

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS  
E NUTRIÇÃO**

**GABRIELLY COSTA CAIXETA**

**OLIVIA LOPES LUCIER**

**ANÁLISE DE ESPECTRO ATR-FTIR DE AMOSTRAS DE  
SANGUE E SALIVA DE INDIVÍDUOS COM TRANSTORNO  
DO ESPECTRO AUTISTA**

**CAMPO GRANDE  
2024**

GABRIELLY COSTA CAIXETA  
OLIVIA LOPES LUCIER

**ANÁLISE DE ESPECTRO ATR-FTIR DE AMOSTRAS DE  
SANGUE E SALIVA DE INDIVÍDUOS COM TRANSTORNO  
DO ESPECTRO AUTISTA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição -FACFAN, da  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto

CAMPO GRANDE  
2024

GABRIELLY COSTA CAIXETA

OLIVIA LOPES LUCIER

**ANÁLISE DE ESPECTRO ATR-FTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE E SALIVA DE  
INDIVÍDUOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição - FACFAN, da  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul -  
UFMS, como requisito parcial para a obtenção do  
título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto

Campo Grande, 25 de novembro de 2024

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto – UFMS – Orientador

---

Prof. Dra. Thalita Bachelli Riul– UFMS

---

Prof. Dr. Éverton do Nascimento Alencar – UFMS

---

MSc. Isabelly Teixeira Espinoça – Suplente

Aos que na infância não foram compreendidos, que o diagnóstico tardio não seja mais realidade em nosso país e que cada dia seja uma oportunidade de celebrar suas singularidades e encontrar seu lugar no mundo.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar e mostrar que seus planos são maiores do que os meus.

À minha família, por ser o meu suporte.

Aos meus pais, pelo privilégio de estudar.

À minha mãe, por acordar de madrugada todos os dias para me acompanhar até o ponto de ônibus.

Ao meu pai por me ensinar os valores da vida.

A minha Vó Maria, por me mostrar que a nossa maior sabedoria não está nos livros.

Ao meu avô, por ser o meu primeiro desafio como paciente.

A minha Vó Alzira, por valorizar os meus estudos.

Aos meus Padrinhos, por acreditarem em mim.

Aos meus irmãos por entenderem os esforços e abdições durante os anos de estudo.

Ao Clayton, por segurar minha mão, ser meu parceiro, minha inspiração.

Aos meus amigos que essa jornada me deu, Ana Carolina, Ana Beatriz, Dalila, David, Jackeline e Olivia por dividirem comigo o peso da faculdade.

Aos voluntários deste estudo, que colaboraram para que estivéssemos aqui.

À minha dupla de TCC, por fazer o encerramento deste ciclo ser mais leve.

Aos meus professores, por compartilharem seus conhecimentos e amor à essa profissão tão linda. - Gabrielly

À Deus, pela vida e saúde.

Ao meu pai e minha mãe, pela oportunidade de estudar.

Ao meu irmão, pela confiança e apoio incondicional.

À Marie, pelo apoio emocional e amor puro.

Aos professores e doutorandas, pelo aprendizado e paciência.

A todas as crianças e suas famílias, por participarem deste estudo.

À minha dupla de TCC, pela parceria durante todo o processo.

Aos meus amigos, Bia, Carol, Dalila, David, Jackeline e Gabrielly pela amizade, apoio diário e por me formarem farmacêutica. - Olivia

## RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é caracterizado por um distúrbio complexo do neurodesenvolvimento, de comportamentos repetitivos, comprometimento na fala, interesses restritos e déficit em habilidades sociais com graus de alterações. Sua etiologia não é completamente elucidada, mas sabe-se que causas genéticas, ambientais e neurológicas estão implicadas. O diagnóstico do TEA é puramente clínico e se baseia nos critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quinta edição (DSM-V) e na Classificação Internacional de Doenças (CID-10), sendo realizado apenas por psiquiatras e neurologistas. Portanto, a identificação precoce do TEA favorece um prognóstico positivo. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar um possível método do tipo *point-of-care*, baseado em espectroscopia ATR-FTIR, para auxílio diagnóstico de TEA. Foram coletadas amostras de sangue (plasma e soro) e saliva de crianças com diagnóstico clínico de TEA (n=13), bem como de um grupo de crianças neurotípicas (grupo controle, n=13) de ambos os gêneros. Primeiramente, 12 amostras por grupo foram submetidas ao ATR-FTIR para a escolha da amostra clínica mais apropriada para o estudo. Os dados obtidos foram realizados por ATR-FTIR, SNV (*standard normal devices*), PCA (*principal component analysis*) e LOOCV (*leave one out-cross validation*). A triagem das amostras mostrou que o plasma e o soro não apresentaram diferenças visíveis entre os grupos. Dessa forma, foi dada sequência ao estudo com aumento do número amostral utilizando a saliva como amostra biológica (n=13). Por outro lado, os resultados mostraram a existência de alterações na constituição da saliva entre os diferentes grupos do estudo, a partir de uma correlação com os dados espectrométricos. Os algoritmos de aprendizado de máquina foram capazes de fornecer uma precisão geral de 87,5% de acurácia nos dados obtidos com a saliva de crianças com TEA. Contudo, estudos futuros com elevado número de amostras para validação externa e diferentes estratégias para preparação prévia da amostra são necessários para melhorar o modelo de classificação.

**Palavras-chaves:** ATR-FTIR; Diagnóstico; Espectroscopia; Transtorno do Espectro Autista.

## ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is characterized by a complex neurodevelopmental disorder, involving repetitive behaviors, speech impairment, restricted interests, and deficits in social skills to varying degrees. Its etiology is not fully elucidated, though genetic, environmental, and neurological factors are known to be implicated. ASD diagnosis is purely clinical and based on the criteria of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth edition (DSM-V), and the International Classification of Diseases (ICD-10), performed only by psychiatrists and neurologists. Early identification of ASD, therefore, favors a positive prognosis. Thus, this study aimed to develop a potential point-of-care method, based on ATR-FTIR spectroscopy, to aid in ASD diagnosis. Blood samples (plasma and serum) and saliva were collected from children with a clinical diagnosis of ASD (n=13), and a control group of neurotypical children (n=13) of both genders. Initially, 12 samples from each group underwent ATR-FTIR analysis to select the most appropriate clinical sample for the study. The data obtained were analyzed using ATR-FTIR, standard normal variate (SNV), principal component analysis (PCA), and leave-one-out cross-validation (LOOCV). Sample screening indicated no visible differences between plasma and serum across groups. Consequently, the study progressed with an increased sample size using saliva as the biological sample (n=13). Conversely, results demonstrated alterations in saliva composition among different study groups, correlating with spectrometric data. Machine learning algorithms provided an overall accuracy of 87.5% in classifying saliva data from children with ASD. Nonetheless, further studies with a larger sample size for external validation and different strategies for pre-sample preparation are necessary to improve the classification model.

**Keywords:** ATR-FTIR; Diagnosis; Spectroscopy; Autism Spectrum Disorder.

## SUMÁRIO

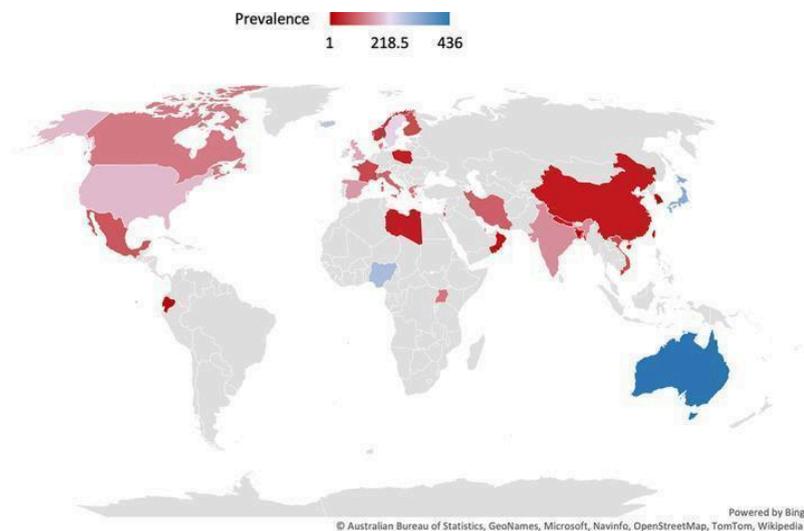
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>10</b>
2.1 CONCEITO	10
2.2 HISTÓRICO	10
2.3 ETIOLOGIA	11
2.4 ASPECTOS CLÍNICOS	12
2.5 DIAGNÓSTICO	13
2.6 TRATAMENTO	14
2.7 ATR-FTIR COMO POTENCIAL AUXÍLIO NO DIAGNÓSTICO DA TEA	14
2.8 <i>POINT-OF-CARE TESTING</i>	16
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>18</b>
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	18
4.2 COLETA DE SANGUE E SALIVA	18
4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA MEDIÇÕES DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA	19
4.4 ANÁLISE DOS DADOS E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O DIAGNÓSTICO	20
4.5 VALIDAÇÃO DOS DADOS	21
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>22</b>
5.1 TRIAGEM AMOSTRAL	22
5.2 PERFIL ESPECTRAL DA SALIVA	24
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIA</b>	<b>32</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é definido como um distúrbio que se manifesta por meio de alterações em duas áreas fundamentais na vida do indivíduo, sendo elas a comunicação social e comportamentos sensório-motores restritos e repetitivos (Lord *et al.*, 2018). Assim, trata-se de um transtorno que afeta o neurodesenvolvimento, gerando diferentes graus de alterações e, conseqüentemente, de sinais comumente identificados em indivíduos autistas (Brasil, 2022).

