base, suavização Savitzky-Golay e normalização vetorial) com identificação das regiões de alto número de ondas (4000 - 2800 cm^{-1}) e *Fingerprint* (1800 - 900 cm^{-1}). Cada espectro é formado por 1798 pontos de análise

Figura 1 - Representação dos espectros de plasma no momento antes do TT20 (PRÉ) e imediatamente após (PÓS)

Análise estatística

Os dados biológicos são apresentados como média e desvio padrão. Para análises de IA e quimiometria foi utilizado o software MathLab2020. Todos os espectros foram pré-processados com correção de linha de base, suavização Savitzky-Golay e normalização.

A Análise de Componentes Principais (PCA) é um modelo de reconhecimento de padrões desenvolvido para identificar possíveis amostras anômalas, visualizar semelhanças e possíveis agrupamentos naturais entre amostras e analisar o comportamento e a dispersão de variáveis espectrais [14].

Para seleção de variáveis foi utilizado o método algoritmo genético baseado na análise discriminante com amostragem pelo método de Monte Carlo (MC-GA-LDA) que é uma associação do método de amostragem Monte Carlo (MC) com o algoritmo genético baseado na análise discriminante (GA-LDA).

O método MC é conhecido como método estatístico para resolver problemas diversos por meio de amostragem aleatória utilizando a distribuição de probabilidade do conjunto amostral. GA-LDA utiliza a razão de Fisher como métrica de seleção de subconjuntos de variáveis que maximizam a separação entre as classes [15,16]. A associação da amostragem MC com GA-LDA foi aplicada no presente estudo para selecionar as variáveis que discriminam as variações fisiológicas nos indivíduos PRÉ e PÓS TT20 e que sejam refletidas no espectro de infravermelho das amostras. Para

isso, o conjunto de dados com todos os espectros médios foi submetido a 800 amostragens aleatórias e seleção pelo GA-LDA iterativamente. A cada iteração uma seleção de variáveis foi realizada pelo GA-LDA identificando as variáveis que maximizam a separação entre as classes.

A frequência relativa de seleção de cada variável foi calculada ao final das iterações (N = 800). A seleção final corresponde às variáveis de maiores valores de frequência relativa ao final das 800 iterações.

