



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DÉBORAH DANIELLE TERTULIANO MARINHO E ALBUQUERQUE

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA CONTENDO ALIZARINA COMO TESTE
RÁPIDO NO AUXÍLIO AO DIAGNÓSTICO DE NEUROPATHIA DIABÉTICA**

**ARACAJU
2021**

DÉBORAH DANIELLE TERTULIANO MARINHO E ALBUQUERQUE

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA CONTENDO ALIZARINA COMO TESTE
RÁPIDO NO AUXÍLIO AO DIAGNÓSTICO DE NEUROPATHIA DIABÉTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

Coorientador: Dr. Eduardo Luis de Aquino Neves

**ARACAJU
2021**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

A345d	<p>Albuquerque, Déborah Danielle Tertuliano Marinho Desenvolvimento de membrana contendo alizarina como teste rápido no auxílio ao diagnóstico de neuropatia diabética / Déborah Danielle Tertuliano Marinho e Albuquerque ; orientador Adriano Antunes de Souza Araújo ; coorientador Eduardo Luis de Aquino Neves. – Aracaju, 2021. 103 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.</p> <p>1. Ciências da saúde. 2. Neuropatia de Fibras Finas. 3. Diagnóstico. 4. Ensaio Clínico. 5. Revisão Sistemática. I. Araújo, Adriano Antunes de Souza, orient. II. coorientador Neves, Eduardo Luis de Aquino, coorient. III. Título.</p> <p>CDU 616.8</p>
-------	--

DÉBORAH DANIELLE TERTULIANO MARINHO E ALBUQUERQUE

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA CONTENDO ALIZARINA COMO TESTE
RÁPIDO NO AUXÍLIO AO DIAGNÓSTICO DE NEUROPATHIA DIABÉTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 25 / 02 / 2021

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

1º Examinador: Profª Dra. Karina Conceição Gomes Machado de Araújo

2º Examinador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

3º Examinador: Prof. Dra. Mairim Russo Serafim

4º Examinador: Profª Dra. Luciana Garcez Barreto Teixeira

Dedico esse trabalho aos meus pais, Inácio e Joselice, que com amor me ensinaram o caminho do crescimento através do conhecimento.

“Por quanto, melhor é a sabedoria do que as mais finas jóias, e de tudo o que se possa ambicionar, absolutamente nada se compara a ela!” Provérbios 8:11

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, que em sua infinita sabedoria foi um importante guia na minha trajetória, me sustentando em cada etapa desse trabalho.

Agradeço imensamente aos meus pais, Inácio e Joselice, pelo apoio nos momentos difíceis e por proporcionarem a mim e aos meus irmãos a oportunidade de obter conhecimento e a partir dele crescer profissionalmente. Agora o coração da minha mãe se acalma, assim espero!

A meu esposo Tales Iuri, pelo companheirismo e compreensão. A nossa parceria fez toda a diferença, meu amor!

Aos meus gêmeos Levi e Lívia, por me tornarem uma pessoa melhor e mais humana. Vocês me trouxeram amor, resiliência, força e leveza nessa fase de grandes desafios.

Aos meus irmãos Priscilla e Paulo, que estiveram sempre presentes na minha vida de forma amorosa e amiga. Obrigada por me darem a alegria de ser tia nesse período, Mateus e Benício são muito amados.

Aos meus familiares, por entenderem a ausência, em especial as minhas tias-mães Maria do Socorro e Josenice e aos meus primos-irmãos Tales, Túlio e Kívia, pelas palavras de afeto, que encheram meu coração de esperança.

À Sueli, por cuidar da minha casa e dos meus anjinhos na minha ausência.

À Antônia, minha vizinha, por permitir que eu ocupasse um de seus quartos para poder escrever a tese.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Antunes, que me deu a oportunidade de ingressar no doutorado e desenvolver um trabalho que contribuirá para a melhoria da vida de muitas pessoas.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Eduardo Luís, pela paciência e dedicação durante toda essa trajetória e por permitir, de uma forma muito generosa, que realizássemos a pesquisa em seu consultório.

Obrigada aos professores Adriano Antunes e Eduardo Aquino pela compreensão e apoio nos momentos mais difíceis da minha vida.