Em âmbito global, a pesquisa realizada por Zeidan e colaboradores (2022) demonstrou, por meio da base de dados *Medline*, a prevalência de TEA em 34 países, abrangendo indivíduos de diversas idades, conforme apresentado na Figura 1. Essas prevalências variam de 1,09/10.000 a 436/10.000, com prevalência mediana de 100/10.000. No Brasil, existe apenas um estudo piloto de prevalência do TEA, realizado na cidade de Atibaia, São Paulo, em 2011, que encontrou, em crianças na faixa de cinco a doze anos de idade, uma prevalência de 0,3% (Ribeiro, 2022). Estima-se que 1,5 milhões de pessoas tenham TEA no Brasil (Sukiennik *et al.*, 2021), mas dados do Centros de Atenção Psicossocial infantil (CAPS iJ) e dos Centros de Atenção Psicossocial (CAPS) revelam que foram realizados apenas 10,8 mil atendimentos a pessoas com autismo em 2021 (Brasil, 2022). As informações evidenciam a necessidade de atualização no âmbito de TEA no país.

**Figura 1** - Prevalência de autismo por 10.000 de 2012 a 2021.



**Fonte:** Zeidan *et al.*, 2022

Dados de prevalência de autismo na população brasileira são apenas estimativas baseadas nos relatórios do Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC), dos Estados Unidos. Isso porque, os estudos de prevalência do autismo no Brasil iniciaram somente em 2022, pela mudança na Lei 13.861/2019, a qual obrigou o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a inserir questões sobre o autismo em suas coletas de dados (Ribeiro, 2022). Entretanto, a dificuldade em se realizar o diagnóstico também é um fator que contribuiu com esses dados incertos.

Atualmente, o diagnóstico do TEA é complexo e de difícil conclusão, sendo unicamente clínico e realizado por especialistas com base no preenchimento de critérios descritivos (Hodges *et al.*, 2020). Assim, avalia-se três critérios para o diagnóstico: interação social, o uso inapropriado e déficits na comunicação da linguagem e, por fim, os padrões de comportamento e interesses padronizados repetitivos (APA, 2014).

Além disso, a obtenção de um diagnóstico preciso, correto e imediato enfrenta desafios, uma vez que as manifestações clínicas aparecem muitas das vezes antes dos 2 anos de idade. Devido à natureza espectral do transtorno, o quadro clínico exibe uma notável variação quando relacionado aos atrasos no processo de neurodesenvolvimento (Steffen *et al.*, 2020). Logo, muitos indivíduos convivem com as manifestações sintomáticas do transtorno, porém não são devidamente diagnosticados, o que os impossibilita de buscar intervenções precoces voltadas à otimização da qualidade de vida (Nalin *et al.*, 2022).

Nesse contexto, diante das limitações à abordagem diagnóstica, bem como, a importância de um diagnóstico precoce, torna-se necessário ampliar as formas de determinação do TEA. Desse modo, o método de triagem do tipo *point-of-care*, baseado em espectroscopia ATR-FTIR, apresenta-se como um potencial candidato para abordar essa circunstância.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 CONCEITO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA), é um termo utilizado desde a terceira versão do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DMS) da Associação Americana de Psiquiatria, lançado em 1980 (APA, 1980). Este, identifica o TEA como um distúrbio complexo do neurodesenvolvimento, definido por comportamentos repetitivos, interesses restritos e comprometimento na fala, déficit em habilidades sociais e na comunicação (Hodges *et al.*, 2019).

### 2.2 HISTÓRICO

Os primeiros registros em que o autismo foi citado ocorreram em 1906 pelo médico psiquiatra Plouller, enquanto estudava o processo de pensamentos de pacientes com demência (Dias, 2015). Em seguida, no ano de 1911, o suíço Eugen Bleuler apontou o TEA como um principal sintoma da esquizofrenia, que corresponde à perda do contato com a realidade resultando em incapacidade da comunicação (Leite, 1999).

Porém, só em 1943 o austríaco Leo Kanner definiu o autismo como distúrbio autístico do contato afetivo, que a partir da análise de um grupo de crianças com agravos acentuados no desenvolvimento, descreveu perturbações das relações afetivas com o meio, solidão autística extrema, inabilidade no uso da linguagem para comunicação, aspecto físico normal, comportamento ritualísticos de início precoce e predominante no sexo masculino, como características particulares do transtorno (Tamanaha *et al.*, 2008).

No ano seguinte, Asperger publicou sua tese sobre Psicopatia autística, na qual apresentou as mesmas particularidades citadas por Kanner, mas com componentes distintos, em que os sintomas aparecem após o terceiro ano de vida e classificava um bom nível de inteligência e linguagem nos pacientes (Dias, 2015).

Com a segunda guerra mundial, nomenclaturas para determinar transtornos adquiridos pelos veteranos de combate foram determinadas pelo exército americano e incluída na Classificação Internacional de Doenças, sexta edição, (CID-06) proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Derbli, 2011). Entretanto, com

a necessidade de unificar as classificações de distúrbios psíquicos, profissionais psiquiatras e psicólogos, juntamente com o exército e a marinha, propuseram o desenvolvimento do Manual de Doenças Mentais (DSM). Assim, em 1952, surgiu o primeiro manual de doenças mentais (DSM-I), o qual listava 106 transtornos mentais com base na sua categoria de diagnóstico clínico (Araújo *et al.*, 2014).

Posteriormente, edições do manual foram sendo atualizadas e, dessa maneira, o DSM-II trouxe, em 1970, novas distinções em que o TEA foi definido como esquizofrenia do tipo infantil. Esse incremento ocorreu no mesmo período em que foi realizada a publicação da CID-8 e, por isso, divergências entre os cientistas instigaram a uma nova revisão do manual (Gándara, 2009). Em vista disso, nos anos de 1983, o DSM-III trouxe o TEA como uma classe que se encaixava como subcategoria, denominada de Transtornos Globais do Desenvolvimento e foi intitulada nessa retificação como Transtorno do Espectro Autístico (Marfinati *et al.*, 2014)

A partir desse episódio, novas publicações do manual foram sendo desenvolvidas com o objetivo de aprimorar o diagnóstico diferencial. A DSM-IV manteve o TEA como um Transtorno Global do Desenvolvimento, mas também incorporou outros transtornos nessa classificação como o de Rett, Asperger e desintegrativo da infância (Marfinati *et al.*, 2014). Em sequência, o atual manual desenvolvido em 2013, o DSM-V categorizou o TEA como Transtorno do Neurodesenvolvimento, agora com especificações que avaliam o grau de desenvolvimento do distúrbio, as quais analisam a presença ou não do comprometimento intelectual, déficit estrutural da linguagem e perda de habilidades anteriormente adquiridas bem como outras condições médicas (Dias, 2015).

### 2.3 ETIOLOGIA

A etiologia do TEA, apesar de não ser completamente elucidada, envolve a interação de fatores genéticos, ambientais e neurológicos (Steffen *et al.*, 2020). Nesse sentido, diante do aumento no diagnóstico de autismo no mundo, pesquisas na área buscam aprofundar o conhecimento dos potenciais mecanismos de base fisiopatológica no TEA (Hodges *et al.*, 2020), ampliando as informações para profissionais, bem como, moldar a compreensão da sociedade sobre o tema.

Apesar de ser multifatorial, a grande maioria dos estudos são direcionados ao eixo genético, por considerarem o TEA como um distúrbio especialmente genético e hereditário (Sauer *et al.*, 2021). A saber, pesquisadores observaram uma herdabilidade de 80,8% para o autismo em populações de gêmeos, demonstrando uma contribuição genética predominante (Bai *et al.*, 2019). Ainda, afirmam que a proporção de diagnóstico, em relação ao gênero, é de quatro homens para uma mulher (Genovese; Butler, 2023).

Contudo, sabe-se que este fator é mediado por causas não genéticas, como idade dos pais, estado metabólico e nutricional, infecções e exposição a toxinas, entre outros (Sauer *et al.*, 2021). Com estas alterações, os padrões de apresentação dos genes se diferenciam e, diante de tantas variações aditivas ou multiplicativas, pesquisadores encontram entraves na conclusão de um modelo genético (Genovese; Butler, 2020).