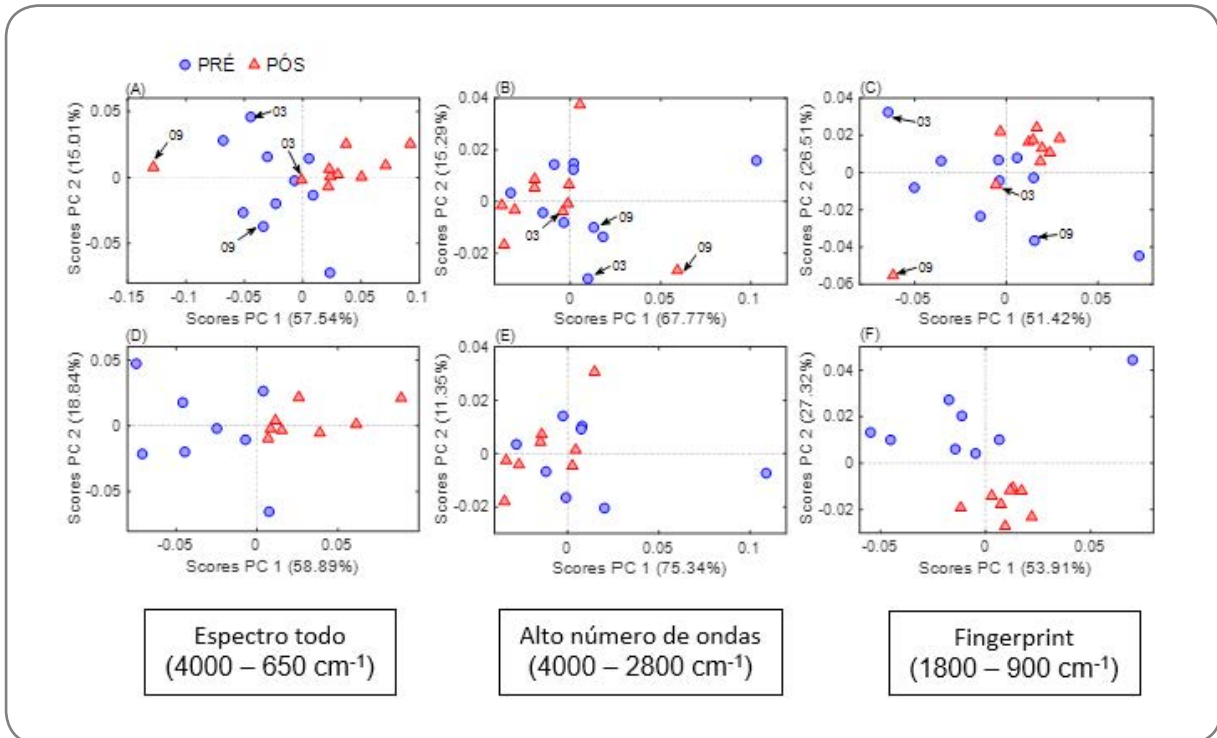
Resultados

Inicialmente precisávamos nos certificar que os voluntários realmente tivessem se esforçado ao máximo durante o TT20. Os 10 sujeitos incluídos no estudo completaram a prova com tempo médio de $33,4 \pm 1,7$ minutos. A percepção subjetiva de esforço, avaliada pela escala de Borg, ao final do TT20 foi de $9,1 \pm 0,9$ e a FC máxima atingida foi de 182 ± 13 bpm, o que equivale a $102 \pm 3\%$ da FC máxima estimada pela idade ($220 - \text{idade}$). Esses dados sugerem que os sujeitos realmente fizeram esforço máximo durante o TT20.

Para identificar se o ATR-FTIR é capaz de diferenciar as amostras do momento PRÉ e PÓS TT20 baseado apenas nas características do espectro de infravermelho no plasma, a primeira análise foi a não-supervisionada pela PCA. A análise foi realizada considerando todas as 1798 características do espectro (Figura 2A $4000-900 \text{ cm}^{-1}$) e em regiões específicas chamadas de região de Alto Número de Ondas (Figura 2B, $4000-2800 \text{ cm}^{-1}$) e região de *Fingerprint* (Figura 2C, $1800-900 \text{ cm}^{-1}$). Em nenhum dos casos houve clara separação dos momentos PRÉ e PÓS. Porém, após uma análise individualizada foi possível observar que em todos as situações as amostras 3 e 9 do PÓS foram as que não permitiram uma completa separação dos momentos. Ou seja, análise de PCA nos espectros desses 2 indivíduos não condiziam com o restante dos grupos (setas nas Figuras 2A, 2B e 2C).

Assim, como próximo passo, essas amostras foram retiradas, e repetida a PCA (espectro total, figura 2D; alto número de ondas, figura 2E e *fingerprint*, figura 2F). Já com o espectro total (Figura 2D) observamos a separação entre os grupos (eixo da PC1 explicando 58,8% da variância das amostras).

A seguir a pergunta foi sobre qual é a região do espectro responsável por essa separação e, assim, o espectro foi analisado novamente como 2 partes separadas (alto número de ondas e *fingerprint*). Observamos, então, que a separação foi apenas observada na região de *fingerprint* (Figura 2F, eixo da PC2, 27,3% da variância) e não a de alto número de ondas (figura 2E). Importante ressaltar esse resultado uma vez que essa região de *fingerprint* ($1800-900 \text{ cm}^{-1}$) é a região que contém maior quantidade de informações em amostras biológicas [3].



