

IDENTIFICAÇÃO DE DIVERGÊNCIAS ESPECTRAIS ENTRE GENITORES NEUROTÍPICOS E FILHOS AUTISTAS PELA ANÁLISE DE SALIVA

Jader Manoel do Nascimento, Juliana Salgado Coelho Cotrin, Maria Clara Simões Giovaneli Mendonça, Leandro José Raniero, Geraldo Magno Alves de Abreu, 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, jader@univap.br; julianasalgadocoelho@gmail.com; mcsqm-11@hotmail.com; Iraniero@univap.br; deabreumagno@gmail.com; mirela@univap.br.

Resumo

O Transtorno do Espectro Autista (TEA), alteração do neurodesenvolvimento com comprometimentos na interação e comunicação social, apresenta prevalência global 1/100 indivíduos. Seu diagnóstico é clínico, baseado em critérios comportamentais, e sua etiologia desconhecida. A saliva emerge como fluido biológico promissor na identificação de biomarcadores específicos do TEA pela espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Este estudo objetivou analisar amostras de saliva de genitores neurotípicos e filhos autistas por FT-IR para identificar bandas vibracionais que contribuam no diagnóstico do TEA. Foram coletados 1,5 ml de saliva de membros de grupo familiar composto por 2 filhos do sexo masculino (T1 e T2) portadores de TEA, e genitores neurotípicos (N1-pai e N2-mãe). As amostras foram analisadas pelo FT-IR, com contribuições nas regiões espectrais de 3274 – 3300 cm^{-1} e 1800 – 800 cm^{-1} . A análise de cluster hierárquica revelou dois grupos principais: N1 isolado e N2 agrupado com T1 e T2, com divergências entre 1800 a 800 cm^{-1} , sugerindo grande potencial do FTIR-ATR na identificação de biomarcadores salivares para o diagnóstico precoce de TEA.

Palavras-chave: FTIR-ATR. Saliva. Transtorno do Espectro Autista. Diagnóstico.

Área do Conhecimento: Ciência da Saúde – Biomedicina

Introdução

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) caracteriza-se como uma desordem do neurodesenvolvimento marcada por comprometimentos persistentes na interação e comunicação social, associados a padrões comportamentais repetitivos e estereotipados (DSM-5-TR., 2022). No consenso global sobre o autismo, os dados epidemiológicos mais recentes indicam prevalência aproximada de 1 em cada 100 crianças, com variações entre países e continentes (WHO, 2023).

Apesar dos avanços tecnológicos, o diagnóstico permanece baseado em critérios comportamentais do DSM-5-TR, envolvendo observação clínica, entrevistas parentais e instrumentos de triagem (DSM-5-TR; First *et al.*, 2024). A etiologia multifatorial inclui interações genéticas, neurológicas, imunológicas e ambientais, embora a fisiopatologia permaneça indeterminada (Maddalon *et al.*, 2025; Qin *et al.*, 2024). A ausência de terapias curativas e a complexidade do TEA indicam lacunas no diagnóstico precoce (Passarini *et al.*, 2024; Russel *et al.*, 2024).

A saliva se destaca como fluido biológico promissor para análise não invasiva, pela composição molecular comparável ao sangue, porém com coleta simplificada e de menor custo (Pinto *et al.*, 2025; Pinto *et al.*, 2021). A FTIR-ATR é uma técnica capaz de identificar de forma precisa a composição bioquímica de uma amostra, demonstra aplicabilidade na identificação de biomoléculas salivares, oferecendo potencial para destacar biomarcadores específicos do TEA (Lucier; Caixeta., 2025).

Este estudo propõe analisar perfis espectroscópicos para identificar possíveis divergências espectrais entre genitores neurotípicos e filhos autistas pela análise de saliva por FT-IR.