Por isso, supõe-se ainda que essas exposições ambientais atuem por meio de mecanismos epigenéticos, ou seja, determinado nucleotídeo alvo é metilado resultando em alterações no cérebro, entretanto, as próprias mudanças epigenéticas também dificultam a padronização de marcadores epigenéticos do TEA (Williams; LaSalle, 2022).

Em suma, a heterogeneidade genética no TEA afeta vias biológicas de desenvolvimento e plasticidade do cérebro que necessitam ser mais exploradas (Chaste *et al.*, 2012), a fim de definir biomarcadores de diagnóstico laboratoriais.

## 2.4 ASPECTOS CLÍNICOS

O TEA tem por característica déficits nas áreas da comunicação e da interação social, bem como, comportamentos repetitivos e restritivos (Styles *et al.*, 2020), os quais são expressos precocemente, porém, possui grande variação na intensidade e na manifestação, por isso, é chamado de “espectro” (Nalin *et al.*, 2022).

Traços característicos do autismo são evidenciados na primeira fase da infância, em que as crianças apresentam atraso na fala, andar nas pontas dos pés, irritação de difícil controle, focos duradouros em objetos incomuns, estereotipia vocal e dificuldade de interação social (APA, 2014). Além disso, a hipersensibilidade a

estímulos sonoros, visuais e táteis são prontamente reconhecidos, devido ao grande desconforto causado e as reações sequenciais (Cunha *et al.*, 2021).

No adulto, os sinais e sintomas são inespecíficos, mas nota-se dificuldades de interpretação afetiva, perspectiva social e comunicação (Nalin *et al.*, 2022), que, muitas vezes, são camufladas em razão da autoconsciência de suas dificuldades e capacidade de conduzir interações sociais (Howlin, 2021).

## 2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico do TEA baseia-se, exclusivamente, no quadro clínico do indivíduo, com critérios estabelecidos no DSM-V (Steffen *et al.*, 2020) e nos critérios CID-10, podendo ser realizado a partir dos 18 meses de idade por neurologistas e psiquiatras especialistas.

Resumidamente, o DSM-V classifica duas categorias - comunicação social e presença de comportamentos restritos e repetitivos- entre 1 e 3, com base na gravidade, sendo a classificação 1 a mais baixa, a qual indica sintomas mais leves e a classificação de 3, que indica sintomas graves que necessitam de apoio muito substancial (APA, 2014). Ademais, o diagnóstico também especifica deficiências intelectuais no geral, condições médicas ou genéticas e fatores ambientais (Nalin *et al.*, 2022).

Além do diagnóstico clínico, é analisado o histórico familiar de três gerações da família e marcos no desenvolvimento e comportamento do indivíduo (Genovese; Butler, 2020). Nestas avaliações, busca-se perceber sensibilidades anormais do indivíduo que desencadeiam sinais despercebidos para a família, como a sensibilidade à dor e, conseqüentemente, o fato de resistir a abraços (Chagas, 2018).

Apesar de uma legislação que determina o acesso a um diagnóstico precoce - Lei Berenice Piana (12.764/2012) - a limitação do diagnóstico puramente clínico contribui para a ocorrência de indivíduos sem diagnósticos, com diagnósticos tardios ou inadequados (Alves; Alves, 2022).

## 2.6 TRATAMENTO

Com o diagnóstico de TEA confirmado, os déficits são tratados com uma abordagem ampla, variando conforme a idade do paciente. Comumente, o tratamento visa estimular o desenvolvimento social e comunicativo, bem como, aprimorar o aprendizado e a capacidade de solucionar problemas, sobretudo em crianças (Steffen *et al.*, 2020).

Além disso, terapias com foco em abordagem comportamental propõem diminuir os comportamentos estereotipados e repetitivos (Mesquita; Pegoraro, 2013). O tratamento, ainda, é personalizado e multidisciplinar, ou seja, os pacientes podem fazer acompanhamento com psicólogos, fonoaudiólogos, terapeutas, músicos, pedagogos e com educadores físicos (Alves; Alves, 2022).

Embora os tratamentos sejam diferentes, todos seguem uma sequência típica que enfatiza a estimulação funcional de áreas cerebrais de forma não invasiva e, em conjunto, essas terapias não farmacológicas visam diminuir os sinais característicos (Jiang *et al.*, 2022).

Já a terapia farmacológica é direcionada para sintomas extrínsecos ao autismo, como distúrbios do sono, ansiedade e depressão, ou seja, o manejo terapêutico é o mesmo para indivíduos com TEA e para neurotípicos (Aishworiya *et al.*, 2022). Atualmente, não há nenhuma terapia medicamentosa aprovada capaz de curar o autismo, porém, mais de vinte potenciais medicamentos estão em estudo, como a clonidina e a oxitocina (Jiang *et al.*, 2022).

Ressalta-se, por fim, a importância da família como base nas intervenções, visto que um tratamento contínuo possibilita melhorias na qualidade de vida, bem como, um bom prognóstico (Chagas, 2018). Por isso, a dedicação e o comprometimento de todos os envolvidos com o tratamento são significativos e contribuem com maior autonomia do indivíduo autista (Cardoso *et al.*, 2023).

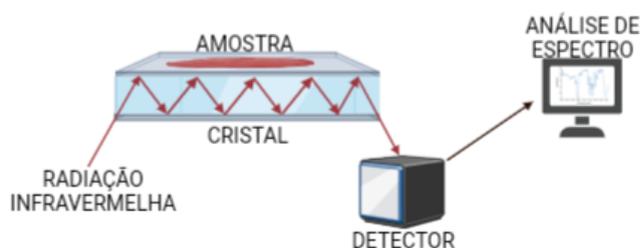
## 2.7 ATR-FTIR COMO POTENCIAL AUXÍLIO NO DIAGNÓSTICO DA TEA

A “*Attenuated total reflection-Fourier transform infrared*”, “Espectroscopia de infravermelho por transformação de Fourier de reflectância total atenuada” ou, simplesmente, “ATR-FTIR” é uma técnica que analisa a porção líquida de amostras

a partir da incidência de luz, a fim de adquirir informações estruturais e de composição molecular (Jaggy *et al.*, 2020; Tiernan *et al.*, 2020).

Na espectroscopia ATR-FTIR, a amostra é posicionada em cima de um cristal ópticamente denso com alto índice de refração. A radiação produzida passa pelo cristal e é refletida na amostra. O feixe de luz penetra apenas uma camada fina da amostra absorvente, sendo direcionada para um detector, conforme esquema apresentado na Figura 2 (Souza, 2009).

**Figura 2** - Esquema do funcionamento do ATR-FTIR.



**Fonte:** As autoras.

No ATR-FTIR é possível, com preparação mínima da amostra, obter rapidamente os dados espectrais (Martinez-Cuaziti *et al.*, 2021) em nível multimolecular (Ferreira *et al.*, 2017). Por isso, esse método vem sendo proposto como triagem de auxílio diagnóstico em vários estudos, a saber, para a detecção de vírus, como o SARS-CoV-2 (Calvo-Gomez *et al.*, 2022; Martinez-Cuaziti *et al.*, 2021), distinção de pacientes com leucemia e pessoas saudáveis (Sheng *et al.*, 2013), detecção de leishmaniose visceral canina (Larios *et al.*, 2021) e de paracoccidiodomicose (Brito *et al.*, 2022).

A utilização desta técnica, portanto, permite uma constatação diagnóstica sensível e rápida (Cruz, 2022), com a capacidade de monitorar alterações nos componentes moleculares das amostras estudadas (Silva, 2020), podendo ser usada como uma ferramenta simples para distinguir amostras de acordo com seus componentes (Zeghoud *et al.*, 2021).

## 2.8 POINT-OF-CARE TESTING

*Point-of-care testing* (PoCT), ou Testes Laboratoriais Remotos (TLR), é o nome dado a testes e exames rápidos realizados em dispositivos portáteis para determinação de biomarcadores presentes em amostras biológicas (Brasil, 2021).

Nesse sentido, métodos do tipo POC são uma ferramenta complementar no atendimento de demandas em que os exames convencionais são limitantes ou inacessíveis (Brasil, 2018). Assim, a evolução tecnológica ampliou o número de testes disponíveis, permitindo a realização de exames com amostras biológicas mínimas, como sangue ou secreções (Heaney *et al.*, 2020).

Dessa forma, por permitir resultados rápidos, possibilitando um diagnóstico precoce, intervenções mais eficazes e por sua praticidade, o PoCT revela-se como um auxílio diagnóstico simples e barato.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método do tipo *point-of-care*, baseado em espectroscopia ATR-FTIR, possibilitando a análise direta de amostras biológicas para auxílio diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista (TEA).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Realizar uma triagem de amostras biológicas (soro, plasma e saliva) baseado em espectroscopia ATR-FTIR;

3.2.2 Obter um banco de dados robusto para a construção do modelo preditor a ser empregado e a validação do mesmo, utilizando a(s) amostra(s) com melhor potencial;

3.2.3 Obter uma maior compreensão dos parâmetros que influenciam a diferenciação entre grupos;

3.2.4 Investigar a correlação entre os dados espectroscópicos observados em indivíduos com TEA e grupo controle.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEP/UFMS) (CAAE: 70494823.7.0000.0021).

