

ESPECTROSCOPIA FT-IR DE SALIVA COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA PARA DETECÇÃO DE AUTISMO: ESTUDO DE CASO EM IRMÃS

Juliana Salgado Coelho Cotrin, Maria Clara Simões Giovaneli Mendonça, Jader Manoel do Nascimento, Leandro José Raniero, Geraldo Magno Alves de Abreu, Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/Faculdade de Ciências da Saúde, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, julianasalgadocoelho@gmail.com; mcsgm-11@hotmail.com; jadermanumic2016@gmail.com; lraniero@univap.br; deabreumagno@gmail.com; mirela@univap.br;

Resumo

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma alteração no neurodesenvolvimento com difícil diagnóstico clínico, realizado por equipe multiprofissional. Este estudo comparou amostras de saliva de duas irmãs, por meio de espectroscopia FT-IR, para identificar alterações relacionadas ao TEA. Foram realizadas coletas individuais com ambas em jejum de 2 h, após a assinatura do TCLE (pela responsável pela participante com TEA e pela neurotípica) e do Termo de Assentimento (participante com TEA). Foram coletadas amostras de saliva não estimulada, posteriormente centrifugadas, analisando-se o sobrenadante pela espectroscopia FT-IR. A aquisição dos espectros revelou, na participante com TEA, menor concentração de proteínas (região entre 1600 e 1650 cm^{-1}) e maior presença de carboidratos e ácidos nucleicos (região entre 1000 e 1150 cm^{-1}) em comparação com a participante neurotípica, destacando a espectroscopia FT-IR como importante ferramenta adjuvante para diagnóstico desse transtorno. Os achados apontam que a espectroscopia de FT-IR é uma ferramenta versátil, podendo ser estudada como forma de diagnóstico específico do TEA.

Palavras-chave: Espectroscopia FT-IR. Autismo. Diagnóstico. Saliva.

Área do Conhecimento: Odontologia.

Introdução

Alterações na interação social, na comunicação e comportamento, assim como interesses e atividades restritos e repetitivos são características associadas ao Transtorno do Espectro Autista (TEA). Definida como um distúrbio do neurodesenvolvimento, apresenta sintomas e níveis de gravidade variados. Por ser uma condição complexa, cada indivíduo afetado pode apresentar características próprias e necessidades específicas, tornando o diagnóstico, que atualmente é exclusivamente clínico, um desafio (DSM, 2014; Cortese *et al.*, 2025).

A pesquisa por métodos diagnósticos objetivos é essencial para identificar com celeridade indivíduos portadores de TEA, permitindo intervenções precoces que impactem positivamente sua qualidade de vida. A análise de biomarcadores presentes em biofluidos como a saliva, requer pequeno volume de amostra e utiliza método de coleta minimamente invasivo, se apresentando como uma ferramenta promissora para agilizar o diagnóstico e ajustar as intervenções (Pinto *et al.*, 2021).

Esse biofluido possui relevância tanto no âmbito fisiológico quanto patológico e apresenta benefícios em exames laboratoriais quando comparado a outros métodos diagnósticos. Suas vantagens incluem facilidade de coleta, baixo nível de invasividade e custos reduzidos (Silva Neto *et al.*, 2020), atributos particularmente importantes em crianças, portadores de TEA e indivíduos com dificuldades na coleta de sangue.

Este estudo teve como objetivo demonstrar diferenças espectrais em componentes presentes nas amostras de saliva de irmãs, uma neurotípica e a outra com diagnóstico de TEA, com o objetivo de aplicar a espectroscopia por FT-IR como ferramenta de análise e diagnóstico do Transtorno do Espectro Autista (TEA). Considerando que a coleta salivar é não invasiva, dispensa preparo especial e apresenta custo relativamente baixo, essa técnica poderia ser empregada desde os primeiros dias de vida,

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

permitindo a identificação precoce de bebês com TEA e possibilitando sua inserção em intervenções na primeira infância, com potenciais ganhos significativos em sua qualidade de vida.