(A), (B) e (C): modelos a partir de espectros de todos os 10 sujeitos; (D), (E) e (F): modelos a partir de espectros após a remoção de amostras 03 e 09 ($n = 16$). Em azul momento PRÉ e em vermelho momento PÓS

Figura 2 - Gráfico de scores de PC 1 versus PC2 de modelos PCA

Após essa série de análises exploratórias não-supervisionadas, investigamos, através do MC-GA-LDA quais das 1798 variáveis (regiões do espectro) eram as responsáveis por essa distinção entre os momentos PRÉ e PÓS TT20. A análise de MC-GA-LDA é uma técnica de IA que combina dois algoritmos: GA, uma técnica de otimização inspirada na seleção natural, onde soluções candidatas evoluem através de mutação e recombinação para encontrar o melhor modelo; e LDA, um algoritmo probabilístico que identifica variáveis latentes em um conjunto de dados. Por fim, o método MC se refere ao número de vezes que uma simulação aleatória é repetida para estimar o valor real que uma variável do espectro realmente tenha relevância. Quanto mais iterações forem realizadas, mais precisa será a estimativa. É uma técnica probabilística amplamente utilizada que funciona através da simulação de cenários aleatórios para calcular a probabilidade de diferentes resultados. Nesse nosso estudo, realizamos 800 iterações, ou seja, o modelo foi repetido 800 vezes e as duas regiões espectrais de maior destaque (maiores valores de frequência relativa) foram as de $\sim 1338-1310 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1125-1108 \text{ cm}^{-1}$. As outras regiões que se destacam com valores medianos de frequência relativa (~ 0.4 e 0.3) foram as regiões de $\sim 1041-1026 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 965-922 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 3). A tabela I mostra as atribuições químicas dessas regiões identificadas.

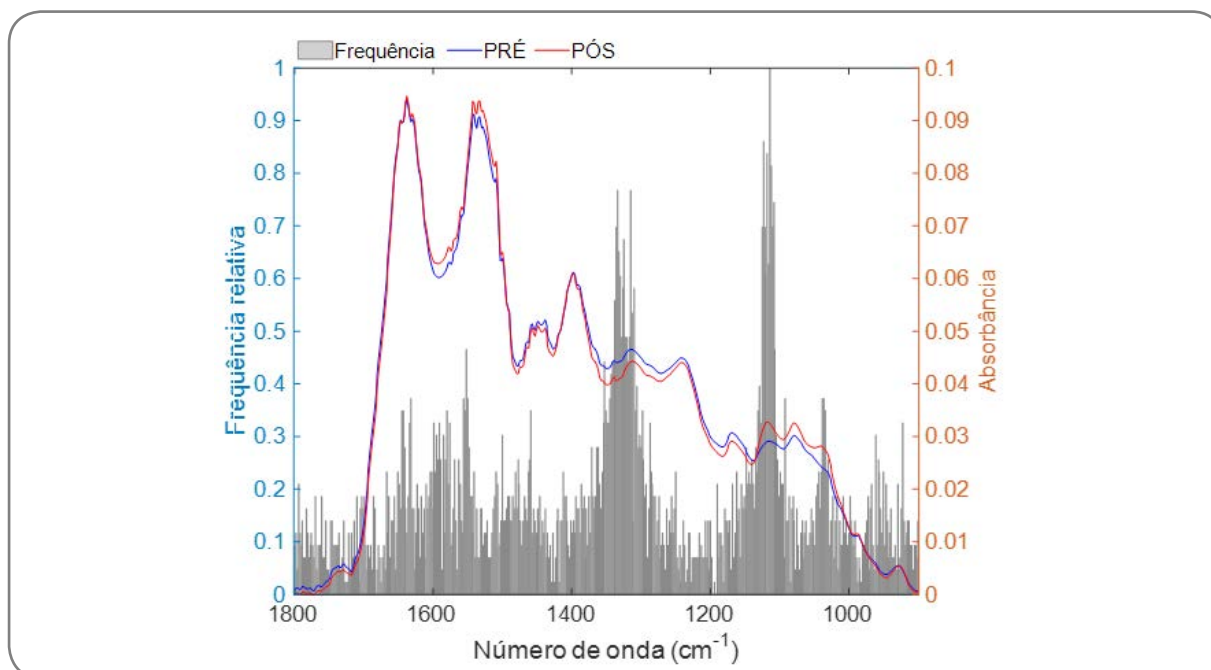


Figura 3 - Frequência relativa da seleção das variáveis pelo método Monte Carlo GA-LDA com 800 iterações

As regiões de maior destaque (maiores valores de frequência relativa) são de 1338 a 1310 cm^{-1} e 1125 a 1108 cm^{-1} . As outras regiões que se destacam são as regiões de 1041 a 1026 cm^{-1} e 965 a 922 cm^{-1} .