### 4.2 COLETA DE SANGUE E SALIVA

Amostras de sangue (5 mL) de crianças com até 12 anos foram coletadas em 2 tubos (um com e outro sem anticoagulante). Após a coleta da amostra sanguínea de cada indivíduo, o sangue foi centrifugado a  $2500 \times g$  e  $10.000 g$  durante 10 min e foi realizada a separação do material em plasma e soro, respectivamente.

Já as amostras de saliva foram coletadas com auxílio de swabs, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, o swab foi colocado na boca do indivíduo, passando por toda cavidade oral. O cotonete foi então fechado no tubo plástico fornecido e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e, posteriormente, ressuspendidas com  $800\mu\text{L}$  de solução fisiológica por 5 minutos e em seguida, as alíquotas foram separadas.

Os parâmetros pré-analíticos, incluindo tempo de coleta, tempo entre a coleta, a análise por ATR-FTIR e a temperatura de armazenamento, foram registrados. Todos os dados foram anonimizados preservando a privacidade do indivíduo.

Neste trabalho, analisamos um total de 26 indivíduos, os quais foram divididos em dois grupos: o grupo controle, composto por amostras de crianças neurotípicas de ambos os gêneros ( $n=13$ ), e o grupo TEA, composto pelas amostras de crianças com diagnóstico e laudo de autismo ( $n=13$ ), conforme mostra a Tabela 1

Tabela 1 - Desenho e constituição dos grupos de estudo.

GRUPOS	PLASMA (n)	SORO (n)	SALIVA (n)
Grupo controle	13	13	13
Grupo TEA	13	13	13

**Nota:** n= quantidade de indivíduos distribuídos nos grupos do estudo

**Fonte:** As autoras

Inicialmente, realizou-se uma triagem com 13 amostras por grupo para a seleção da amostra com melhor potencial para o estudo. Em seguida, foi retirada uma amostra de cada grupo (*outlier*), para destacar a variabilidade das condições experimentais. Terminando, então, a análise desse intervalo com 12 amostras para cada classe.

#### 4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA MEDIÇÕES DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

As amostras foram caracterizadas pelo método de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Espectros de absorção no infravermelho de amostras de plasma, soro e saliva foram obtidas em um espectrômetro Perkin-Elmer, modelo *spectrum* 100, com resolução de 8 cm<sup>-1</sup> e 64 varreduras.

Cerca de 20µL de soro e plasma foram depositados diretamente sobre o cristal do acessório ATR (reflectância total atenuada) para análise. Para a amostra de saliva, 20 µL foram colocados em um substrato de silício a qual foi seca em estufa à 40°C por 30 minutos. Esse processo foi repetido 5 vezes. Para estudo, a placa com amostra foi posicionada sobre o cristal do acessório ATR (reflectância total atenuada) e estabilizada com o auxiliar para leitura.

#### 4.4 ANÁLISE DOS DADOS E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O DIAGNÓSTICO

Os dados obtidos das amostras foram, inicialmente, submetidos a diferentes métodos de pré-tratamento dos dados para remoção de deslocamentos, suavização de “ruídos”. Em geral, foi utilizado o método de SNV (*standard normal deviate*) para correção de *offset* (deslocamento), aplicou-se filtros de suavização Savitzky-Golay (SG) com diferentes graus para suavização da curva com muitos “ruídos”, e correção de dispersão multiplicativa (MSC).

Após a etapa de pré-processamento, os dados obtidos foram submetidos a um conjunto de dados de análise não supervisionada. Para esse fim, foi aplicado o método de análise de componentes principais - PCA (*Principal Component Analysis*). Dessa forma, foi possível verificar de maneira não enviesada as regiões do espectro que mais contribuem (maior variância dos dados) para a diferenciação entre os grupos de amostras analisadas. Observando a tendência de clusterização dos grupos de amostras através do gráfico de escores (*scores*), associado as informações obtidas do carregamento (*loading*) foi possível, neste estágio de análise, selecionar intervalos de dados espectrais mais relevantes para classificação das amostras, considerando ainda os diferentes métodos de pré-processamento empregados. Nesta etapa foi realizado o teste T2 de Hotelling para remoção de *outliers*, amostras cujo dados não representam o conjunto.

Em sequência, os dados extraídos da análise de PCA foram submetidos à análise supervisionada, onde os grupos de amostras foram previamente identificados e algoritmos de aprendizado de máquina foram responsáveis por obter padrões específicos que permitiram a identificação das classes através da criação de modelos de predição. Os algoritmos que foram aplicados correspondem ao método de Suporte Vetor de Máquinas, o SVM (com funções Linear, *Quadratic*, *Cubic*, *Fine Gaussian*, *Medium Gaussian* e *Coarse Gaussian*) que são, de modo geral, algoritmos mais simples que não demandam grande poder computacional e que possuem uma lógica de interpretação/atuação sobre os dados de PCA mais passível de compreensão, questionamento e discussão.

#### 4.5 VALIDAÇÃO DOS DADOS

O modelo preditor foi validado após submeter os dados a dois tipos de validação, a interna e a externa. A validação interna foi realizada utilizando os mesmos dados do conjunto de treinamento, empregando o método de *leave one out-cross validation* (LOOCV). No LOOCV a amostra do conjunto foi separada para validação e as demais utilizadas para a elaboração do modelo preditor. A amostra foi testada pelo modelo e registrou-se sua classificação como Verdadeiro ou Falso. O processo foi então repetido devolvendo a amostra para o conjunto de treinamento para elaboração do modelo que foi novamente testado em uma outra amostra do conjunto previamente retirada. Este procedimento foi repetido até que todas as amostras do conjunto foram testadas/validadas e, por fim, verificou-se a acurácia do modelo somando-se o número de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, divididos pelo número total de amostras. A acurácia foi registrada através da porcentagem de acertos em relação ao número total de amostras.

Nesta etapa de validação interna foi observado o número de PCs (componentes principais) utilizados para construção do modelo de predição de modo a evitar *overfitting* dos dados. Para isto analisamos a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*), que uma curva da taxa de verdadeiros positivos versus taxa de falsos positivos, um modelo ideal possui área da curva (AUC) maior que 0,5. A experiência mostra que é possível utilizar o número de PCs de modo que a AUC seja maior que 0,9. A partir de uma área maior que 0,9 determinamos o número de PCs que foi utilizado pelo modelo preditor, evitando *overfitting* (quando o modelo tenta forçar o resultado por se “habituar” aos dados).

Finalmente, a robustez do modelo de predição foi testada utilizando amostras que não participaram do conjunto de treinamento (teste cego e/ou validação externa). Na validação externa separamos de 30% a 25% das amostras do conjunto para validação. A acurácia do modelo no teste de validação externa foi a adotada para o método de diagnóstico proposto.

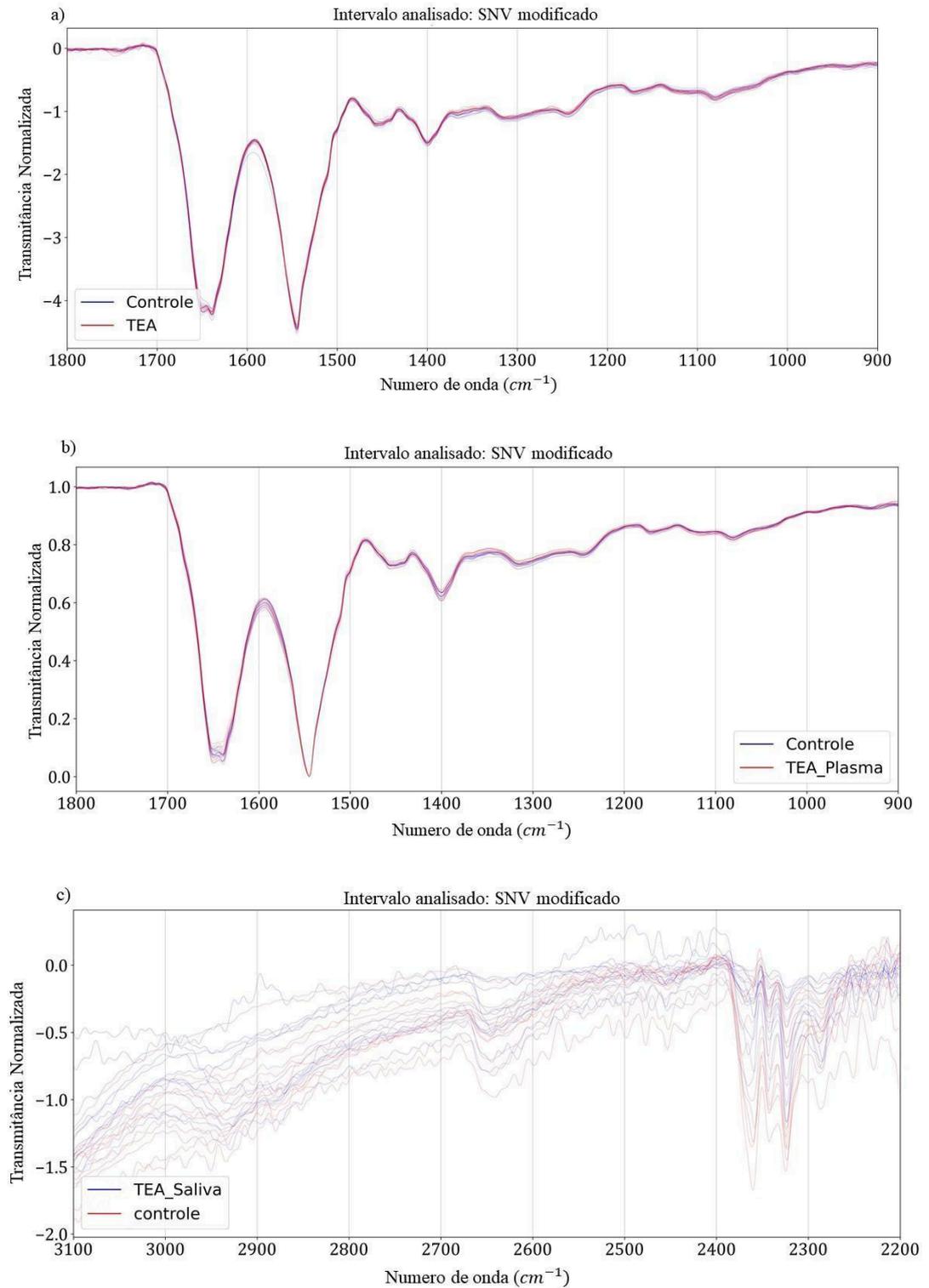
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TRIAGEM AMOSTRAL