Metodologia

Este é um estudo comparativo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o parecer - CEP-UNIVAP- nº 7.069.519, desenvolvido a partir da coleta de saliva de duas irmãs, sendo uma classificada como neurotípica (51 anos de idade), e a outra como portadora de TEA (53 anos de idade). A coleta das amostras de saliva foi realizada após leitura, compreensão e concordância na participação na pesquisa, e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e do Termo de Assentimento pelas participantes e/ou responsáveis. As coletas foram precedidas de orientações que incluíram: evitar a ingestão de alimentos e líquidos (exceto água) por 2 horas, abster-se de alimentos e produtos com cafeína nas 24 h anteriores a coleta e evitar escovar os dentes por pelo menos 2 h antes da coleta.

A coleta das amostras foi realizada em consultório odontológico, entre 14 e 17 horas, pelos membros da equipe de pesquisa com as participantes individualmente atendidas. Após a acomodação das participantes, sentadas confortavelmente, foi realizada a limpeza da cavidade bucal, com bochechos utilizando água filtrada, descartada na sequência. As participantes foram orientadas a manter a cabeça ligeiramente inclinada para frente, permitindo o acúmulo da saliva não estimulada na cavidade bucal. Com o auxílio de pipeta Pasteur, foram coletados 2 mL de saliva acondicionados em tubos Eppendorf identificado, mantido em refrigeração até seu processamento. A saliva foi centrifugada por 10 minutos, com 10.000rpm a 20 °C, posteriormente o sobrenadante foi congelado (~-20) até o momento da análise. Para a análise pela espectroscopia FT-IR acoplada ao acessório de ATR, as amostras de saliva foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas em agitador vórtex por 30 segundos para homogeneização da amostra. Em seguida, 20 µL foram depositados no ATR de diamante, sendo desidratados por 10 minutos com fluxo de 1L/minuto de ar seco. Os espectros foram obtidos pelo espectrômetro FT-IR Spectrum Two da empresa Perkin-Elmer, acoplado a um ATR com cristal de diamante, como apresentado na Figura 1.

Os espectros foram obtidos por absorvância, no intervalo de 4000 a 750 cm^{-1} , com 16 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} . O background foi coletado com o cristal limpo, antes da obtenção de cada espectro. Os dados obtidos foram processados no software OPUS (versão 4.2), permitindo comparação mais precisa entre os espectros.

Figura 1- Espectrômetro FT-IR Spectrum Two da empresa Perkin-Elmer, acoplado a um ATR com cristal de diamante



Fonte: A autora (2025)

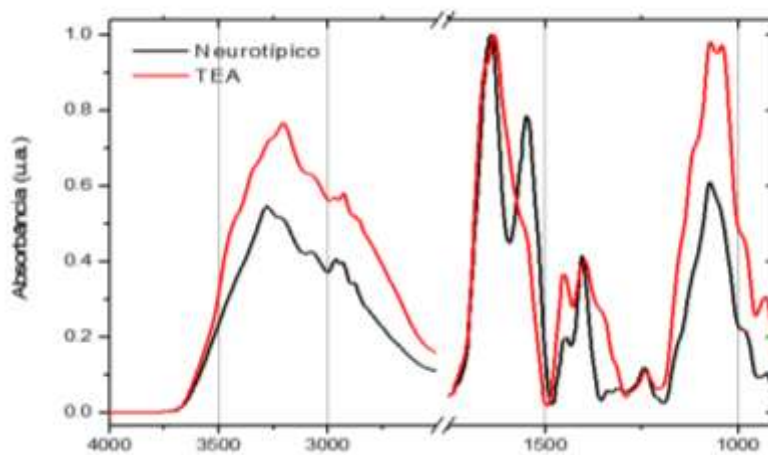
Resultados

A análise das amostras de saliva das irmãs (Figuras 2 e 3) permitiu identificar na participante com TEA diminuição nas ligações associadas às proteínas α -amilase, albumina, cistatinas, mucinas, proteínas ricas em prolina e imunoglobulina A secretora (slgA), especialmente na faixa espectral entre 1600 e 1650 cm^{-1} , em comparação ao pico correspondente dessa região na participante neurotípica. Em contraste, na região entre 1000 e 1150 cm^{-1} , a portadora de TEA apresentou um pico mais elevado,

