ESPECTROSCOPIA FT-IR APLICADA AO DIAGNÓSTICO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA- ESTUDO DE CASO ENTRE IRMÃOS

Sarah Bravo Christensen, Jader Manoel do Nascimento, Geraldo Magno Alves de Abreu, Leandro José Raniero, Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, sarahbravoch@gmail.com.

Resumo

Estudo de caso exploratório que avaliou a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) na análise salivar de três irmãos: dois com Transtorno do Espectro Autista (T1 e T2) e um recém-nascido sem diagnóstico formal (X), com o objetivo de identificar características espectrais e fatores gestacionais e perinatais potencialmente relacionados ao transtorno. Saliva não estimulada (2 mL) foi coletada dos participantes e submetida à análise por espectroscopia FT-IR. Os espectros adquiridos (4000–400 cm^{-1}) em triplicata foram pré-processados por correção da linha de base e normalização min-max (0–1) no software OPUS e submetidos à análise de agrupamento hierárquico (HCA). Os resultados indicaram variações espectrais perceptíveis nas regiões de Amida I e II e de carboidratos/ácidos nucleicos; T1 e T2 apresentaram perfil espectral semelhante, enquanto X mostrou-se distinto. O dendrograma (HCA) segregou T1 e T2 em um único ramo, enquanto a amostra X originou um ramo separado. Os dados gestacionais e perinatais foram inconsistentes. Conclui-se que a FT-IR, aliada à HCA, é uma ferramenta adjuvante promissora para o diagnóstico precoce do TEA.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro Autista. Espectroscopia FT-IR. Saliva. Diagnóstico precoce.

Área do Conhecimento: Biomedicina**.**

Introdução

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) caracteriza-se por alterações persistentes na comunicação e na interação social, bem como por padrões restritos e repetitivos de comportamento. É uma condição do neurodesenvolvimento de etiologia multifatorial e heterogênea, cuja caracterização fundamenta-se atualmente nos critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) (LORD *et al.*, 2018). Nesse contexto, a busca por biomarcadores biológicos têm ganhado destaque, especialmente os obtidos por métodos minimamente invasivos. A saliva tem sido considerada uma fonte promissora para a identificação desses biomarcadores devido à facilidade de coleta e ao potencial de refletir alterações sistêmicas associadas ao neurodesenvolvimento (SHARMA *et al.*, 2023).

Considerando a necessidade de métodos diagnósticos adjuvantes que permitam identificar alterações biológicas de forma rápida, segura e não invasiva, técnicas analíticas capazes de caracterizar o perfil molecular de fluidos biológicos vêm sendo amplamente investigadas (BAKER *et al.*, 2013; CAETANO *et al.*, 2015; YORGUNER *et al.*, 2020). Entre essas técnicas, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) destaca-se como uma ferramenta biofotônica capaz de fornecer uma impressão digital molecular (*fingerprint*) das amostras biológicas, permitindo a identificação de alterações em proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos. Estudos demonstraram que a FT-IR apresenta elevada sensibilidade para detectar pequenas diferenças bioquímicas em fluidos biológicos, sendo uma ferramenta promissora para a identificação de biomarcadores associados a diferentes condições clínicas (MOVASAGHI *et al.*, 2008; OLLESCH *et al.*, 2013; YORGUNER *et al.*, 2020).

No contexto do TEA, Pinto (2022) avaliou amostras salivares de indivíduos diagnosticados com autismo por meio da espectroscopia FT-IR e observou diferenças espectrais entre indivíduos com TEA e controles neurotípicos, sugerindo o potencial da técnica para auxiliar no diagnóstico precoce. Recentemente, Pinto *et al.* (2025) demonstraram que a associação entre espectroscopia FT-IR e algoritmos de aprendizado de máquina permitiu distinguir indivíduos com TEA de controles, com elevados índices de sensibilidade e especificidade, reforçando a viabilidade da saliva como ferramenta diagnóstica. Diante da necessidade de métodos diagnósticos adjuvantes, objetivos e de fácil aplicação,

este trabalho propõe o uso da espectroscopia FT-IR para a análise da saliva de crianças na primeira infância.