Metodologia

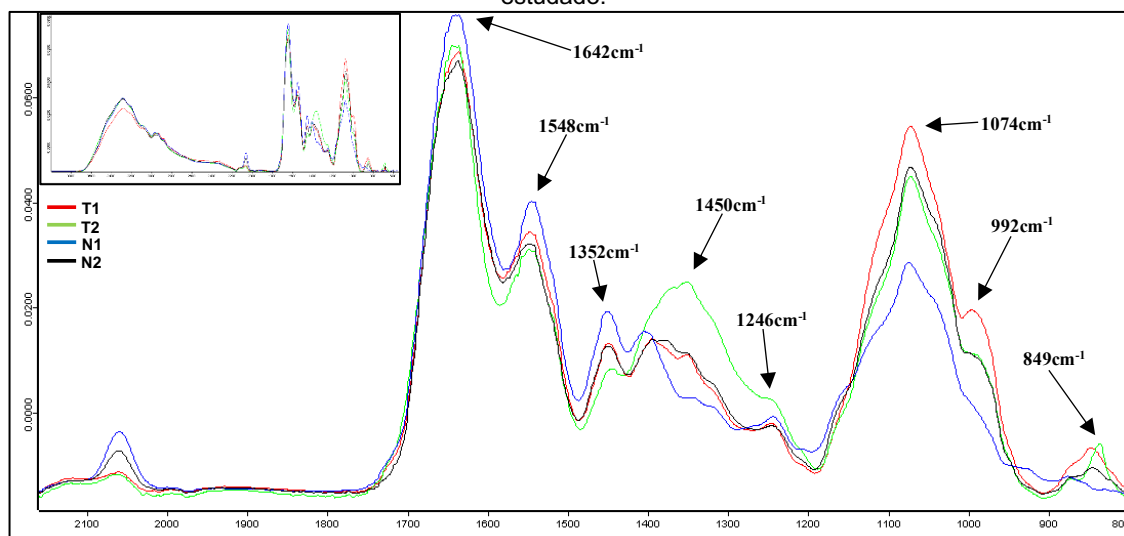
Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o parecer – CEP-UNIVAP no 7.069.519. Participaram deste estudo de caso um grupo familiar composto por 2 filhos do sexo masculino com diagnóstico de TEA, um com 8 anos e 10 meses (T1) e outro com 16 anos de idade (T2), os genitores, adultos neurotípicos, o pai (N1) com 47 anos, e a mãe (N2) com 42 anos de idade. Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e de Assentimento, este escrito em linguagem acessível. Para coleta das amostras de saliva, os participantes foram orientados a evitar, por pelo menos 2 horas antes da coleta, a ingestão de alimentos e líquidos (exceto água), bem como abster-se de consumir alimentos e produtos com cafeína e escovar os dentes. A coleta das amostras foi realizada individualmente, entre 14 e 17 horas, em consultório odontológico. Para a coleta, os participantes mantiveram a cabeça inclinada para frente, e a saliva não estimulada foi coletada com pipeta Pasteur e acondicionada em ependorf (1,5 mL). As amostras foram centrifugadas (10000 rpm, 10 minutos, 20 °C), sendo o sobrenadante selecionado e conservado a -80 °C, sendo descongeladas e homogeneizadas em agitador vórtex (10 segundos) para análise pela Espectroscopia FT-IR associada ao acessório ATR (Spectrum Two, Perkin-Elmer), com cristal de diamante. O background foi feito com o cristal limpo, com os mesmos parâmetros utilizados para a análise das amostras, sendo eles: região espectral de 4000 a 750 cm^{-1} , média de 16 varreduras por amostra e resolução espectral de 4 cm^{-1} . Na preparação da amostra, 20 microlitros foram depositados sobre o cristal de diamante e desidratado por meio de um jato de ar purificado.

Os espectros coletados foram tratados pelo programa OPUS (versão 4.2) com o objetivo de remover pequenas variações espectrais relacionadas às diferenças de biomassa da amostra e melhorar a comparação entre os espectros. Foram feitas correções de linha de base, seguida de normalização. Os dados tratados serviram como entrada para análise de conjunto hierárquica (Hierarchical Cluster Analysis – HCA) usando as distâncias entre os espectros e algoritmo de agregação.

Resultados

Foram realizadas correções de linha de base, seguida de normalização vetorial. Os espectros coletados foram analisados selecionando-se três regiões espectrais discriminantes: 3274 a 3300 cm^{-1} , e 1800 a 800 cm^{-1} . A Figura 1 exibe os espectros individuais das amostras salivares, podendo ser observadas variações significativas na intensidade e contorno dos picos, em regiões específicas correspondentes aos números de onda: 3287 cm^{-1} , 3078 cm^{-1} , 2962 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} , 1548 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1352 cm^{-1} , 1246 cm^{-1} , 1074 cm^{-1} , 992 cm^{-1} e 849 cm^{-1} .