Tabela I - Atribuição química das principais regiões do espectro de FTIR selecionadas pelo método Monte Carlo GA-LDA com 800 iterações

Posição do pico (cm^{-1})	Vibração molecular	Provável atribuição
1338-1310 cm^{-1}	CH_2	Colágeno, Amida III
1125-1108 cm^{-1}	C-O	Lactato
1041-1026 cm^{-1}	C-OH	Carboidrato
965-922 cm^{-1}	PO_4^-	DNA, RNA, Fosfolípidos

Discussão

Como resultado do estudo, foi possível observar que a técnica de espectroscopia vibracional no infravermelho, ATR-FTIR, foi capaz de identificar diferenças no perfil bioquímico da amostra entre o momento PRE e PÓS TT20. Além disso, pelas análises de IA e quimiometria, foi possível indicar que essas diferenças são predominantemente na região de *fingerprint* do espectro, mais especificamente nos comprimentos de 1338 a 1310 cm^{-1} (CH_2), 1125 a 1108 cm^{-1} (C-O), 1041 a 1026 cm^{-1} (C-OH) e 965 a 922 cm^{-1} (PO_4^-).

Em 2003, Petibois e Délérís usaram o ATR-FTIR para obter uma análise global do metabolismo energético de nadadores durante uma prova de 400m analisando o plasma pelo ATR-FTIR a cada 100 metros. Os autores concluíram que o FTIR permitiu obter uma descrição global das alterações do conteúdo sanguíneo durante a prova.

Uma das grandes vantagens do uso do FTIR é que ele pode ser feito com a coleta de sangue capilar (sangue coletado na ponta do dedo e não via punção venosa) que respeita o conforto do atleta e permite obter análises sucessivas em curtos períodos de tempo. Os autores concluíram que a região de maior alteração foi a de 1300-900 cm^{-1} , similar aos dados encontrados no presente estudo, região também conhecida por representar a maioria das moléculas bioenergéticas circulantes como açúcares [17].

Já Khaustova *et al.* [18] utilizaram a saliva para monitorar o estresse fisiológico em 48 atletas condicionados ($\text{VO}_{2\text{máx}} = 58.9 \pm 10.1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$). O espectro de FTIR foi obtido na saliva antes, imediatamente após e 30 minutos após um teste máximo escalonado. Os autores mostraram que o método permite determinar as concentrações de substâncias presentes na saliva, porém, de forma mais barata e sem preparação de amostra e reagentes, a partir do volume mínimo da amostra e (quase) imediatamente após a coleta da amostra. Nesse estudo as alterações na concentração de proteínas totais, cortisol, alfa-amilase, imunoglobulina A, ureia e fosfato foram analisadas e comparadas com os métodos padrão ouro.

Similar com os dados encontrados pelo nosso grupo, Caetano Junior *et al.* também identificaram 2 indivíduos entre 13 atletas de Rugby pela técnica de FTIR, coletado na saliva, cujo comportamento do espectro no momento pós-teste não foi discriminante do momento pré-teste. Os 2 indivíduos nesse estudo obtiveram resposta de FC inferiores à média do grupo, o que sugeriu um esforço menor desses indivíduos durante o teste em relação aos outros voluntários [19].