Por meio de um estudo de caso exploratório envolvendo três irmãos — dois diagnosticados com Transtorno do Espectro Autista e um recém-nascido, sem diagnóstico formal —, a pesquisa visou identificar possíveis diferenças espectrais salivares que possam sugerir padrões associados ao transtorno no participante recém-nascido, considerando o histórico familiar. Investigou-se, ainda, a influência de fatores gestacionais e perinatais nos perfis analisados, com o objetivo de oferecer subsídios para futuras investigações sobre o mapeamento de risco e o suporte ao diagnóstico clínico.

Metodologia

Trata-se de um estudo de caso clínico e exploratório piloto, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer nº 7.823.873). Foram avaliados três participantes irmãos, do sexo masculino, identificados como T1, com 5 anos e 3 meses; T2, com 2 anos e 5 meses; e X, com 2 meses. Foi apresentado aos pais o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após o esclarecimento das dúvidas, os pais concordaram em participar da pesquisa e assinaram o referido termo. Adicionalmente, responderam a um questionário elaborado pela equipe de pesquisa para o estudo, que continha informações sobre o período gestacional e as condições perinatais das crianças.

A coleta das amostras foi realizada individualmente em ambiente clínico reservado. Antes do procedimento, os responsáveis receberam orientações para que a criança permanecesse por pelo menos duas horas sem ingerir alimentos ou bebidas (exceto água) nem realizar higiene bucal. Inicialmente, foi realizada a avaliação da cavidade oral para verificar a ausência de lesões ou alterações que pudessem interferir nos resultados. Em seguida, foram coletados 2 mL de saliva não estimulada por meio da aspiração do fluido acumulado no assoalho bucal, com o auxílio de pipeta Pasteur esterilizada e adequada a cada faixa etária, ou pelo método de cuspir (coletor universal), quando compatível com a idade e a colaboração da criança. As amostras coletadas foram imediatamente acondicionadas em tubos estéreis identificados e transportadas sob refrigeração (5 °C) ao Laboratório Multiusuários do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - Univap. As amostras foram processadas em centrífuga (CF 16RN-Hitachi) a 10.000 rpm por 10 minutos, com o objetivo de remover possíveis impurezas. A parte líquida da amostra (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo estéril de 1,5 mL, enquanto o precipitado foi armazenado separadamente em outro tubo devidamente identificado e acondicionado em freezer a -80 °C para posterior análise.

Para a obtenção dos espectros, as amostras de saliva foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas em um agitador vórtex. Foi utilizado o espectrofotômetro no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR, série Bruker INVENIO). Uma alíquota de 20 µL foi depositada sobre o porta-amostra e submetida à desidratação por 5 minutos, com fluxo de ar comprimido a 2 L/min, a fim de minimizar a interferência da forte absorção de água no infravermelho. Os espectros foram obtidos em triplicata, no modo de absorbância, na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1}, com 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1}. Para minimizar a influência de componentes atmosféricos, como vapor de água (H_2O) e dióxido de carbono (CO_2), foi realizado um espectro de fundo (*background*) antes da aquisição de cada amostra.

Os dados espectrais foram pré processados por correção da linha de base e normalização min-max (0-1) seguida da média dos espectros em triplicata para cada amostra usando o pacote de software OPUS (versão 4.2, Bruker) e análise de agrupamento hierárquico (HCA).

Resultados

A análise das respostas ao questionário aplicado permitiu observar que os três participantes nasceram por parto cesáreo, com idades gestacionais semelhantes: T1, 38 semanas; T2, 39 semanas; e X, 40 semanas. Em nenhuma das três gestações foi relatado consumo de álcool ou de drogas. A idade materna aumentou progressivamente entre as gestações, sendo de 31 anos para T1, 34 anos para T2 e 38 anos para X, esta última considerada idade materna avançada. Nas gestações de T1 e T2, foram relatados diabetes gestacional ao final da gravidez e uso de ácido acetilsalicílico, sem informação sobre o período de uso desse fármaco. Na gestação de X não foram relatadas complicações gestacionais, apenas o uso de vitaminas e suplementos.

Especificamente na gestação de T1, houve relato de tabagismo no início da gravidez e de uso de sertralina. No período pós-parto imediato, T1 necessitou de internação em Unidade de Terapia

Intensiva (UTI) devido à dificuldade respiratória, enquanto T2 e X não apresentaram complicações pós-parto (Tabela 1).