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

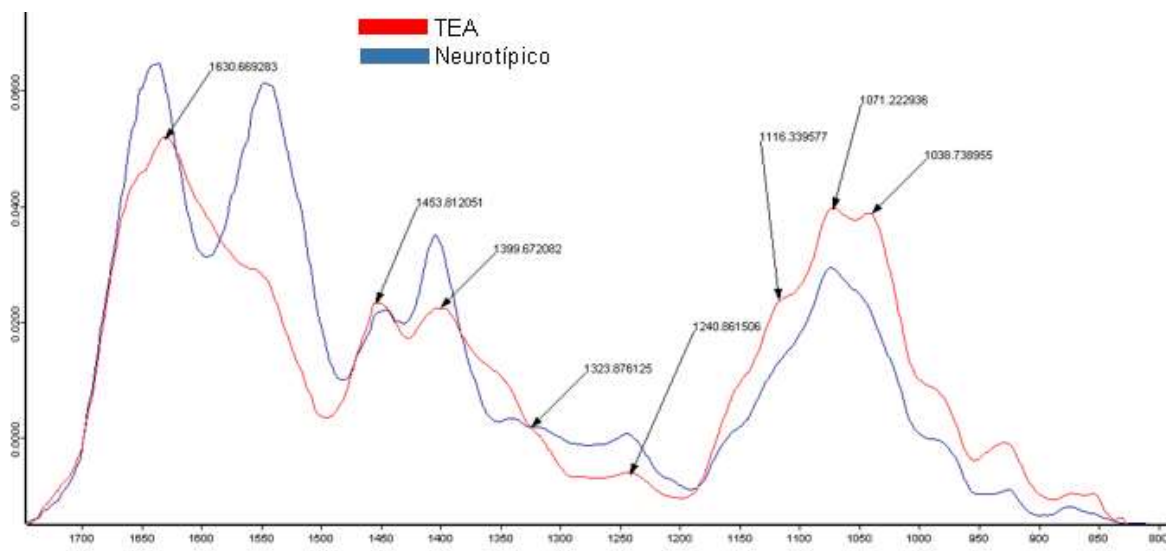
indicando maior predominância de ligações envolvendo carboidratos (glicogênio, glicose, frutose), proteínas glicosiladas (como α -amilase e mucinas), moléculas de açúcar, ácidos nucleicos (esqueleto açúcar-fosfato de RNA e DNA), fosfatos inorgânicos, fosfolipídios de membrana, grupos fosfodiéster e glicoproteínas. Esses resultados sugerem alterações na composição molecular da amostra de saliva na participante com TEA, caracterizada por menor presença de proteínas específicas e maior concentração de componentes relacionados a carboidratos, ácidos nucleicos e estruturas fosfatadas (Tabela 1).

Figura 2- Espectros característico da saliva do indivíduo autista (vermelho) e do neurotípico (preto).



Fonte- A autora (2025)

Figura 3- Caracterização das amostras de saliva na faixa espectral de 1900 a 800 cm^{-1}



Fonte: A autora (2025)

Tabela 1- Comparação das faixas espectrais e principais componentes moleculares associados às amostras analisadas no presente estudo.

Faixa Espectral (cm ⁻¹)	Componentes Moleculares Associados
1637 – 1581	Proteínas: α-amilase, albumina, cistatinas, mucinas, proteínas ricas em prolina, imunoglobulina A secretora (sIgA)
1492 – 1448	Proteínas (grupos metil); Lipídios; Hormônios (cortisol)
1447 – 1406	Proteínas (grupos metil); Lipídios (ácidos graxos); Proteínas (aminoácidos)
1202 – 1275	Fosfatos inorgânicos; Grupo fosfato de fosfolipídios; Grupos fosfodiéster de ácidos nucleicos; Proteína fosforilada; Proteínas (colágeno)
1040 – 1124	Carboidratos (glicogênio); Carboidratos (glicose, frutose, glicogênio, etc), proteínas glicosiladas (α-amilase, mucinas) e moléculas de açúcar; Ácidos nucleicos (esqueleto açúcar-fosfato: RNA e DNA); Carboidratos; Fosfatos inorgânicos, fosfolipídios (lipídios de membrana) e grupos fosfodiéster de ácidos nucleicos (esqueleto açúcar-fosfato); Proteína (glicoproteína); Ácidos nucleicos (RNA); Fosfolipídios (lipídios de membrana)

Fonte: Pinto *et al.*, 2021.