À Prof. Dra. Paula Nunes, por abrir as portas do seu laboratório para executarmos o teste piloto da pesquisa. Além disso, foi uma das pessoas que mais me deu força nesse período, gratidão por tudo.

À Prof. Dra Tatiana Rodrigues, pelo suporte com as análises estatísticas.

À Banca Examinadora, por aceitarem contribuir com a nossa pesquisa.

Aos membros do L.E.F.T - Laboratório de Ensaios Farmacêuticos e Toxicidade/ UFS, por me darem o suporte necessário para a confecção e análises das membranas. Em especial a Bruno e Fernanda, pessoas extremamente competentes e fundamentais para a conclusão da pesquisa.

À Universidade Federal de Sergipe (UFS), por abrir vagas institucionais e conceder o afastamento necessário para o desenvolvimento dessa pesquisa. Em especial ao Departamento de Enfermagem/UFS, campus Lagarto, lugar de pessoas amigas, competentes, humanas, criativas e justas.

Às instituições de fomento FINEP, CNPq, CAPES e FAPITEC/SE, por proporcionar a estrutura e os equipamentos necessários para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos meus amigos e irmãos na fé, pelas orações e apoio espiritual nos momentos de dificuldade.

Aos familiares que perdi e ganhei nesse período, não foi fácil viver isso à distância, mas com fé em Deus um dia estaremos todos juntos.

RESUMO

As neuropatias de fibras finas (NFF) se constituem em um grupo heterogêneo de doenças que afetam fibras Aδ finamente mielinizadas e fibras C amielínicas. Sua avaliação requer testes auxiliares, além das técnicas neurofisiológicas convencionais e os que possuem maior especificidade e sensibilidade são, geralmente, desconfortáveis e/ou invasivos. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver membranas poliméricas de alginato de sódio contendo vermelho de alizarina (VAS) e carbonato de sódio (CS) no auxílio diagnóstico de NFF em indivíduos diabéticos. A primeira etapa foi um estudo laboratorial, com produção e caracterização das membranas de VAS e CS. A segunda etapa foi um ensaio clínico, duplo cego, não randomizado, com três grupos: diabéticos sem neuropatia, diabéticos com neuropatia e não diabéticos sem neuropatia. Os indivíduos foram submetidos à aplicação da membrana, DN4 (Diagnostic de Douleur Neuropathique), eletroneurografia, avaliação do período silent e da variação do intervalo RR. A mediana dos valores dos três grupos foi gerada pelo teste múltiplo de Dunn's. Como resultado, as análises por Análises por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) demonstraram a interação do VAS e CS com o alginato de sódio, possibilitando a formação das membranas poliméricas. O ensaio de intumescimento evidenciou a capacidade das membranas em reagir com o suor, possibilitando a reação colorimétrica. A avaliação da irritabilidade pelo ensaio de HET-CAM (Membrana cório-alantóide) demonstrou que as membranas não têm potencial de irritação da pele. Análises por Análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) exibiram mudanças nas bandas de absorção das membranas após a reação colorimétrica. O ensaio clínico demonstrou reação colorimétrica menor no grupo de diabéticos com neuropatia (27,44%), indicando redução da sudorese. A reação colorimétrica demonstrou boa correlação com outros testes que avaliam NFF. Foi detectada uma moderada correlação positiva entre Imagem J e VIRR (0,475 e $p < 0,00014$). O Imagem J se correlacionou moderadamente com a latência inicial do PSC, porém, desta vez, de forma inversa (-0,581 e $p < 0,0008$). O Imagem J ainda demonstrou uma moderada correlação negativa com DN4, o que significa que quanto maior a pontuação do DN4, menor sudorese (-0,489 e $p < 0,00007$). A faixa de reação colorimétrica de 0 - 40%, quantificada pelo Imagem J sugere que os indivíduos apresentam possibilidade de exibirem neuropatias periféricas. A partir da curva ROC foi possível demonstrar que o teste desenvolvido possui alta sensibilidade (89%) e alta especificidade (95%) para o diagnóstico de neuropatia diabética. As maiores áreas abaixo da curva ROC dos testes entre os grupos de Diabéticos com Neuropatia e Indivíduos saudáveis foram do DN4 (0.964 e $p < 0.0001$), Image J (0.939 e $p < 0.0001$) e PSC inicial (0.903 e $p < 0.0001$). Diante dos resultados, pode-se inferir que foi possível obter um produto biodegradável, de baixo custo, de fácil aplicação e eficaz para auxiliar no diagnóstico rápido de neuropatias periféricas, sem apresentar desconforto aos pacientes, diferenciando-se dos demais testes existentes. Além disso, sua utilização trará um benefício direto para a população, por diagnosticar precocemente complicações de uma das principais doenças crônicas no país, impactando positivamente a saúde pública.