Os resultados da triagem das amostras (n=12/grupo) deste estudo indicaram que as amostras de plasma e soro, não apresentaram diferenças visíveis entre os grupos, quando observado os gráficos sobrepostos (Figura 3), comprometendo a qualidade dos dados obtidos. Em contraste, as amostras de saliva mostraram-se mais confiáveis, com gráficos distintos entre os grupos (Figura 3). Esses achados sugerem a saliva como um potencial espécime para a análise de biomarcadores.

Adicionalmente, um aspecto relevante considerado foi a facilidade de obtenção das amostras. A coleta de saliva apresentou-se mais simples e menos invasiva em comparação à coleta sanguínea para obtenção de plasma ou soro, o que favorece a maior adesão dos participantes ao estudo.

**Figura 3** - Espectro de normalização dos dados com desvio padrão. (a) Sobreposição dos espectros da análise de amostras de soro dos grupos TEA e Controle. (b) Sobreposição dos espectros da análise de amostras de plasma dos grupos TEA e Controle. (c) Sobreposição dos espectros da análise de amostras de saliva dos grupos TEA e Controle.

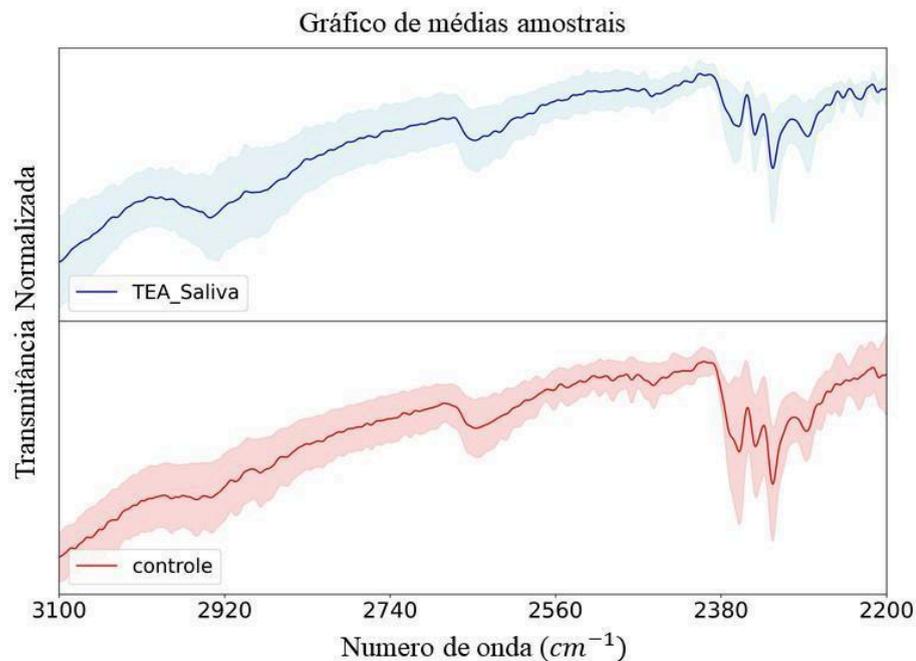


## 5.2 PERFIL ESPECTRAL DA SALIVA

Uma vez verificado que apenas a saliva apresentou potencial para a utilização do estudo, as análises seguintes foram realizadas apenas com saliva. Inicialmente, utilizando a normalização por SNV para ajustar a linha de base e eliminar o deslocamento horizontal das amostras de saliva, foi aplicado o filtro Savitzky-Golay no intervalo do espectro entre  $3100 - 2100 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 4) para suavização dos espectros ruidosos.

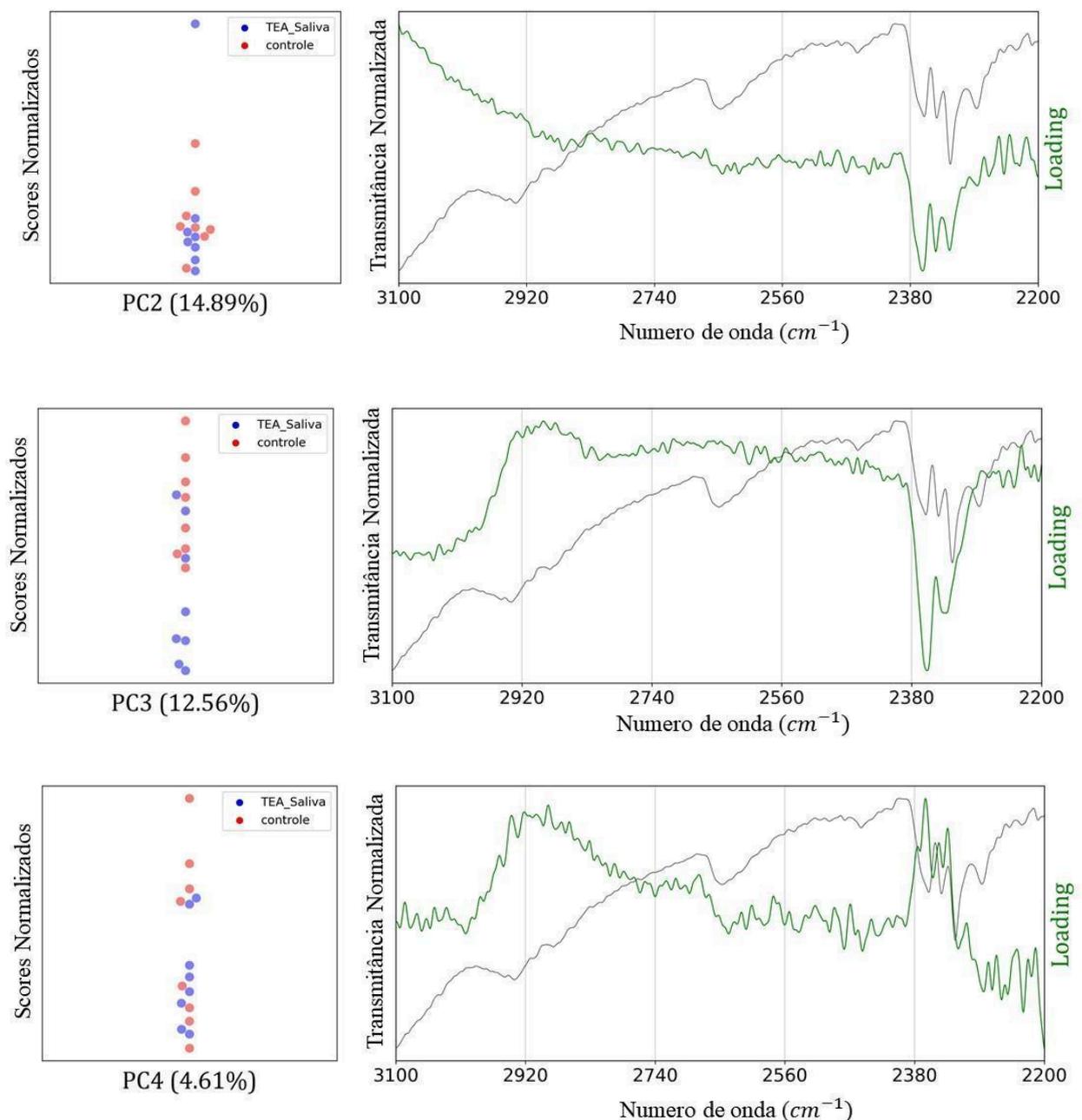
Os espectros da saliva contém informações de compostos orgânicos como as proteínas, lipídeos, carboidratos e inorgânicos, incluindo nitrato e tiocianato (Christian *et al.*, 1996; Ferreira, 2017). As bandas com maiores destaques (Figura 4) estão nos intervalos  $3100-2910 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2740 - 2560 \text{ cm}^{-1}$  e  $2380- 2100 \text{ cm}^{-1}$  as quais correspondem a lipídios; proteínas, DNA, ácidos graxos e tiocianato (Nasser *et al.*, 2020). Os grupos apresentaram similaridade, e o desvio padrão dos espectros é mostrado para cada um. Entretanto, observou-se nas amostras de saliva do grupo com TEA a amplitude de variação intragrupo, o que dificultou a separação dessas amostras.