Discussão

Os resultados deste estudo permitiram identificar expressivas diferenças espectrais em componentes presentes nas amostras de saliva coletadas de duas irmãs, uma com diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista (TEA) e a outra neurotípica, pela espectroscopia por FT-IR, adicionando um grande potencial diagnóstico a essa ferramenta para o diagnóstico do TEA. No contexto clínico atual, o diagnóstico do TEA ainda está ancorado em avaliação clínica, com base em entrevistas, observações e questionários. Esse processo pode se tornar desafiador, sobretudo quando o paciente é muito jovem ou apresenta sinais menos característicos da condição autista (Cortese *et al.*, 2025). Embora desafiador, o diagnóstico precoce e preciso do TEA é essencial para identificar necessidades individuais e orientar intervenções personalizadas, que são comprometidas pela ausência de marcadores específicos que atendam aos critérios diagnósticos da condição (Cortese *et al.*, 2025).

Pesquisas recentes têm explorado diversos métodos diagnósticos, incluindo análises de fluidos corporais como saliva (Evenepoel *et al.*, 2024; Silva Neto *et al.*, 2020; Pinto-Jr *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2022; Hicks *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020). Souza *et al.* (2022) relataram alterações no fluxo salivar, relacionadas ao gênero, que podem influenciar na concentração proteica desse biofluido na cavidade oral de indivíduos com TEA, possibilitando sua identificação.

More *et al.* (2023) analisaram amostras de saliva de 70 indivíduos de 21 famílias (16 adultos, 17 adolescentes, 18 crianças e 19 pré-escolares) por sequenciamento de exoma completo que compreende a filtragem por frequência alélica e a análise de segregação familiar. Paralelamente, aplicaram escalas validadas de traços autistas para quantificar características fenotípicas. Os autores sugeriram que a associação de diagnósticos formais com medidas quantitativas de traços autistas permite priorizar genes candidatos com maior precisão, abrindo caminho para estudos funcionais e aplicações clínicas mais direcionadas, enfatizando a relevância de integrar dados clínicos e genéticos na priorização de genes para futuras investigações.

He *et al.* (2023) analisaram, em amostras de saliva de meninos com TEA, as concentrações de hormônios como cortisol, dehidroepiandrosterona (DHEA) e pregnenolona, observando que apenas os níveis de DHEA e pregnenolona apresentaram elevações significativas nesses indivíduos. Siddique *et al.* (2020) investigaram os níveis de monômero de alfa-sinucleína e alfa-sinucleína oligômero na saliva de crianças com TEA e constataram que os níveis dessas substâncias eram mais baixos em comparação às crianças neurotípicas.

Salloum-Asfar *et al.* (2019) observaram que os microRNAs (miRNAs), como biomarcadores, demonstraram alterações em amostras de saliva em indivíduos com TEA. Por outro lado, Hicks *et al.* (2020) verificaram que os miRNAs salivares alterados em crianças com TEA estão associados a níveis

comportamentais específicos, outro desafio diagnóstico em portadores desse transtorno. Wu *et al.* (2020) destacaram os miRNAs como biomarcadores promissores, mas alertaram para variações nos resultados entre estudos distintos, validando a importância do presente estudo.

Recentemente evidências importantes foram observadas nos gêneros bacterianos *Stomatobaculum*, *Ruminococcaceae* e *Tannerella*, que apresentaram abundância significativa na cavidade bucal de crianças autistas em comparação às não autistas, sendo identificados como marcadores distintivos do microbioma oral dessas crianças. Além disso, essas três bactérias mostraram significativa associação a maiores dificuldades sociais, comportamentos repetitivos e restritivos, além de comportamentos ansiosos (Evenepoel *et al.*, 2024).

Qiao *et al.* (2018), investigaram a microbiota salivar e dentária de pacientes com TEA, identificando táxons microbianos orais distintos e diferenças na microbiota em comparação a indivíduos neurotípicos, enquanto Kong *et al.* (2019) avaliaram a microbiota oral e intestinal em indivíduos com TEA, encontrando diferenças significativas entre essas populações, sugerindo o uso de marcadores de microbioma para diagnóstico.