Descriptores: Neuropatia de Fibras Finas. Diagnóstico. Teste de Suor. Ensaio Clínico. Revisão Sistemática.

ABSTRACT

The small fiber neuropathy (SFN) integrates a heterogeneous group of diseases that affect A δ finely myelinated fibers and C unmyelinated fibers. Its evaluation requires the use of auxiliary tests in addition to the conventional neurophysiologic techniques in which those with higher specificity, and sensibility, are mostly uncomfortable and invasive. Therefore, the objective of this work was to develop and evaluate the effect of sodium alginate polymeric membranes containing Alizarin Red (AR) and Sodium Carbonate (SC) on assisting the diagnosis of SFN in patients with diabetes. The first stage was a laboratory study for the production and characterization of the VAS and SC membranes. The second stage was the blind, non-randomized clinical trial, with three groups: people with diabetes and without neuropathy, people with diabetes and neuropathy, and people without diabetes neither neuropathy. The participants underwent the application of the membranes, DN4 (Diagnostic de Douleur Neuropathique), electroneuromyography, evaluation of silent period, and the RR interval. The median of the values of the three groups was generated by Dunn's Test for multiple comparisons. As a result, the analysis by Differential Scanning Calorimetry Analysis (DSC) demonstrated an interaction of AR and SC with sodium alginate, enabling the formation of polymeric membranes. The swelling test showed the capacity of the membranes to react with sweat, enabling the colorimetric reaction. The evaluation of irritability by the HET-CAM (chorioallantoic membrane) assay demonstrated that the membranes have no potential for skin irritation. The Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis showed changes in the absorption bands of the membranes after the colorimetric reaction. The clinical trial demonstrated a minor color change in the group of diabetic patients with neuropathy (27.44%), indicating sweating reduction. The colorimetric reaction showed a good correlation with other tests that evaluate NFF. A moderate positive correlation was detected between Image J and VIRR (0.475 and $p < 0.00014$). The image J correlated moderately with the initial latency of the PSC, but this was done inversely (-0.581 and $p < 0.0008$). Image J also revealed a moderate negative correlation with DN4, which means that the higher the DN4 score, the less sweating (-0.489 and $p < 0.00007$). The colorimetric reaction range of 0 - 40%, quantified by Image J, suggests that the individuals may present peripheral neuropathy. From the ROC curve, it was possible to demonstrate that the test developed has high sensitivity (89%) and high specificity (95%), for the diagnosis of diabetic neuropathy. The largest of the areas below the ROC curve in the tests between the groups of Diabetics with Neuropathy and Healthy individuals were DN4 (0.964 and $p < 0.0001$), Image J (0.939 and $p < 0.0001$), and initial PSC (0.903 and $p < 0.0001$). Therefore, this work was able to generate a biodegradable, low-cost, easy to apply, and efficacious product to assist in the rapid diagnosis of peripheral neuropathies without presenting discomfort to patients, differentiating it from the other existing tests. Besides, its use will bring a direct benefit to the population, as it diagnoses early complications of one of the main chronic diseases in the country, positively impacting public health.