**Figura 4** - Médias amostrais dos espectros obtidos pelo ATR-FTIR do intervalo entre  $3100 - 2100 \text{ cm}^{-1}$ .



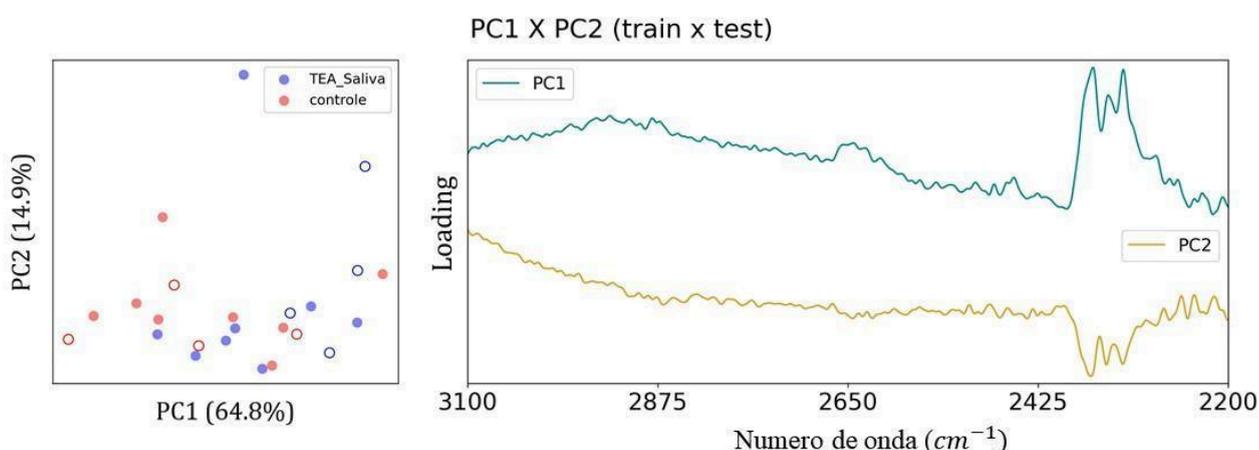
Em seguida, a partir dos espectros de SNV, estudou-se o principal componente de análise (PCA), onde há a seleção de um conjunto de dados para classificação das amostras, no intervalo do espectro adequado, e verifica-se os padrões que distinguem os dois grupos. Na Figura 5, é possível visualizar o quadro de PCs, representados por gráficos bidimensionais, que mostram variância na faixa de onda selecionada.

**Figura 5** - Imagens representativas dos scores (PCs) e *Loadings* obtidos dos grupos TEA e Controle.



Nota-se que o primeiro componente (PC1) explica 68,4% de discrepância no conjunto de amostras, enquanto a segunda (PC2) explica 14,9%, logo, a influência significativa da variável entre os dados é relacionada, a fim de equiparar todas as classes e variâncias dos dados separados para treino e teste (Figura 6). Dessa forma, ao observar quais variáveis têm os maiores valores de *Loadings*, tanto positivos quanto negativos, identifica-se quais características espectrais são mais relevantes para a discriminação entre as amostras. Nesse sentido, atribuiu-se as bandas evidenciadas no intervalo de ondas 2425 - 2100  $\text{cm}^{-1}$  a proteínas. (Larios *et al.*, 2021; Nasser *et al.*, 2020).

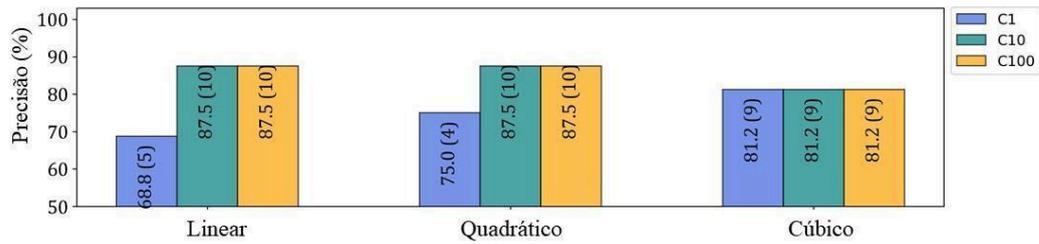
**Figura 6** - Comparação entre pontos diferem pelos *scores* e *Loadings* para as PCs 1 e 2.



**Nota:** Círculos vazados representam amostras não interpretadas completamente pelo método.

Com a identificação dos padrões de amostras, foi selecionado o modelo a ser utilizado para classificação dos grupos. Assim, as porcentagens de precisão foram analisadas por meio dos resultados obtidos do gráfico de SVM e o melhor parâmetro foi determinado, conforme o menor número de PCs e melhor acurácia. Assim, o SVM quadrático apresentou melhor resultado com precisão média de 83,3% utilizando 24 PCs nos hiperparâmetros fornecidos pelo treinador. (Figura 7).

**Figura 7** - Porcentagem de precisão da análise Linear, Quadrática e Cúbica.

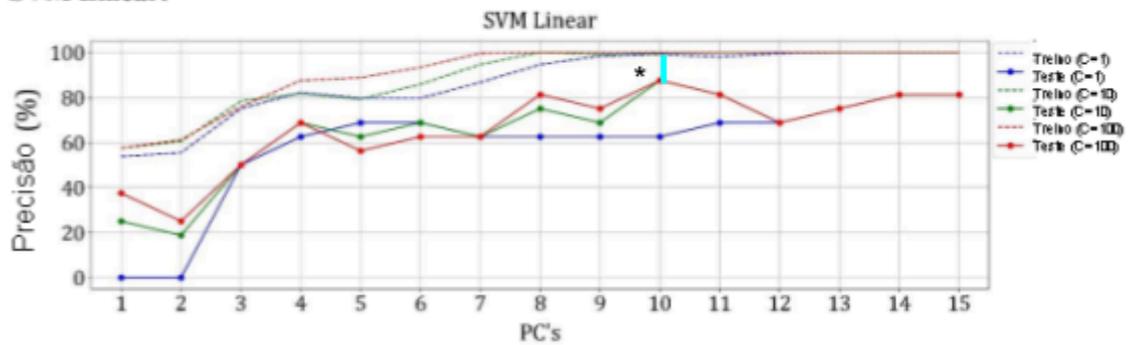


**Nota:** C1, C10 e C100, hiperparâmetros de treino e teste para diferentes *kernel*s de SVM, Linear, Quadrática e Cúbica.

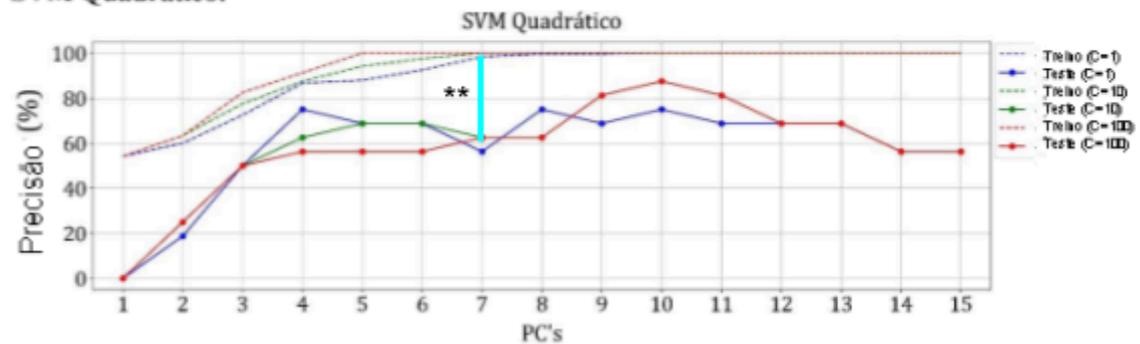
Contudo, a diferença entre o desempenho em treinamento e em teste é crucial para avaliar a qualidade e a generalização do modelo. Quando comparado o SVM linear com o quadrático, observou-se que ocorreu um *overfitting*, ou seja, o modelo quadrático se ajustou aos dados de treinamento devido baixo número de amostras testadas, isso pode ser observado com a distância entre a precisão do treino e do teste (\*\*), o que resultou em uma alta acurácia de treinamento, mas uma baixa acurácia do teste (Figura 8). Por isso esse motivo, o sistema linear foi utilizado para os testes de validação, visto que a precisão entre treino e teste foi melhor (\*).