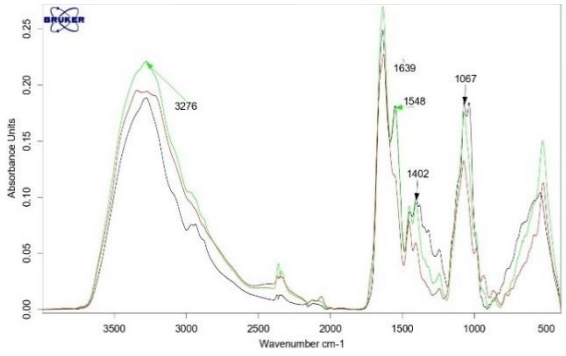
Tabela 1 – Características relatadas pelos pais durante o período gestacional ou perinatal imediato

Características	T1	T2	X
Idade materna na gestação	31 anos	34 anos	38 anos
Idade gestacional ao nascimento	38 semanas	39 semanas	40 semanas
Tipo de parto	Cesariana	Cesariana	Cesariana
Diabetes gestacional	Sim, ao final da gestação	Sim, ao final da gestação	Não
Uso de medicamentos/suplementos na gestação	Ácido acetilsalicílico, Sertralina	Ácido acetilsalicílico	Vitaminas e suplementos gestacionais
Tabagismo	Sim. Interrompeu na gravidez	Não	Não
Consumo de álcool/drogas	Não	Não	Não
Complicações no pós-parto imediato	Internação em UTI- Dificuldade respiratória	Não	Não

Fonte: Autor (2026).

A análise por espectroscopia FTIR das amostras salivares dos três irmãos revelou perfis espectrais distintos entre os indivíduos avaliados. Na Figura 1, foram observadas variações expressivas na intensidade das bandas de absorção, com destaque para as regiões 1800–1500 cm^{-1}, associadas ao estiramento de Amida I e Amida II de proteínas e lipídeos, e 1200–900 cm^{-1}, correspondentes a carboidratos, ácidos nucleicos e estiramentos de fosfato. Tais divergências espectrais indicam alterações qualitativas e quantitativas marcantes na composição bioquímica salivar dos dois irmãos diagnosticados com TEA (T1 e T2), em comparação com o irmão sem diagnóstico (X).

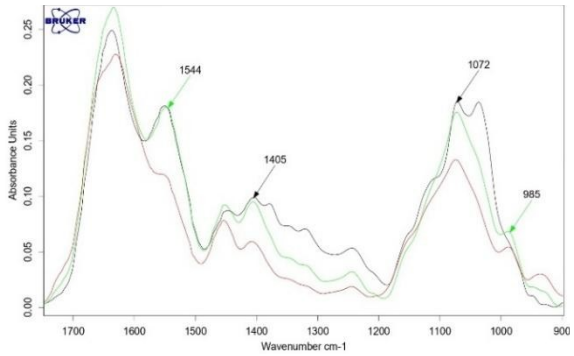
Figura 1 – Espectros médios de FTIR das amostras de saliva dos participantes T1, T2 e X, registrados na faixa espectral de 3500–500 cm^{-1}, evidenciando o perfil vibracional das amostras analisadas (T1: linha vermelha; T2: linha verde, correspondentes aos irmãos com diagnóstico de TEA; e X: linha preta, correspondente ao irmão sem diagnóstico).



Fonte: Autor (2026).

Na região de 1800–1500 cm^{-1}, associada às proteínas salivares, observaram-se pequenas diferenças na intensidade entre os participantes. Por outro lado, na região entre 1200–900 cm^{-1}, as diferenças foram mais evidentes: T1 e T2 apresentaram maior similaridade entre si, enquanto X exibiu um perfil distinto (Figura 2).