Descriptors: Small Fiber Neuropathy. Diagnosis. Sweat Test. Clinical Trial. Systematic review.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Processo de registro fotográfico das membranas	42
Figura 2 Memb/VAS (a) (área = 4 cm ²). e Memb/CS (b) (área = 5 cm ²) obtidas após a secagem e corte	46
Figura 3 Reação colorimétrica das Memb/CS e Memb/VAS após a reação com suor. Reação 1: hidrólise básica do Na ₂ CO ₃ provocada pela reação com o suor. Reação 2: desprotonação do VAS ocasionando a mudança de cor das Memb/VAS de amarelo-alaranjado para roxo escuro	48
Figura 4 Curvas de DSC do VAS, CS, membrana de alginato, Memb/VAS e Memb/CS	50
Figura 5 Perfil de intumescimento das membranas em água e suor artificial. Os resultados foram expressos de acordo com a média ± desvio padrão (n = 3) das análises	52
Figura 6 Ensaio de HET-CAM das membranas. (a) NaOH 1N, (b) solução salina, (c) Memb/CS e (d) Memb/VAS	54
Figura 7 Espectros de FTIR-ATR das Memb/VAS, membranas que não apresentaram e membranas que apresentaram reação colorimétrica	56
Figura 8 Representação das membranas que apresentaram reação colorimétrica após aplicação (a) e as que não apresentaram reação colorimétrica após aplicação (b)	57
Figura 9 Demonstração da reação colorimétrica pelo software Imagem J, a Figura A representa a mediana dos valores dos grupos de diabéticos, comparados com os grupos saudáveis pela dispersão dos dados por gráfico de violino. As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. A Figura B representa a mediana dos valores dos três grupos por gráfico de violino. As diferenças estatísticas foram calculadas pelo teste múltiplo de Dunn's. A figura C representa a variação dessas médias pela escala de cor pelo gráfico Heatmap nos três grupos estudados	63
Figura 10 Curva ROC realizada com os dados do Imagem J demonstrando a sensibilidade e especificidade do teste a partir da comparação entre os grupos de Diabéticos com neuropatia e saudáveis (A), Diabéticos e Saudáveis (B) e Diabéticos com e sem neuropatia	64

Figura 11 Mapa de Correlação de Spearman-r entre os testes de variáveis numéricas utilizados nos três grupos (Controle, Diabéticos e Diabéticos com neuropatia).....65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Valores da correlação entre os testes de variáveis numéricas utilizados nos três grupos (Controle, Diabéticos e Diabéticos com neuropatia). Correlação de Spearman (* < 0.05 ** < 0.01 *** < 0.001)66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valor de pH das Memb/VAS, Memb/CS e das membranas após a reação colorimétrica.....	49
Tabela 2 Resultados dos testes realizados durante o ensaio clínico nos três grupos estudados.	59
Tabela 3 Demonstração das áreas abaixo da curva ROC dos testes entre os grupos de Diabéticos com Neuropatia e Indivíduos Saudáveis.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFTs	Testes de função autonômica cardiovascular
ALN	Neuropatia Periférica Relacionada ao Álcool
ATR	Reflexão Total Atenuada
CAM	Membrana Cório-Alantóide
CAN	Neuropatia Autonômica Cardiovascular
CCM	Microscopia Confocal de Córnea
CDT	Determinação de limiares de detecção de frio
CHEPs	Potenciadores evocados pelo calor de contato
CHEPs	Potenciais evocados pelo calor de contato
CNBD	Densidade do ramo do nervo corneano
CNFD	Densidade de fibra nervosa da córnea
CNFL	Comprimento da fibra nervosa córnea
CNFT	Tortuosidade da fibra nervosa da córnea
CPT	Teste do limiar de percepção
CS	Carbonato de Sódio
DM	Diabetes mellitus
DN4	Douleur Neuropathique 4 Questions
DPN	Neuropatia diabética periférica
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DST24	Teste do Suor Direto
ENFD	Densidade das fibras nervosas epidérmicas finais
ENG	Eletroneurografia
ENM	Eletroneuromiografia
ENMG	Eletroneuromiografia
ESC	Condutância Eletroquímica da Pele
FAP	Polineuropatia amilodótica familiar
FTIR	Região do infravermelho com transformada de Fourier
HRV	Teste da variabilidade da frequência cardíaca
IENFD	Densidade de fibra nervosa intraepidérmica
IES	Estimulação elétrica intraepidérmica
IGT	Tolerância diminuída à glicose