Figura 1: Espectros individuais das amostras de saliva dos indivíduos neurotípicos e autistas do grupo familiar estudado.

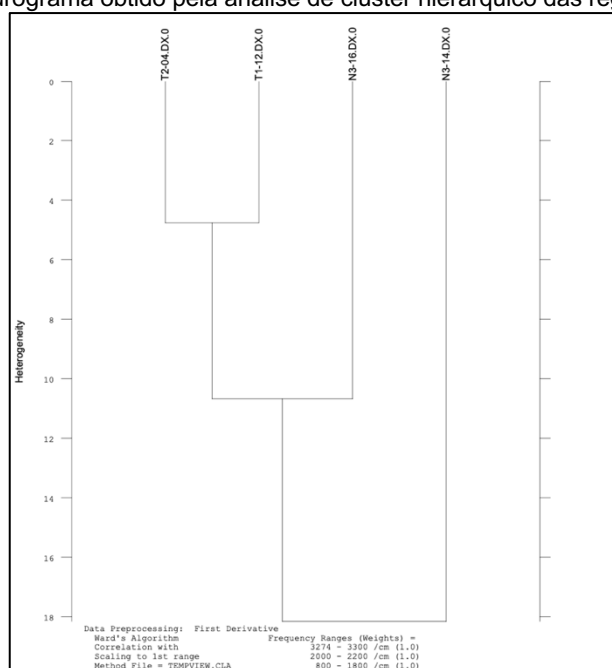


Fonte: Autores, 2025.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Os dados tratados serviram como entrada para análise de conjunto hierárquica (Hierarchical Cluster Analysis – HCA) usando as distâncias entre os espectros e algoritmo de agregação, obtendo-se o cluster das amostras que apresenta dois agrupamentos principais (Figura 2) agrupados conforme similaridades principais, fornecendo uma análise qualitativa. A análise de cluster hierárquica agrupou as amostras em dois conjuntos diferentes, um deles com a amostra N1, isolada, e no outro as amostras N2, T1 e T2, que por sua vez se separam em dois conjuntos distintos, um deles com as amostras T1 e T2 e o outro com a amostra N2.

Figura 2: Dendrograma obtido pela análise de cluster hierárquico das regiões espectrais



Fonte: Autores, 2025.

Tabela 1: Regiões espectrais e suas respectivas moléculas identificadas

Número de onda	Moléculas	Modos vibracionais
2962 cm ⁻¹	Lipídios (colesterol, mono/diglicerídeos e fosfolipídios), proteínas salivares, DNA, ácidos graxos, tiocianato, creatina, metilenos e amida A. Amida A e tiocianato (ânion inorgânico).	ν(CH ₃) do grupo metil e ν(CH ₂) metileno de ácidos graxos; Cadeias de acila dos lipídios; ν(C-Hasym) do grupo metil e metileno; ν(CH ₂) e ν(CH ₃) de fosfolipídios, colesterol e creatina; vas(CH) e vs(CH) do grupo metil e metileno;
1544cm ⁻¹ a 1642cm ⁻¹	Proteínas salivares (albumina e amida I e II). Amida I de estruturas α-hélice e de folhas β-pregueadas.	ν(C=O); ν(C=C) aromático; δ(NH) de amida II e α-hélice de proteínas e aminoácidos; ν(NH) e ν(CN) da amida II;
1353cm ⁻¹ a 1450cm ⁻¹	Ácidos graxos, lipídios, proteínas salivares, grupos metila em proteínas, hormônios, metilenos em cadeias laterais de aminoácidos, grupos carboxilato e albumina.	δ(CH ₃) do grupo metil e δ(CH ₂) metileno dos ácidos graxos; ν(C-Hasym) do anel aromático; vs(C=O) e (COO ⁻);
1073 cm ⁻¹	Polissacarídeos, glicose, proteínas glicosiladas, hormônios, fosfato I, carboidratos, DNA, amida III e	ν(CO) e ν(CC); δ(COH) e δ(COC) de carboidratos;