**Figura 8** - Porcentagem de precisão dos marcadores com diferentes métodos de SVM.

**SVM Linear:**

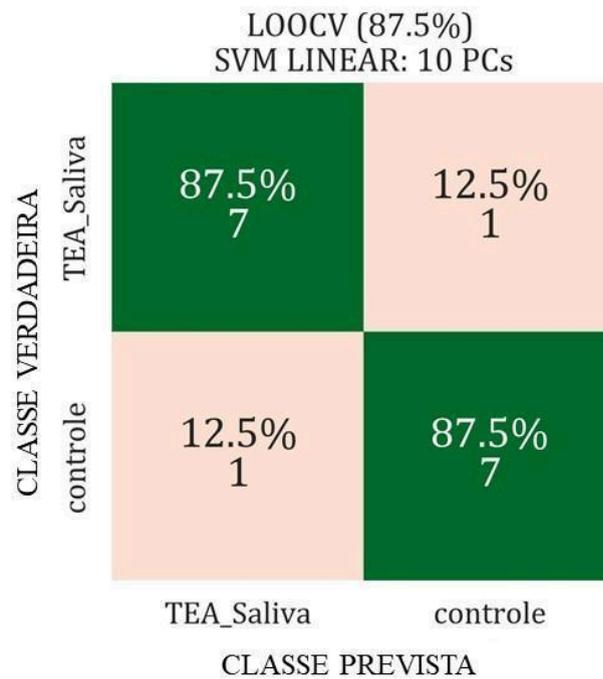


**SVM Quadrático:**



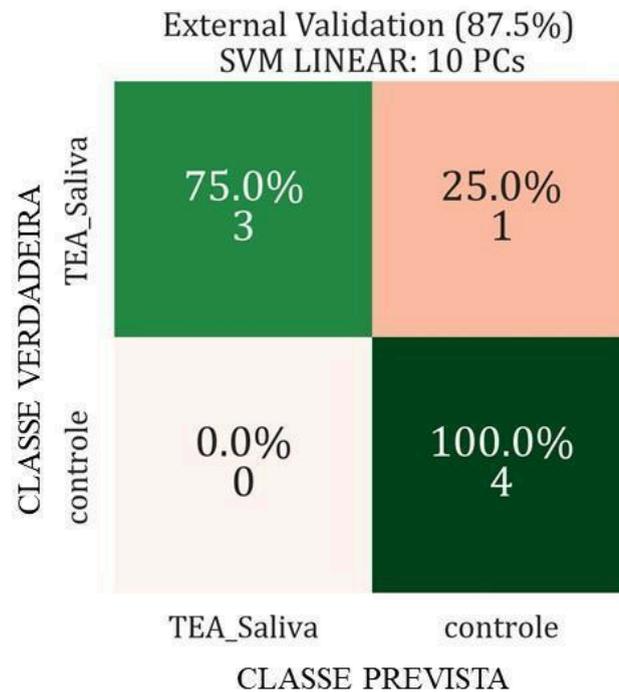
Em seguida, para validação interna dos resultados, foram utilizadas 08 (oito) amostras, de cada grupo, para elaboração do modelo preditor. Com isso, foi obtido a matriz de confusão, na qual 87,5% dos resultados foram verdadeiros e somente 12,5% foram falsos, como demonstrado na Figura 9.

**Figura 9** - Matriz de confusão LOOCV para validação interna do método com amostras saliva.



Por fim, a robustez do modelo de predição foi testada utilizando 04 (quatro) amostras dos dois grupos. A partir do teste cego, 100% das amostras confirmadas como pertencentes do grupo controle, foram entendidas pelo sistema como do grupo controle, enquanto que 75,0% das amostras do grupo TEA, foram ditas como TEA pelo teste (Figura 10).

**Figura 10** - Validação externa do método com amostras de saliva.



Dessa maneira, entende-se que a acurácia do método foi de 87,5%. Nos ensaios, apenas uma (01) amostra de saliva do grupo TEA foi classificada erroneamente como grupo controle. Dessa maneira, o ensaio mostrou alta sensibilidade (75%) e especificidade de 100%, demonstrando o potencial promissor desta nova metodologia para auxílio diagnóstico de TEA.

## 6. CONCLUSÃO

Em suma, os achados do presente estudo mostraram que a saliva apresentou o melhor potencial para ser utilizada para a triagem diagnóstica do TEA. Além disso, a análise de componentes principais demonstrou o melhor resultado na faixa de 3100 – 2100  $\text{cm}^{-1}$ . Assim, a análise de aprendizagem de dados foi capaz de fornecer uma precisão geral de 87,5% para o auxílio diagnóstico de TEA, sendo este um resultado positivo quando comparado ao diagnóstico do TEA que é exclusivamente clínico, de forma que pode apresentar margens de erro.

Contudo, o método apresentou limitações, uma vez que não leva em consideração os níveis do espectro autista. Além disso, o número limitado de amostras utilizadas dificultou a interpretação dos dados, bem como, limitou os ensaios de validação.

Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo mostraram o método do tipo *point-of-care*, baseado em espectroscopia ATR-FTIR com considerável potencial, uma vez que utilizou-se pequena quantidade de amostra de saliva para obter alta precisão em um método relativamente simples, barato e rápido, capaz de auxiliar no diagnóstico de TEA.

## REFERÊNCIAS

AISHWORIYA, R.; VALICA, T.; HAGERMAN, R. *et al.* An Update on Psychopharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder. **Neurotherapeutics**, v. 19, p. 248-262, 2022.

ALVES, A. K. S.; ALVES, T. S. O autismo e o psicólogo na psicologia clínica. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 2, 2022.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-3**. 3. ed. Dados eletrônicos. Porto Alegre: Artmed, 1980.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. 5. ed. Dados eletrônicos. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ARAUJO, Á. C.; LOTUFO NETO, F. A nova classificação Americana para os Transtornos Mentais: o DSM-5. **Rev. bras. ter. comport. cogn.**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 67-82, 2014.

BAI, D.; YIP, B. H. K.; WINDHAM, G. C, *et al.* Association of Genetic and Environmental Factors With Autism in a 5-Country Cohort. **JAMA Psychiatry**, v. 76, n. 10, p. 1035–1043, 2019.

BRITO, E. C. A.; FRANCA, T.; CANASSA, T.; WEBER, S. S.; PANIAGO, A. M. M.; CENA, C. Paracoccidioidomycosis screening diagnosis by FTIR spectroscopy and multivariate analysis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 39, 2022.

CALVO-GOMEZ, O.; CALVO, H.; CEDILLO-BARRÓN, L.; VIVANCO-CID, H.; ALVARADO-OROZCO, J. M.; FERNANDEZ-BENAVIDES, D. A.; ARRIAGA-PIZANO L.; FERAT-OSÓRIO, E.; ANDA-GARAY, J. C.; LÓPEZ-MACÍAS, C.; LÓPEZ, M. G. Potential of ATR-FTIR-Chemometrics in Covid-19: Disease Recognition. **ACS Omega**, v. 7, n. 35, p. 30756-30767, 2022.

CARDOSO, C. R.; LUZ, C. D. L. A importância das intervenções psicopedagógicas com crianças autistas nas instituições clínicas. **RELPE: Revista Leituras em Pedagogia e Educação**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. e202306, 2023.

CHAGAS, D. S. **Aspectos clínicos e educacionais do autismo infantil**. 39 f.: il. Monografia (Especialização em Educação: Métodos e Técnicas de Ensino) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2018.

CHASTE, P.; LEBOYER, M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. **Dialogues Clin Neurosci.**, v. 14, n. 3, p. 281-292, 2012. DOI: 10.31887/DCNS.2012.14.3/pchaste. PMID: 23226953; PMCID: PMC3513682.

CRUZ, I. G. B. L. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR-FTIR) e quimiometria como adjuvantes no diagnóstico de câncer de tireoide. 71f.: il. Dissertação (Mestrado em Química) -

Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Química. João Pessoa, 2022.

CUNHA, P. R.; NETO, S. M.; NASCIMENTO, T. S.; FRANÇA, U C. D. **Transtorno do espectro autista: principais formas de tratamento**, Trabalho de Curso. Faculdade UNA de Catalão – UNACAT, 2021.

DERBLI, M. Uma breve história das revisões do DSM. **ComCiência**, Campinas, n. 126, 2011.