LDF	Doppler fluxometria a laser
LDIFLARE	Laser Doppler imager flare technique
LEP	Potencial evocado por laser
LEPs	Potenciais evocados do Bothlaser
MDL	Comprimento médio de dendritos
MNSI	Michigan Neuropathy Screening Instrument
NCS	Estudos de condução nervosa
NFD	Fibra nervosa da córnea
NFF	Neuropatias de fibras finas
PP	Picada de agulha
PREPs	Potenciais evocados relacionados à dor
PSC	Período de Silêncio Cutâneo
PSD	Polineuropatia Sensiomotora Diabética
QAFT	Teste de função autonômica quantitativa
QDIRT23	Reflexo Axional Quantitativo Direto e Indireto
QSART	Teste quantitativo do reflexo axional sudomotor
QST	Teste Sensitivo-quantitativo
SFSG	Ganglionopatia sensorial por pequenas fibras
SGNFD	Densidade da fibra nervosa autonômica da glândula sudorípara
SSR	Resposta simpática da pele
TST	Teste de Termorregulação do Suor
TST	Teste termorregulador do suor
TTR	Transtirretina
TTT	Teste de limiar de temperatura
VAS	Vermelho de Alizarina S
WDT	Determinação de limiares de detecção de calor
WISW	Teste de enrugamento

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
1. INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO II	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Neuropatias Periféricas	19
2.2 Polineuropatia Sensiomotora Diabética (DSPN)	20
2.3 Exames diagnósticos para neuropatias periféricas	22
2.4 Exames diagnósticos para neuropatias periféricas de fibras finas	25
2.5 Vermelho de Alizarina S (VAS)	33
3. OBJETIVOS	35
3.1 Geral	35
3.2 Específicos	35
CAPÍTULO III	36
4.1 Introdução	37
4.2 Material e métodos	38
4.2.1 Preparo das membranas de vermelho de alizarina S e carbonato de sódio	38
4.2.2 Reação das Memb/CS e Memb/VAS com suor	38
4.2.3 Determinação do pH das membranas	39
4.2.4 Análises por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	39
4.2.5 Avaliação do intumescimento das membranas	39
4.2.6 Avaliação da irritabilidade das membranas em modelo <i>HET-CAM</i>	40
4.2.7 Análise das membranas por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	41
4.2.8 Estudo piloto	41
4.2.9 Metodologia da aplicação das membranas em ensaio clínico	41
4.2.10 Protocolo do ensaio clínico	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Obtenção das membranas	46
5.2 Reação química das membranas com o suor e avaliação do pH	47
5.3 Análises das membranas por DSC	49
5.4 Capacidade intumescimento das membranas	50
5.5 Ensaio de <i>HET-CAM</i>	53
5.6 Análises das membranas por FTIR-ATR	54
5.7 Estudo Piloto	56

5.8 Ensaio clínico e análise da quantificação da reação colorimétrica (mudança de cor) das membranas após aplicação nos indivíduos	57
5.9 Conclusão	69
CAPÍTULO IV	71
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS	74
ANEXO A - Douleur neuropathique 4 questions (DN4)	84
ANEXO B - Parecer Consustanciado do CEP	85
ANEXO C – Pedido Nacional de Registro de Patente	88
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	96
APÊNDICE B - Termo de AnuênciA	97

CAPÍTULO I

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Neuropatia diabética compreende as várias formas de comprometimento de fibras nervosas periféricas, causando sintomas sensitivos, motores e autonômicos. A forma mais comum da neuropatia diabética é a polineuropatia sensitiva e motora comprimento dependente. Nesta forma ocorre degeneração progressiva das fibras nervosas de grande calibre, das fibras grossas, e das fibras de pequeno calibre, as fibras finas. A maioria dos testes para neuropatias periféricas diagnosticam alterações em fibras grossas sem maiores dificuldades. No entanto, o grande desafio é o diagnóstico das neuropatias de fibras finas, pois essas fibras são inacessíveis aos estudos de condução nervosa convencional (SIEPMANN, PENZLIN, ILLIGENS, REICHMANN, 2017).