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

a 1244 cm⁻¹	fosfolipídios, proteínas glicosiladas, grupos fosfato de DNA e lisozima.	$\nu_s(\text{P=O})$ do grupo fosfato; $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$; $\nu(\text{CO})$ e $\nu(\text{COH})$; $\delta(\text{CO})$; $\nu(\text{P=Osym})$ e $\nu(\text{CO})$
992 cm⁻¹	Carboidratos, proteínas glicosiladas, grupos fosfato de DNA, ribose, RNA, α -amidase glicosilada, polissacarídeos, fosfatos inorgânicos, proteínas, lipídios de membrana e hélice esquerda de DNA (forma Z).	$\delta_s(\text{CH}_3)$ e $\delta(\text{CC})$; $\nu(\text{CO})$ da ribose; $\nu(\text{CC})$ da uracila do RNA; $\nu(\text{PO}_2^-)$, $\nu(\text{PO}_4)$, $\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{CH}_2\text{OH})$; $\delta_s(\text{CH}_3)$ e $\delta(\text{CC})$;
849 cm⁻¹	Ribose e hélice esquerda do DNA (forma Z)	$\nu(\text{CO})$ e estiramento simétrico de ácidos nucleicos

Fonte: Autor, 2025.

Discussão

A espectroscopia FTIR-ATR é uma técnica analítica sensível, que pode contribuir para discriminar perfis biomoleculares salivares em núcleo familiar composto por pais neurotípicos e filhos com o diagnóstico de TEA, evidenciando alterações qualitativas em biomoléculas salivares das amostras.

Em virtude das diferenças de intensidade e contorno de bandas observadas na região entre 3287 cm⁻¹ e 3078 cm⁻¹ serem discretas, a discussão dos resultados enfatizará a região entre 1800 e 800 cm⁻¹, na qual foram detectadas diferenças significativas entre picos e contornos de bandas.

Nos picos 1642 e 1548 cm⁻¹, correspondentes à Amida I e Amida II, foram observadas discretas diferenças de intensidade entre as amostras analisadas. Por outro lado, na região que compreende de 1500 a 1200 cm⁻¹ foram detectadas alterações significativas, incluindo maior intensidade no pico 1352 cm⁻¹ da amostra N1, enquanto a amostra T2 apresentou a menor intensidade em relação aos demais participantes. Essa região apresenta biomoléculas relacionadas a alterações em processos de metilação, desregulação no metabolismo de aminoácidos, com modificações nas vias de descarboxilação e genética no TEA (Boroumand *et al.*, 2021; Pinto *et al.*, 2025; Lucier, Caixeta., 2024; Pinto *et al.*, 2021; Silva., 2020).

Na banda de 1450 cm⁻¹ chama atenção a similaridade dos espectros de N2 e T1, que divergem em intensidade e conformação das amostras N1 e T2. Ressalta-se que T2, cuja intensidade nesse pico supera a das demais amostras, faz uso de medicamento que pode ter contribuído para esse aumento, aspecto que deverá ser investigado futuramente. Abrindo a discussão com relação a essa região específica dos espectros, disfunções gastrointestinais já detectadas em portadores de TEA podem estar relacionadas a essas alterações, considerando que nesta região estão presentes vibrações moleculares associadas a apêndices proteicos, ribossomos e membranas celulares, que podem se originar da elevação de citocinas liberadas no sistema imunológico pela presença de disbiose intestinal (Boroumand *et al.*, 2021; Pinto *et al.*, 2025; Pinto *et al.*, 2021; Manco *et al.*, 2021).

Uma das regiões de maior importância na análise espectral, por trazer especificidade, sendo reconhecida como região de “digital” da amostra, está compreendida entre 1200 a 800 cm⁻¹. Nessa região observam-se alterações espectrais que podem estar relacionadas ao desequilíbrio de ácidos graxos e colesterol, compatíveis com estudos que associam o TEA a anormalidades no metabolismo lipídico e em ácidos graxos comprometendo estruturas essenciais na sinalização celular, incluindo distúrbios mitocondriais relatados em estudos sobre o TEA (Wormwood *et al.*, 2023; Pinto *et al.*, 2021; El-ansary *et al.*, 2020; Frye *et al.*, 2017; Macfabe, 2013). Nessa faixa também foram identificadas vibrações moleculares de carboidratos, fosfatos inorgânicos, fosfolipídeos, lipídeos de membrana, grupos fosfodiéster de ácidos nucleicos, sendo que na faixa entre 900 e 800 cm⁻¹, observam-se picos exclusivos de oligopolissacarídeos presentes na amilase salivar e ácidos nucleicos na saliva (Muraoka *et al.*, 2022; Zlotogorski-hurvitz *et al.*, 2019).