Distintas estratégias estão sendo investigadas buscando o diagnóstico precoce do TEA, como a identificação de biomarcadores, alterações genéticas e a aplicação de ferramentas para análise de biofluidos. O desenvolvimento de métodos diagnósticos objetivos e específicos é fundamental para permitir a detecção rápida e precisa, viabilizando tratamentos precoces e eficazes, promovendo melhor qualidade de vida a essa população. Os promissores resultados obtidos neste estudo de caso, incentivam o avanço nessa linha de pesquisa com o intuito de aperfeiçoar essa abordagem e superar os desafios relacionados à identificação do TEA.

Diante disso, recomenda-se a ampliação do número de amostras e a integração com outras técnicas analíticas, como proteômica e metabolômica, a fim de validar os padrões observados e explorar seu potencial como biomarcadores diagnósticos ou prognósticos. Além disso, investigações futuras podem considerar correlações entre os perfis moleculares e aspectos clínicos, comportamentais ou genéticos dos indivíduos, contribuindo para uma abordagem mais personalizada e eficaz no cuidado ao TEA.

Conclusão

A análise espectroscópica das amostras de saliva revelou diferenças significativas na composição molecular entre irmãs, uma com Transtorno do Espectro Autista (TEA) e outra neurotípica. A diminuição das ligações associadas a proteínas, especialmente na faixa espectral de 1600 a 1650 cm^{-1} , sugere menor concentração dessas biomoléculas na saliva de portadores de TEA. Por outro lado, o aumento de intensidade na região entre 1000 e 1150 cm^{-1} indica maior presença de carboidratos, proteínas glicosiladas, ácidos nucleicos e estruturas fosfatadas, evidenciando a alteração no perfil bioquímico da amostra. Os achados reforçam a hipótese de que o TEA pode estar associado a modificações sistêmicas que se refletem na composição salivar, possivelmente relacionadas a processos imunológicos, metabólicos e/ou de neurodesenvolvimento. A saliva, por ser um fluido biológico de fácil coleta e rica em marcadores moleculares, mostra-se uma ferramenta promissora para estudos não invasivos voltados à compreensão das bases biológicas do TEA.

Referências

CORTESE, Samuele *et al.* Latest clinical frontiers related to autism diagnostic strategies. **Cell Reports Medicine**, v. 6, n. 2, 2025.

DSM, V. *et al.* Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5. 2014.

EVENEPOEL, Margaux *et al.* Oral microbiota in autistic children: Diagnosis-related differences and associations with clinical characteristics. **Brain, Behavior, & Immunity-Health**, v. 38, p. 100801, 2024.

HE, Qing *et al.* Analysis of salivary steroid hormones in boys with autism spectrum disorder. **BMC psychiatry**, v. 23, n. 1, p. 1-7, 2023.

A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO**

HICKS, Steven D. *et al.* Saliva microRNA differentiates children with autism from peers with typical and atypical development. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 59, n. 2, p. 296-308, 2020.

KONG, Xuejun *et al.* New and preliminary evidence on altered oral and gut microbiota in individuals with autism spectrum disorder (ASD): implications for ASD diagnosis and subtyping based on microbial biomarkers. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2128, 2019.

MORE, Ravi Prabhakar *et al.* Identifying rare genetic variants in 21 highly multiplex autism families: the role of diagnosis and autistic traits. **Molecular Psychiatry**, v. 28, n. 5, p. 2148-2157, 2023.

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

QIAO, Yanan *et al.* **Alterations of oral microbiota distinguish children with autism spectrum disorders from healthy controls.** **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1597, 2018.

SALLOUM-ASFAR, Salam; SATHEESH, Noothan J.; ABDULLA, Sara A. Circulating miRNAs, small but promising biomarkers for autism spectrum disorder. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 12, p. 253, 2019.

SIDDIQUE, Abubakkar *et al.* Estimation of alpha-synuclein monomer and oligomer levels in the saliva of the children with autism spectrum disorder: a possibility for an early diagnosis. **Cureus**, v. 12, n. 8, 2020.

SOUZA, Matheus Morcela de *et al.* Salivary flow and salivary proteins in male and female children with autism spectrum disorder: pilot study. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 51, 2022.

WU, Xingwang; LI, Wanran; ZHENG, Yun. Recent progress on relevant microRNAs in autism spectrum disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5904, 2020.

Agradecimentos

Nossos profundos agradecimentos à mãe de ambas as participantes, à participante neurotípica pelo pronto aceite na participação e auxílio na coleta das amostras, e à participante autista, pelo consentimento, possibilitando a realização deste estudo de caso.