DIAS, S. Asperger e sua síndrome em 1944 e na atualidade. **Revista Latino americana Psicopatologia Fundamental**, v.18, n. 2, 2015.

DUNKER, C. I. L. Questões entre a psicanálise e o DSM. **J. Psicanal.**, São Paulo, v. 47, n. 87, p. 79-107, 2014.

FERREIRA, I. C. C. **ATR-FTIR spectroscopy analysis of saliva components as a diagnostic and prognostic tool for breast cancer: a preliminary study**. 77 f.: il. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia, 2017.

FREIRE, D. M. C.; SEIZE, M. M. **O impacto do autismo na dinâmica familiar**. Revista Ft, Rio de Janeiro, n. 119, p. 1, 2023.

GÁNDARA, MVB Raízes e evolução do DSM. *Revista de história da psicologia* , v. 2-3, pág. 81-90, 2009.

GENOVESE, A.; BUTLER, M. G. Clinical Assessment, Genetics, and Treatment Approaches in Autism Spectrum Disorder (ASD). **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 13, p. 4726, 2020.

GENOVESE, A.; BUTLER, M. G. The Autism Spectrum: Behavioral, Psychiatric and Genetic Associations. **Genes**, v. 14, n. 3, p. 677, 2023.

HEANEY, K. et al. Point-of-care testing by paramedics using a portable laboratory: an evaluation. *Journal of Paramedic Practice* , v. 12, n. 3, 2020.

HODGES H.; FEALKO C.; SOARES N. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. **Transl Pediatr**, v. 9, n. 1, p. 55-65, 2020.

HOWLIN, P. Adults with Autism: Changes in Understanding Since DSM-111. **J Autism Dev Disord**, v. 51, p. 4291–4308, 2021.

JAGGY, F.; ZINELIS, S.; POLYCHRONIS, G.; PATCAS, R.; SCHÄTZLE, M.; ELIADES, G.; ELIADES, T. ATR-FTIR Analysis and One-Week Stress Relaxation of Four Orthodontic Aligner Materials. **Materials (Basel)**, v. 13, n. 8, p. 1868, 2020.

JIANG, C. C.; LIN, L. S.; LONG, S.; KE, X. Y; FUKUNAGA, K.; LU, Y. M.; HAN, F. Signalling pathways in autism spectrum disorder: mechanisms and therapeutic implications. **Signal Transduct Target Ther**, v. 7, n. 1, p. 229, 2022.

LARIOS, G.; RIBEIRO, M.; ARRUDA, C.; OLIVEIRA, S. L.; THALITA CANASSA, T.; BAKER, M. J.; MARANGONI, B.; RAMOS, C.; CENA, C. A new strategy for canine visceral leishmaniasis diagnosis based on ftir spectroscopy and machine learning. **Journal of Biophotonics**, v. 14, n. 11, 2021.

LEITE, N. V. A. Autismos. **Estilos clínica**, São Paulo, v. 4, n. 7, p. 78-88, 1999.

LORD, C.; ELSABBAGH, M.; BAIRD, G.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. Autism spectrum disorder. **Lancet**, v. 392, n. 10146, p. 508-520, 2018.

MARFINATI, A. C.; ABRAO, J. L. F. Um percurso pela psiquiatria infantil: dos antecedentes históricos à origem do conceito de autismo. **Estilos clin.**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 244-262, 2014.

MARTINEZ-CUAZITL, A.; VAZQUEZ-ZAPIEN, G. J.; SANCHEZ-BRITO, M. *et al.* ATR-FTIR spectrum analysis of saliva samples from COVID-19 positive patients. **Sci Rep**, v. 11, p. 19980, 2021.

MESQUITA, W. S.; PEGORARO, R. F. Diagnóstico e tratamento do transtorno autístico em publicações brasileiras: revisão de literatura. **J Health Sci Inst**, v. 31, n. 3, p. 324-9, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diagnóstico das hepatites virais. Ministério da Saúde [Internet]. 2018. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>. Acesso em: 18 ago. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Teste diagnóstico, point of care, de Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay (CRAG-LFA) para detecção de infecção por Cryptococcus e diagnóstico de meningite criptocócica em pessoas vivendo com o vírus da imunodeficiência humana (PVHIV). Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1253427>. Acesso em: 18 ago. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tea**: saiba o que é o transtorno do espectro autista e como o sus tem dado assistência a pacientes e familiares. Ministério da Saúde. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/abril/tea-saiba-o-que-e-o-transtorno-do-espectro-autista-e-como-o-sus-tem-dado-assistencia-a-pacientes-e-familiares>. Acesso em: 12 ago. 2023.

NALIN, L. M. *et al.* Impactos do diagnóstico tardio do transtorno do espectro autista em adultos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 16, p. 1-9, 12 dez. 2022.

NASEER, K.; ALI, S.; QAZI, J. Espectroscopia ATR-FTIR como o futuro do diagnóstico: uma revisão sistemática da abordagem usando biofluidos. **Applied**

*Spectroscopy Reviews*, v. 56, n. 2, p. 85–97, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1738453>[1].

PINTO, R. N. M.; TORQUATO, I. M. B.; COLLET, N.; REICHERT, A. P. S.; NETO, V. L. S.; SARAIVA, A. M. Autismo infantil: impacto do diagnóstico e repercussões nas relações familiares. **Revista Gaúcha Enfermagem**, v. 37, n. 3, 2016.

RAPIN, I.; TUCHMAN, R. F. Autism: Definition, Neurobiology, Screening, Diagnosis, **Pediatric Clinics of North America**, v. 55, n. 5, p. 1129-1146, 2008.

RIBEIRO, T. C. **Epidemiologia do transtorno do espectro do autismo: rastreamento e prevalência na população**. Tese (Doutorado em Psiquiatria) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

SAUER, A. K.; STANTON, J. E, HANS S, *et al.* Autism Spectrum Disorders: Etiology and Pathology. In: Grabrucker AM, editor. **Autism Spectrum Disorders [Internet]**. Brisbane (AU): Exon Publications; 2021.

SCHULTZ, Christian P.; AHMED, M. Khalique; DAWES, Colin; MANTSCH, Henry H. Thiocyanate levels in human saliva: quantitation by Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, v. 240, n. 1, p. 7-12, 1996. ISSN 0003-2697. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0323>.

SHENG, D.; LIU, X.; LI, W.; WANG, Y.; CHEN, X.; WANG, X. Distinction of leukemia patients' and healthy persons' serum using FTIR spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 101, p. 228-232, 2013.

SILVA, E. B. O. **Análise de plasma sanguíneo por espectroscopia ATR-FTIR: identificação de biomoléculas em mulheres com diabetes mellitus gestacional e suas implicações em desfechos adversos neonatais**. 72f.: il. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Natal, RN, 2020.

SOUZA, R. M. ATR: Avanço da espectroscopia de infravermelho na análise de materiais plásticos, **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, v. 21, n. 3, 2009.

STEFFEN, B. F.; DE PAULA, I. F.; MARTINS, V. M. F.; LÓPEZ, M. L. Diagnóstico precoce de autismo: uma revisão literária. *Revista Saúde Multidisciplinar*, v. 6, n. 2, 2020.

STYLES, M.; ALSHARSHANI, D.; SAMARA, M.; ALSHARSHANI, M.; KHATTAB, A.; QORONFLEH, M. W.; AL-DEWIK, N. Risk factors, diagnosis, prognosis and treatment of autism. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, v. 25, n. 9, p.1682–1717, 2020.

SUKIENNIK, R.; MARCHEZAN, J.; SCORNAVACCA, F. Challenges on Diagnoses and Assessments Related to Autism Spectrum Disorder in Brazil: A Systematic Review. **Front Neurol**. v. 12, p. 598073, 2022.

TAMANAHA, A. C.; PERISSINOTO, J.; CHIARI, B. M. Uma breve revisão histórica sobre a construção dos conceitos do Autismo Infantil e da síndrome de Asperger. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, v. 13, n. 3, 2008.

TIERNAN, H.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S. G. ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 241, p. 118636, 2020.

WILLIAMS, L. A.; LASALLE, J. M. Future Prospects for Epigenetics in Autism Spectrum Disorder. **Mol Diagn Ther**, v. 26, n. 6, p. 569-579, 2022.

ZEGHOUD, S.; REBIAI, A.; HEMMAMI, H.; SEGHIR, B. B.; ELBOUGHDIRI, N.; GHAREBA, S.; GHERNAOUT, D.; ABBAS, N. ATR-FTIR Spectroscopy, HPLC Chromatography, and Multivariate Analysis for Controlling Bee Pollen Quality in Some Algerian Regions. **ACS Omega**, v. 6, n. 7, p. 4878-4887, 2021.

ZEIDAN, J.; FOMBONNE, E.; SCORAH, J.; IBRAHIM, A.; DURKIN, M. S.; SAXENA, S.; YUSUF, A.; SHIH, A.; ELSABBAGH, M. Global prevalence of autism: A systematic review update. **Autism Res**, v. 15, n. 5, p. 778-790, 2022.