As neuropatias de fibras finas (NFF) se constituem em um grupo heterogêneo de doenças que afetam as fibras A δ , finamente mielinizadas, e fibras C, amielínicas. No sistema nervoso somatossensorial, essas fibras transmitem informações sobre temperatura, dor e coceira, e no sistema nervoso autônomo, elas medeiam as funções sudomotora, termorregulatória, cardiovascular, gastrointestinal e uro-genital. Embora existam várias causas para a NFF, o diabetes melitus é a mais frequentemente encontrada. Dados da International Diabetes Federation (IDF), de 2019, mostram o crescimento alarmante na prevalência de diabetes. Os dados da 9^a edição do Atlas de Diabetes da IDF mostram que existem 463 milhões de adultos com diabetes em todo o mundo. As principais manifestações da NFF, notadamente em diabéticos, são queimação nos pés e alteração da sensibilidade térmica e dolorosa.

O diagnóstico de NFF é um desafio para médicos e indivíduos com diabetes melitus. Embora seja uma condição clínica frequente, a confirmação diagnóstica depende de testes complexos, caros e que necessitam de instrumentos sofisticados e invariavelmente indisponíveis. Os testes de diagnóstico para identificar NFF incluem biópsia de pele, testes sensoriais quantitativos e autonômicos. Testes adicionais, como os que medem pequenos potenciais evocados relacionados a fibras e microscopia confocal da córnea, podem contribuir para um melhor entendimento dessas neuropatias (TERKELSEN *et al.*, 2017; SLOAN *et al.*, 2018).

A função sudomotora é controlada pelo sistema termorregulatório e tem finalidade homeostática. Nesse sistema, a transpiração funciona como forma de regulação da temperatura corporal, sendo mediada por glândulas sudoríparas. Essas

glândulas estão conectadas ao sistema nervoso pelas fibras finas, conhecidas como sudomotoras. O comprometimento dessas fibras resulta na diminuição da produção do suor e, consequentemente, em distúrbios de termoregulação (ILLIGENS, 2008; FLORES, *et al.*, 2015).

A avaliação da resposta sudomotora funciona como um parâmetro capaz de identificar a distribuição e a severidade do comprometimento das fibras finas, auxiliando o diagnóstico de neuropatias periféricas (SHIVAPRASAD *et al.*, 2018). Os testes que avaliam a função sudomotora, como o Teste Termorregulador do Suor e o Sudoscan, são sensíveis e adequados para detecção de neuropatias periféricas de fibras finas autonômicas, contudo, apesar da grande utilidade clínica, os testes não são realizados com frequência, exceto em centros especializados, pois tratam-se de testes de alto custo, que exigem mais tempo, requerem um grande espaço clínico, instrumentos específicos, além de uma preparação prévia e incômoda ao paciente. (DEVIGILI *et al.*, 2008; LAHRMANN *et al.*, 2011; LAURIA, *et al.*, 2017). A biópsia cutânea tornou-se o “padrão ouro” utilizado para o diagnóstico de neuropatia em fibras finas (LAURIA, *et al.*, 2014), contudo é um teste invasivo e desconfortável.

Diante do exposto, pode-se entender que os testes existentes para diagnosticar neuropatias periféricas de fibras finas possuem algumas limitações e oferecem certo grau de desconforto aos pacientes. Vários dos testes usados para identificar SFN são demorados, requerem conhecimentos específicos e são limitados a configurações especializadas (TERKELSEN *et al.*, 2017). Nesse contexto, torna-se necessário o desenvolvimento de uma alternativa tecnológica que propõe analisar uma nova forma diagnóstica eficaz e com mais conforto aos pacientes.

O vermelho de alizarina S (VAS) é utilizado como indicador colorimétrico em testes diagnósticos que avaliam a função sudomotora para determinar neuropatias periféricas, como por exemplo no Teste de Termorregulação do Suor (TST). Em contato com o suor, o VAS sofre uma mudança de Ph, alterando sua cor amarelo alaranjada para roxo. Porém, o TST apresenta algumas limitações, como tempo prolongado, alto custo, ambiente, equipamento e operador especializados, que dificultam a realização e acompanhamento constante em pacientes com suspeita de NFF (LOW, 2004; LAHRMANN, 2011).