Aumento expressivo na intensidade da amostra T1 foi detectada no pico 992 cm⁻¹, que pode estar relacionado a alterações epigenéticas observadas no autismo, uma vez que essa região é característica de modos vibracionais relacionados aos ácidos nucleicos (Pinto *et al.*, 2021; Loke *et al.*, 2015). Nesse mesmo comprimento de onda, a amostra N1 apresentou menor intensidade comparada às demais amostras analisadas.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Em 849 cm^{-1} foram detectados deslocamentos e alterações na conformação das bandas de cada uma das amostras estudadas, que podem estar relacionados à região de vibração da hélice esquerda do DNA, em sua forma Z, alteração esta que pode ser induzida por fatores ambientais ou estruturais. Uma hipótese para essas distintas intensidades observadas para cada amostra pode estar relacionada às características do genoma de cada um dos participantes do estudo (Bel'skaya *et al.*, 2020; Gallo *et al.*, 2017).

Entretanto, a casualidade dessas alterações espectrais permanece indeterminada, necessitando estudos longitudinais com maior número amostral, permitindo a distinção de fatores interdependentes de mecanismos fisiológicos, que incluem equilíbrio redox (Bjorklund *et al.*, 2020), hábitos alimentares (Macfabe *et al.*, 2007), processos inflamatórios crônicos (Macfabe *et al.*, 2015; Macfabe *et al.*, 2011), medicações ou suplementos (Slattery *et al.*, 2016).

A análise de cluster hierárquica (Hierarchical Cluster Analysis – HCA) foi aplicada aos dados espectrais processados. Esse método usou as distâncias entre os espectros e um algoritmo de agregação para agrupar as amostras. O resultado foi a formação de um cluster com dois agrupamentos principais, que se distinguiram com base em suas similaridades espectrais. Essa abordagem permitiu uma análise qualitativa dos dados, revelando padrões e similaridades entre as amostras.

Os resultados da HCA indicaram que apenas a amostra N1 não se agrupou com as amostras classificadas como TEA (T1 e T2), enquanto a N2 apresentou características espectrais detectadas nas amostras de portadores de TEA, indicando possíveis divergências espectrais entre genitores neurotípicos em comparação com os dos filhos autistas.

Conclusão

Os resultados do presente estudo permitiram identificar perfis espectroscópicos distintos indicando divergências espectrais entre genitores neurotípicos e filhos autistas pela análise de saliva por FT-IR. As principais diferenças identificadas foram no comprimento de onda de $1800\text{ a }800\text{ cm}^{-1}$ entre participantes com ou sem diagnóstico de TEA, permitindo a diferenciação em grupos das amostras de um núcleo familiar. Os resultados incentivam a continuidade de pesquisas com a ferramenta FT-IR visando o diagnóstico precoce, específico e de baixo custo para esse transtorno.

Referências

BEL'SKAYA, Lyudmila V.; SARF, Elena A.; SOLOMATIN, Denis V. Age and gender characteristics of the infrared spectra of normal human saliva. **Applied Spectroscopy**, v. 74, n. 5, p. 536-543, 2020.

BJORKLUND, Geir *et al.* Oxidative stress in autism spectrum disorder. **Molecular neurobiology**, v. 57, n. 5, p. 2314-2332, 2020.

BOROUMAND, Mozghan *et al.* Saliva, a bodily fluid with recognized and potential diagnostic applications. **Journal of separation science**, v. 44, n. 19, p. 3677-3690, 2021.

EL-ANSARY, Afaf *et al.* The role of lipidomics in autism spectrum disorder. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 24, n. 1, p. 31-48, 2020.

FIRST, Michael B. DSM-5-TR® Handbook of Differential Diagnosis. **American Psychiatric Pub**, 2024. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=MTfxEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR13&dq=DSM-5-TR&ots=bax7o_46kb&sig=s2QMI45k0aXlj6Eexs0kP8skMdg&redir_esc=y#v=onepage&q=DSM-5-TR&f=false>. Acesso em: 7 jul. 2025.