No presente estudo, analisando os dados individuais dos dois indivíduos (03 e 09) também foi observado que eles tinham características distintas do resto do grupo: o indivíduo 03 era o mais velho (54 anos), com menor IMC (20,6 vs. média de 25,2), com mais tempo de treinamento (40 anos vs. média de 22 anos) e terminou o teste com a menor $\% \text{FC}_{\text{máx}}$ (91% vs média de 102%). Já o indivíduo 09 teve o resultado mais discrepante, pois obteve o pior desempenho entre os 10 voluntários, terminando o teste com 36,5 minutos (média do estudo 33,5 minutos). Assim, acredita-se que o perfil químico deles no momento PÓS não se diferenciou do momento PRÉ na análise do PCA pelos indivíduos não terem realmente chegado ao seu limite. Identificamos aí então uma possível aplicação dessa técnica. Estariam esses atletas desmotivados para o teste? Ou em overtraining? Apesar de não termos demais dados para explicar, é fato que o FTIR identificou esses 2 indivíduos com apenas 10 μl de plasma e em menos de 1 hora.

Já em 2022, Chrimatopoulos *et al.* [20] utilizaram o ATR-FTIR acoplado a IA (PCA e PLS-DA) para, através dos espectros obtidos na saliva de atletas de diferentes níveis de condicionamento físico, determinar as alterações bioquímicas após o exercício. Os autores também identificaram regiões semelhantes as nossas nesse trabalho sendo as regiões de 921 cm^{-1} (lipídios/fosfolipídios/carboidratos da membrana) e 1080 cm^{-1} (açúcares) as principais modificadas após o exercício físico. Os autores sugerem que a análise pelo ATR-FTIR de amostras de saliva poderá distinguir com precisão o nível de condicionamento físico dos atletas.

E mais recentemente, em 2024, Souza *et al.* [21] usaram o ATR-FTIR para distinguir as alterações bioquímicas induzidas por diferentes tipos de exercício: treinamento intervalado de alta intensidade, exercício contínuo e treinamento de força. Os autores usaram algoritmos de aprendizagem de máquinas mais robustos como *Naive Bayes*, *Floresta Aleatória*, *K-NN*, *AdaBoost*, *Support Vector Machine*, *Neural Network* e *Regressão Logística* para interpretar os espectros. Os autores observaram que os componentes bioquímicos mudaram especificamente de acordo com cada tipo de exercício. Assim, modos vibracionais espectrais foram identificados como potenciais biomarcadores para cada tipo de exercício realizado.

O presente grupo de pesquisa já vem trabalhando com o uso dessa ferramenta (ATR-FTIR) para a identificação de condições patológicas como sobrecarga de ferro, COVID e sepse [6,22-25], mas este estudo foi o primeiro que utilizou a ferramenta em uma condição fisiológica como o exercício físico.

Neste estudo foi demonstrado que com os dados de FTIR e uma análise multivariada não-supervisionada foi possível distinguir os momentos PRÉ do momento PÓS-TT20. Além disso, foi possível a observação das regiões do espectro responsáveis por essa identificação diferencial dos dois momentos, sendo ela na região de *finger-print* e não na região de alto número de onda. Portanto, o estudo abre a possibilidade para a aplicabilidade do FTIR como uma ferramenta de acompanhamento de carga de treino personalizada ou mesmo como um marcador de determinada resposta biológica como desempenho, fadiga, dano ou estresse fisiológico uma vez que a ferramenta se mostrou sensível para detectar variações individuais de momento a momento. Uma vez identificado essa assinatura digital numa condição de overtraining, com uma simples coleta de sangue capilar ou saliva, por exemplo, seguido de uma análise no equipamento por não mais que 15 minutos seguida de análise computacional, será possível dar o diagnóstico da condição do indivíduo quase que instantaneamente.

Conclusão

Os resultados mostraram que é possível diferenciar bioquimicamente e classificar o estado fisiológico de atletas em treinamento físico pelo ATR-FTIR, utilizando PCA e GA-LDA. Além disso, por meio de análises multivariadas, pode-se identificar os picos dos espectros que sofreram alteração após o estresse físico e essas alterações estão relacionadas a variações de moléculas orgânicas devido a mudança do estado fisiológico. Esses resultados demonstram a sensibilidade da tecnologia em detectar de maneira generalizada alterações no metabolismo e sugere a possibilidade de poder ser usada como uma forma de acompanhar as adaptações em um atleta ao longo do treinamento. No entanto é necessário que sejam realizados outros estudos com tamanho amostral maior para poder avaliar melhor os padrões nos espectros associados a melhora ou piora no desempenho, maior ou menor dano muscular, ou melhor ou pior resposta cardiovascular, por exemplo, em praticantes de alguma modalidade de exercício físico regular.