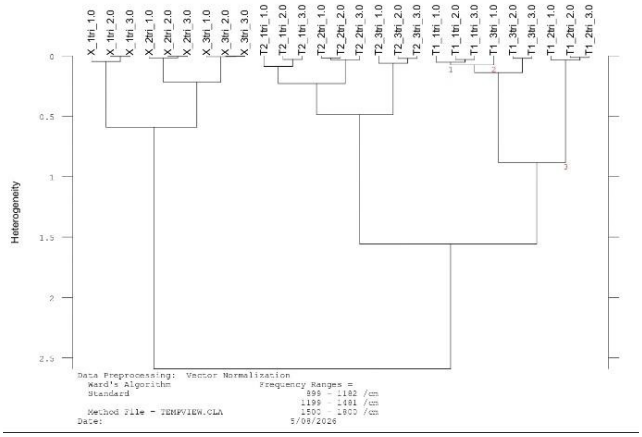
Figura 2 - Espectros de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das amostras salivares. As curvas representam os perfis biomoleculares dos indivíduos avaliados: T1 (linha vermelha) e T2 (linha verde), correspondentes aos irmãos com diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista (TEA); e X (linha preta), correspondente ao irmão sem diagnóstico.



Fonte: Autor (2026).

A Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), conduzida pelo método de Ward, com normalização vetorial nos intervalos 899-1481 cm e 1500-1800 cm, demonstrou alta sensibilidade na discriminação entre as amostras X e T1 e T2, com ramificação primária em nível elevado de heterogeneidade. Observou-se maior similaridade entre os participantes T1 e T2, que se agruparam em um nível de heterogeneidade de 1,5. Em contrapartida, as amostras estudadas apresentaram uma ramificação primária de heterogeneidade (2,7), evidenciando o afastamento do perfil espectral de X em relação aos perfis de T1 e T2 (Figura 3).

Figura 3 - Dendrograma de agrupamento hierárquico (HCA, método de Ward) obtido a partir dos perfis espectrais de saliva dos participantes T1, T2 e X.



Fonte: Autor (2026).

Discussão

Este estudo de caso permitiu identificar possíveis diferenças espectrais em amostras de saliva de participantes com diagnóstico formal de TEA, em comparação com o perfil espectral do participante X, sem diagnóstico. Permitiu, ainda, investigar, por meio da aplicação de um questionário estruturado, a possível influência de fatores gestacionais, perinatais e nutricionais sobre os perfis dos participantes, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de triagem precoce e de suporte ao diagnóstico clínico.

O diagnóstico objetivo do Transtorno do Espectro Autista (TEA) ainda constitui um desafio na prática médica, o que motiva este estudo de caso entre irmãos. Embora a investigação da influência de fatores gestacionais e perinatais sobre os perfis analisados possa contribuir para o desenvolvimento de estratégias de triagem precoce e de suporte ao diagnóstico clínico, essas evidências não são conclusivas nem específicas para o TEA. Ao comparar os questionários dos três participantes, identificaram-se características comuns e algumas divergências nas histórias clínicas maternas das distintas gestações. As diferenças detectadas entre os episódios de gravidez não foram suficientemente consistentes para correlacioná-las com o transtorno, exceto pelo uso de ácido

acetilsalicílico. No entanto, um estudo recente sobre o uso desse fármaco durante a gestação não demonstrou associação consistente com o relato de alterações no neurodesenvolvimento (HOFFMAN *et al.*, 2024). Com relação ao tempo decorrido entre o nascimento e o diagnóstico de TEA, observou-se que, enquanto T1 foi diagnosticado aos 40 meses, T2 obteve essa classificação aos 18 meses de idade, representando uma redução de 22 meses, que pode ter sido antecipada em virtude do histórico familiar. Essa variação na idade diagnóstica ilustra uma problemática amplamente discutida na ciência: os impactos do atraso no diagnóstico e no início do acompanhamento do autismo (ZWAIGENBAUM *et al.*, 2015). Do ponto de vista do desenvolvimento infantil, a primeira infância representa uma janela crucial do desenvolvimento cerebral, caracterizada por elevada neuroplasticidade, entendida como a capacidade do cérebro de modificar e reorganizar suas estruturas e conexões neurais em resposta a experiências, estímulos e processos de aprendizagem (MARZOLA *et al.*, 2023). Como consequência, crianças que recebem o laudo mais tarde perdem essa janela de desenvolvimento de novas conexões no sistema nervoso central, o que dificulta ou impede o ganho de habilidades de fala e de convivência social (HORLIN *et al.*, 2014; ESTES *et al.*, 2015; ZWAIGENBAUM *et al.*, 2015).