FRYE, Richard E. *et al.* Gastrointestinal dysfunction in autism spectrum disorder: the role of the mitochondria and the enteric microbiome. **Microbial ecology in health and disease**, v. 26, n. 1, p. 27458, 2015.

GALLO, Angela *et al.* ADAR RNA editing in human disease; more to it than meets the I. **Human genetics**, v. 136, n. 9, p. 1265-1278, 2017.

LOKE, Yuk Jing; HANNAN, Anthony John; CRAIG, Jeffrey Mark. The role of epigenetic change in autism spectrum disorders. **Frontiers in neurology**, v. 6, p. 107, 2015.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

LUCIER, O. L.; GABRIELLY COSTA CAIXETA. Análise de Espectro ATR-FTIR de amostras de sangue e saliva de indivíduos com Transtorno do Espectro Autista. **Ufms.br**, 2024.

MACFABE, Derrick F. Enteric short-chain fatty acids: microbial messengers of metabolism, mitochondria, and mind: implications in autism spectrum disorders. **Microbial ecology in health and disease**, v. 26, n. 1, p. 28177, 2015.

MACFABE, Derrick F. *et al.* Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: relevance to autism spectrum disorder. **Behavioural brain research**, v. 217, n. 1, p. 47-54, 2011.

MACFABE, Derrick F. *et al.* Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. **Behavioural brain research**, v. 176, n. 1, p. 149-169, 2007.

MACFABE, Derrick. Autism: metabolism, mitochondria, and the microbiome. **Global advances in health and medicine**, v. 2, n. 6, p. 52-66, 2013.

MADDALON, Luna; MINISSI, Maria Eleonora; ALCANIZ, Mariano. Early diagnosis of ASD using biomarkers: a narrative review. **Medicina**, v. 85, p. 3-8, 2025.

MANCO, Melania *et al.* Cross-sectional investigation of insulin resistance in youths with autism spectrum disorder. Any role for reduced brain glucose metabolism?. **Translational Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 229, 2021.

MURAOKA, Mariane Yumiko *et al.* Fructose and methylglyoxal-induced glycation alters structural and functional properties of salivary proteins, albumin and lysozyme. **PLoS One**, v. 17, n. 1, p. e0262369, 2022.

PASSARINI, Sara *et al.* The challenge of a late diagnosis of Autism Spectrum Disorder: co-occurring trajectories and camouflage tendencies. a case report of a young Autistic female with Avoidant Restrictive Food Intake Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 15, p. 1447562, 2025.

PINTO JR, Mayara Moniz Vieira *et al.* Saliva diagnosis of autistic spectrum disorder by FT-IR spectroscopy. In: **Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications XIII**. SPIE, 2021. p. 15-21.

PINTO, Mayara Moniz Vieira *et al.* Saliva FTIR spectra and Machine Learning for autism spectrum disorder diagnosis—preliminary study. **IEEE Photonics Journal**, 2025.

QIN, Lei *et al.* New advances in the diagnosis and treatment of autism spectrum disorders. **European Journal of Medical Research**, v. 29, n. 1, p. 322, 2024.

RUSSELL, Alison S. *et al.* Who, when, where, and why: A systematic review of “late diagnosis” in autism. **Autism Research**, v. 18, n. 1, p. 22-36, 2025.

SILVA, Suzana Ferreira de Paula *et al.* Avaliação de biomarcadores salivares para diagnóstico de transtorno de espectro autista por espectroscopia ATR-FTIR. 2020.

SLATTERY, John; MACFABE, Derrick F.; FRYE, Richard E. The significance of the enteric microbiome on the development of childhood disease: a review of prebiotic and probiotic therapies in disorders of childhood. **Clinical Medicine Insights: Pediatrics**, v. 10, p. CMPed. S38338, 2016.

WHO. **Autism Spectrum Disorders**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>>. Acesso em: 15 nov. 2023.

WORMWOOD, Kelly L. *et al.* A proteomics investigation of salivary profiles as potential biomarkers for Autism Spectrum Disorder (ASD). **The Protein Journal**, v. 42, n. 5, p. 607-620, 2023.

ZLOTOGORSKI-HURVITZ, Ayelet *et al.* FTIR-based spectrum of salivary exosomes coupled with computational-aided discriminating analysis in the diagnosis of oral cancer. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 145, n. 3, p. 685-694, 2019.