Agradecimentos

Agradecemos a colaboração com o LabPetro que nos cedeu o ATR-FTIR para as análises, bem como toda a equipe técnica do Laboratório de Instrumentação

Potencial conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse

Fontes de financiamento

Barauna VG é bolsista de produtividade em pesquisa PQ-CNPq (2023). O estudo foi financiado pelos editais: PROFIX-FAPES (#711/2022), UNIVERSAL-FAPES (#979/2023), PRONEM-FAPES (#019/2022) e IA2-CNPq (#54/2022)

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Barauna VG, Silvatti AP, Leite RD; Coleta de dados: Leal LB, Baiense IM, Lopes ALC; Análise e interpretação dos dados: Leal LB, Baiense IM, Lopes ALC, Santos L, Nascimento MH; Análise estatística: Nascimento MH, Leal LB; Redação do manuscrito: Santos L, Barauna VG; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Leal LB, Baiense IM, Lopes ALC, Santos L, Nascimento MH, Barauna VG, Silvatti AP, Leite RD

Referências

1. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2008;43(2):134-79. doi: 10.1080/05704920701829043
2. Cunha BR, Ramalhet L, Fonseca LP, Calado CRC. Fourier-Transform Mid-Infrared (FT-MIR) Spectroscopy in Biomedicine. *Essential Techniques for Medical and Life Scientists*. 2020;1:1-39. doi: 10.2174/9789811464867120010004
3. Theakstone AG, Rinaldi C, Butler HJ, Cameron JM, Confield LR, Rutherford SH, *et al.* Fourier-transform infrared spectroscopy of biofluids: A practical approach. *Translational Biophotonics*. 2021;3(e202000025):1-20. doi: 10.1002/tbio.202000025
4. Mitchell AL, Gajjar KB, Theophilou G, Martin FL, Martin-Hirsch PL. Vibrational spectroscopy of biofluids for disease screening or diagnosis: translation from the laboratory to a clinical setting. *J Biophotonics*. 2014;7(3-4):153-65. doi: 10.1002/jbio.201400018
5. Hughes C, Brown M, Clemens G, Henderson A, Monjardez G, Clarke NW, *et al.* Assessing the challenges of Fourier transform infrared spectroscopic analysis of blood serum. *J Biophotonics*. 2014;7(3-4):180-8. doi: 10.1002/jbio.201300167
6. Borchman D, Foulks GN, Yappert MC, Tang D, Ho DV. Spectroscopic evaluation of human tear lipids. *Chem Phys Lipids*. 2007;147(2):87-102. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2007.04.001
7. Martins TS, Magalhães S, Rosa IM, Vogelgsang J, Wiltfang J, Delgadillo I, *et al.* Potential of FTIR spectroscopy applied to exosomes for Alzheimer's disease discrimination: a pilot study. *Journal of Alzheimer's Disease* 2020;74(1):391-405. doi: 10.3233/JAD-191034
8. Grigoruță M, Vargas-Caraveo A, Vázquez-Mayorga E, Castillo-Michel HA, Díaz-Sánchez ÁG, Reyes-Herrera J, *et al.* Blood mononuclear cells as speculum of emotional stress analyzed by synchrotron infrared spectroscopy and a nootropic drug. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018;204:475-83. doi: 10.1016/j.saa.2018.06.075
9. Bujok J, Gašior-Głogowska M, Marszałek M, Trochanowska-Pauk N, Zigo F, Pavlák A, *et al.* Applicability of FTIR-ATR Method to Measure Carbonyls in Blood Plasma after Physical and Mental Stress. *Biomed Res Int*. 2019;2019(2181370):1-9. doi: 10.1155/2019/2181370
10. Meeusen R, Duclos M, Foster C, Fry A, Gleeson M, Nieman D, *et al.* Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;45(1):186-205. doi: 10.1249/MSS.0b013e318279a10a
11. Mohabbati-Kalejahi E, Azimirad V, Bahrami M, Ganbari A. A review on creatinine measurement techniques. *Talanta*. 2012;97:1-8. doi: 10.1016/j.talanta.2012.04.005
12. Koczoń P, Hołaj-Krzak JT, Palani BK, Bolewski T, Dąbrowski J, Bartyzel BJ, *et al.* The analytical pos-