A análise dos espectros FTIR de T1, T2 e X revelou diferenças principalmente nas regiões associadas às proteínas. T2 apresentou maior intensidade em 3276 e 1639 cm^{-1}, enquanto em 1544 cm^{-1}, T2 e X apresentaram os maiores sinais em relação a T1. Pinto (2022) também identificou diferenças nas regiões de Amida I e Amida II ao comparar indivíduos com TEA e indivíduos neurotípicos, o que demonstra a importância dessas regiões na caracterização do perfil salivar. Entretanto, enquanto no estudo de Pinto (2022) as bandas próximas a 1637 e 1543 cm^{-1} apresentaram maiores áreas no grupo neurotípico, no presente estudo T2 apresentou maior intensidade nessas regiões. Essa diferença demonstra que a intensidade das bandas pode variar entre indivíduos, mesmo quando pertencem ao mesmo grupo. Nas regiões de menor número de onda, X apresentou maior intensidade em 1405 e 1072 cm^{-1}, enquanto T2 apresentou o maior sinal em 985 cm^{-1}. Pinto (2022) também observou diferenças nas regiões próximas a 1406 e 1079 cm^{-1}, mais acentuadas no grupo neurotípico. Assim, o comportamento de X nessas duas regiões pode estar relacionado ao padrão observado por Pinto (2022) entre os neurotípicos. Por outro lado, em 985 cm^{-1}, T1 e T2 apresentaram alterações espectrais em comparação com X.

Outras características espectrais de destaque foram observadas nas regiões de 1548 cm^{-1} (Amida II - vibração dos grupos de peptídeos) em T1 e de 1402 cm^{-1}, característico de grupos metil de proteínas e lipídios, em T2, podendo ser associadas à heterogeneidade das amostras, nas quais diferentes indivíduos com TEA apresentaram variações no perfil de componentes salivares (Pinto, 2022). Dessa forma, os resultados do presente caso clínico exploratório sugerem que a presença do diagnóstico de TEA não determina um único padrão espectral, podendo haver diferenças individuais importantes entre pessoas com a mesma condição, inclusive entre irmãos. Portanto, os resultados indicam que o FTIR permite identificar diferenças no perfil espectral de amostras de saliva, mas a interpretação deve considerar o conjunto de regiões espectrais e a variabilidade individual, e não apenas a intensidade de uma banda isolada.

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) gerou um dendrograma com dois ramos distintos: um com a amostra X e outro englobando as amostras T1 e T2, o que indica maior similaridade físico-química entre os participantes com diagnóstico formal de TEA. Em contrapartida, a separação da amostra X ocorreu apenas em um nível de fusão mais elevado, o que reflete menor similaridade de seu perfil espectral em relação aos irmãos. Assim, o agrupamento sugere tendências de diferenciação espectral, que podem estar associadas tanto a fatores do desenvolvimento infantil e à maturidade metabólica quanto a potenciais variações intrínsecas ao histórico familiar do transtorno, o que requer investigações mais amplas.

De modo geral, o dendrograma reforça os resultados de Pinto (2022) ao evidenciar uma tendência de segregação entre indivíduos com TEA e indivíduos neurotípicos. Entretanto, a análise também evidencia que T1 e T2 não são idênticos, mas apresentam maior similaridade entre si quando comparados a X. Dessa forma, a análise de cluster reforça a interpretação dos dados espectrais ao demonstrar que as diferenças entre os participantes podem ser observadas considerando o perfil espectral global, apoiando a hipótese de que o FTIR pode identificar padrões bioquímicos distintos relacionados ao TEA, embora os resultados devam ser interpretados com cautela devido ao reduzido número de indivíduos analisados.

Por se tratar de um estudo de caso envolvendo apenas três indivíduos, em diferentes faixas etárias e fases de desenvolvimento, os resultados não permitem generalizações a outras populações. Além

disso, a análise de agrupamento hierárquico utilizada é uma técnica não supervisionada, capaz de evidenciar similaridades e diferenças entre perfis espectrais, mas não de estabelecer diagnóstico nem de avaliar o desempenho de classificação do TEA. Ainda assim, os achados indicam que a espectroscopia FTIR pode ser útil na caracterização exploratória de perfis salivares, o que justifica estudos futuros com um número maior de participantes, grupos etários comparáveis e métodos de validação apropriados.