Um teste diagnóstico rápido, que tivesse em sua composição o VAS, poderia reduzir as limitações e facilitar o acesso ao diagnósticos de NFF, foi a partir dessa hipótese que esse estudo se desenvolveu. Nessa perspectiva, a pesquisa teve como

objetivo desenvolver e avaliar o efeito de membranas poliméricas de alginato de sódio contendo VAS e CS no auxílio ao diagnóstico de NFF em pacientes diabéticos. Trata-se de uma proposta inovadora e promissora na área das ciências da saúde, contribuindo para o desenvolvimento de um biomaterial compatível, biodegradável, de baixo custo e eficaz para auxiliar o diagnóstico rápido de neuropatias periféricas de fibras finas.

CAPÍTULO II

Revisão da Literatura e Objetivos

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Neuropatias Periféricas

Neuropatia periférica é um termo genérico que se aplica à existência de lesão dos nervos periféricos, qualquer que seja a sua etiologia. A disfunção do nervo periférico é uma situação relativamente frequente, com expressão clínica limitada, mas com causas etiológicas que podem ser muito variadas (GUIMARÃES; SILVEIRA, 2008). Como são inúmeras as causas de neuropatias, a avaliação e o diagnóstico tornam-se difíceis (TERKELSEN *et al.*, 2017).

Essas neuropatias podem manifestar-se sem grandes comprometimentos das atividades de vida diária dos indivíduos, mas, na maioria das vezes, são extremamente debilitantes, não apenas pelos déficits motores, mas, também, pelas alterações sensitivas e autonômicas, a depender do tipo de fibra envolvida. Nesse caso, é imprescindível identificar se a doença é do axônio, da mielina ou do neurônio. (FÉLIX; OLIVEIRA, 2010; GONDIM, *et al.*, 2014).

As neuropatias periféricas podem ser classificadas em três grandes grupos, as mononeuropatias que comprometem apenas um tronco nervoso; as mononeuropatias múltiplas com comprometimento sucessivo de vários troncos nervosos e as polineuropatias distais com comprometimento difuso e simétrico dos quatro membros (STOJKOVIC, 2006).

As principais manifestações da neuropatia de fibras finas são queimação nos pés e alteração da sensibilidade térmica e dolorosa. A sensibilidade epicrítica e proprioceptiva é normal, assim como os reflexos osteomusculares (STOJKOVIC, 2006). As manifestações motoras frequentes são espasmos musculares, clônus, fasciculações, amiotrofias e perda de destreza e de força muscular. As manifestações sensitivas negativas são hipoalgesia e hipoestesia; as positivas são parestesia, disestesia, hiperpatia, hiperalgesia e alodinia, além das sensações de picada, formigamento ou zumbido (KRAUCHETE; SAKATA, 2011).

A neuropatia de pequenas fibras é uma condição comum que envolve fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas e apresenta dor incapacitante e/ou parestesia nos pés com perda preferencial de sensibilidade ao toque e preservação relativa da vibração ao exame (SLOAN, 2018). Os estudos de condução nervosa de rotina são geralmente normais no comprometimento das fibras finas e os pacientes

normalmente são identificados clinicamente através da apresentação de sintomas e sinais sensoriais positivos e negativos. Geralmente, esses pacientes apresentam dor, sensações anormais de calor ou frio, hipersensibilidade ao calor ou ao frio, alodinia ou parestesias (BLACKMORE; SIDDIQI, 2017).

A forma mais comum de acometimento das neuropatias é a de predomínio distal, ascendente (distal para proximal) simétrica. Estão, frequentemente, relacionadas a doenças metabólicas, como o diabetes mellitus e a insuficiência renal crônica; tóxicas; carenciais (vitaminas do complexo B, ácido fólico, etc.) e a maioria das neuropatias hereditárias, como já foi citado anteriormente, a neuropatia hereditária sensitivo-motora tipo 1A – Charcot-Marie-Tooth 1^a (FÉLIX; OLIVEIRA, 2010; PAASSEN *et al.*, 2014).