- sibilities of FT-IR spectroscopy powered by vibrating molecules. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2):1013. doi: 10.3390/ijms24021013
13. Silva RA, Silva-Júnior FL, Pinheiro FA, Souza PF, Boullosa DA, Pires FO. Acute prior heavy strength exercise bouts improve the 20-km cycling time trial performance. *J Strength Cond Res.* 2014;28(9):2513–20. doi: 10.1519/JSC.0000000000000442
14. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *The Royal Society.* 2016;374(20150202):1–16. doi: 10.1098/rsta.2015.0202
15. Cui M, Prasad S, Mahrooghy M, Bruce LM, Aanstoos J. Genetic algorithms and Linear Discriminant Analysis based dimensionality reduction for remotely sensed image analysis. 2011 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium, Vancouver, BC, Canada, 2011, pp. 2373–6. Available at: https://www.cavs.msstate.edu/publications/docs/2011/07/9003cui_igarss2011.pdf
16. Tang KS, Man KF, Kwong S, He Q. Genetic algorithms and their applications. *IEEE Signal Processing Magazine.* 1996;13(6):22–37. doi: 10.1109/79.543973
17. Petibois C, Délérís G. Fourier-transform infrared spectrometry determination of the metabolic changes during a maximal 400-meter swimming test. *Int J Sports Med.* 2003;24(5). doi: 10.1055/s-2003-40707
18. Khaustova S, Shkurnikov M, Tonevitsky E, Artyushenko V, Tonevitsky, A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *Analyst.* 210;135(12):3183–92. doi: 10.1039/c0an00529k
19. Caetano Júnior PC, Lemes LC, Aguiar JC, Strixino JF, Raniero L. Application of FT-IR spectroscopy to assess physiological stress in rugby players during fatigue test. *Rev Biomed Eng.* 2016;32(2):123–8. doi: 10.1590/2446-4740.05315
20. Chrimatopoulos C, Pavlou E, Kourkoumelis N, Sakkas V. Discriminating the salivary profile of athletes using ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 2022;230:104660. doi: 10.1016/j.chemolab.2022.104660
21. Souza AV, Teixeira RR, Caixeta DC, Silva ATF, Gonçalves LCO, Giolo JS, *et al.* Salivary spectral signature using ATR-FTIR spectroscopy in different exercise protocols. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2024;320:124599. doi: 10.1016/j.saa.2024.124599
22. Nascimento MHC, Marcarini WD, Folli GS, Silva Filho WG, Barbosa LL, Paulo EH, *et al.* Noninvasive diagnostic for COVID-19 from saliva biofluid via FTIR Spectroscopy and Multivariate Analysis. *Analytical Chemistry.* 2022;94(5):2425–33. doi: 10.1021/acs.analchem.1c04162
23. Barauna VG, Singh MN, Barbosa LL, Marcarini WD, Vassallo PF, Mill JG, *et al.* Ultrarapid on-site detection of SARS-CoV-2 infection using simple ATR-FTIR spectroscopy and an analysis algorithm high sensitivity and specificity. *Analytical Chemistry.* 2021;93(5):2950–2958. doi: 10.1021/acs.analchem.0c04608
24. Pinto GC, Leal LB, Magalhães NC, Pereira MF, Vassallo PF, Pereira TM, *et al.* The potential of FT-IR spectroscopy for improving healthcare in sepsis - An animal model study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;34(02312). doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102312
25. Nogueira MS, Leal LB, Marcarini WD, Pimentel RL, Muller M, Vassallo PF, *et al.* Rapid diagnosis of COVID-19 using FT-IR ATR spectroscopy and machine learning. *Sci Rep.* 2021;11(1):15409. doi: 10.1038/s41598-021-93511-2