Considerando que os três participantes pertencem à mesma família e compartilham uma importante similaridade genética, o acompanhamento clínico e laboratorial de X ao longo de seu desenvolvimento seria de grande interesse. A realização de novas análises de saliva, associadas à reaplicação dos questionários durante a introdução alimentar e nos meses seguintes, permitiria verificar se o perfil espectral observado aos dois meses de vida permanece distinto do observado nos irmãos diagnosticados com TEA. Modificações no perfil espectral da amostra de saliva associadas ao surgimento de alterações nos sinais clínicos do neurodesenvolvimento poderiam contribuir para a compreensão da evolução do TEA, bem como atuar como ferramenta de rastreamento precoce desse transtorno.

Conclusão

Os resultados deste estudo de caso mostraram diferenças nos perfis espectrais das amostras de saliva dos três irmãos. Entretanto, essas diferenças podem estar relacionadas às distintas fases do desenvolvimento infantil dos participantes, e não necessariamente ao transtorno do Espectro Autista. A análise de agrupamento hierárquico demonstrou segregação entre os perfis espectrais de T1 e T2 e o perfil de X. Contudo, por se tratar de uma análise não supervisionada, esse agrupamento não permite estabelecer diagnóstico ou capacidade de classificação para o TEA. Assim, os resultados devem ser considerados exploratórios e necessitam de confirmação em estudos com amostras mais amplas e grupos comparáveis quanto à faixa etária.

Referências

BAKER, Matthew J. *et al.* Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature protocols**, v. 9, n. 8, p. 1771-1791, 2014.

CAETANO, Paulo Cesar *et al.* Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. **Research on Biomedical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 116-124, 2015.

ESTES, Annette *et al.* Behavioral, cognitive, and adaptive development in infants with autism spectrum disorder in the first 2 years of life. **Journal of neurodevelopmental disorders**, v. 7, n. 1, p. 24, 2015.

HOFFMAN, Matthew K. *et al.* Neurodevelopment of children whose mothers were randomized to low-dose aspirin during pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 143, n. 4, p. 554, 2024.

HORLIN, Chiara *et al.* The cost of autism spectrum disorders. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e106552, 2014.

LORD, Catherine *et al.* Autism spectrum disorder. **The lancet**, v. 392, n. 10146, p. 508-520, 2018.

MARZOLA, Patrícia *et al.* Exploring the role of neuroplasticity in development, aging, and neurodegeneration. **Brain sciences**, v. 13, n. 12, p. 1610, 2023.

MOVASAGHI, Zanyar *et al.* Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied spectroscopy reviews**, v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008.

OLLESCH, Julian *et al.* FTIR spectroscopy of biofluids revisited: an automated approach to spectral biomarker identification. **Analyst**, v. 138, n. 14, p. 4092-4102, 2013.

PINTO, M. M. V. *Análise da saliva de indivíduos diagnosticados com transtorno do espectro autista por FT-IR e Elisa*. 2022. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2022. Disponível em: https://repositorio.univap.br. Acesso em: 17 jun. 2026.

PINTO, Mayara Moniz Vieira *et al.* Saliva FTIR spectra and machine learning for autism spectrum disorder diagnosis—Preliminary study. **IEEE Photonics Journal**, v. 17, n. 3, p. 1-4, 2025.

SHARMA, Vaibhav *et al.* Saliva based diagnostic methodologies for a fast track detection of autism spectrum disorder: A mini-review. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 893251, 2023.

YORGUNER, NEŞE. Auxiliary differential diagnosis of schizophrenia and phases of bipolar disorder based on the blood serum Raman spectra. 2020.

ZWAIGENBAUM, Lonnie *et al.* Early identification of autism spectrum disorder: recommendations for practice and research. **Pediatrics**, v. 136, n. Supplement_1, p. S10-S40, 2015.

Agradecimentos:

- Aos pais e aos participantes pela inestimável colaboração.
- O presente trabalho foi realizado com o apoio do Convênio FINEP e FVE/UNIVAP 01.24.0702.00 - Ref.0646/24.