A literatura chama a atenção também para a polineuropatia sensiomotora diabética (DSPN), que afeta aproximadamente 10% dos pacientes com diabetes tipo 2 recentemente diagnosticado e 40% dos pacientes com diabetes em geral (CABEZAS-CERRATO, 1998). O risco aumenta com a duração do diabetes, a falta de controle glicêmico e a presença de complicações cardiovasculares (TESFAYE *et al.*, 2005). Pacientes com diabetes comumente sofrem de polineuropatia diabética, geralmente afetando fibras nervosas grandes e pequenas, ou polineuropatia de fibras pequenas exclusivamente, ambas frequentemente causando dor neuropática (TRUINI, *et al.*, 2018). O tratamento baseia-se na restauração do controle glicêmico rígido, o que atrasa a progressão do DSPN e o manejo de sintomas dolorosos (BOULTON *et al.*, 2005). Ainda existe inconsistência significativa quanto à definição de DSPN devido à falta de critérios diagnósticos aceitos por unanimidade e à utilização de múltiplas modalidades diagnósticas (DYCK *et al.*, 2011; SLOAN, *et al.*, 2018).

2.2 Polineuropatia Sensiomotora Diabética (PSD)

A neuropatia periférica diabética (DPN) é a complicação mais comum e problemática do diabetes mellitus, associada a morbidade e mortalidade significativa (VINIK *et al.*, 2006, CALLAGHAN *et al.*, 2012). A forma mais frequentemente observada de DPN é a polineuropatia simétrica distal (PSD), que mostra um padrão dependente do comprimento do nervo e frequentemente se manifesta como uma neuropatia dolorosa debilitante (SHIVAPRASAD, *et al.*, 2018).

A prevalência de diabetes mellitus está aumentando significativamente em todo o mundo, tendo como principal complicação a Neuropatia Sensóriomotora Distal (PSD), que é um comprometimento microvascular comum e detectável nesses casos. Devido à sua aparência clínica diversa e sintomas atípicos, a PSD é frequentemente diagnosticada em um estágio avançado (SZTANEK, *et al.*, 2020). Danos às fibras nervosas sensoriais grossas e finas são mais comuns em PSD, causando distúrbio tátil, de equilíbrio e da sensação de calor. Quando esse dano é detectado previamente e é aplicada a terapia e os cuidados preventivos, há uma redução significativa do risco de lesões e úlceras nos pés diabéticos (POP-BUSUI, *et al.*, 2017).

Para o PSD, as queixas típicas são formigamento simétrico ou dor em forma de agulha, na forma de meias ou dedos de luva, frequentemente afetando os membros superiores e inferiores. Os pacientes geralmente apresentam sintomas noturnos e de repouso agravados; a rigidez ou perda dos reflexos dos membros inferiores também podem ser evidentes (SZTANEK, *et al.*, 2020). A complicação mais temida do DPN se justifica quando o paciente não sente nenhum ferimento na perna, então úlceras profundas podem se desenvolver com pouca tendência a cicatrizar.

O pé diabético é, atualmente, a causa mais frequente de amputações não traumáticas da extremidade inferior e um dos principais motivos de hospitalização em pacientes com diabetes mellitus, pois consiste em danos aos nervos, vasos e estruturas ósseas. Esta é a razão pela qual é chamada de neuro-osteoartropatia, ou pé de Charcot, em sua forma terminal (SCHUBERT, BERLI, 2018). O diagnóstico precoce da DPN é essencial para identificar pacientes com alto risco de desenvolver ulceração nos pés e para implementar medidas preventivas eficazes. A disfunção das fibras nervosas pequenas, que ocorre no início do curso de DPN, costuma ser assintomática e difícil de diagnosticar com os testes tradicionais de condução e função nervosa. Portanto, identificar DPN pode ser difícil nos estágios iniciais da neuropatia (VINIK *et al.*, 2009; POP-BUSUI, *et al.*, 2017).

A disfunção sudomotora, que resulta do dano às fibras nervosas simpáticas amielínicas, não é eletrofisiologicamente detectável nos estágios iniciais da DPN (VINIK, NEVORET, CASELLINI, 2015), aumentando os riscos de complicações como anidrose, secura e fissuras, que resultam da perda das fibras das glândulas sudoríparas, estando associadas a um alto risco de ulceração das extremidades inferiores (TENTOLOURIS, MARINOU, KOKOTIS, KARANTI, 2009).

É necessário compreender se os correlatos clínicos da disfunção sudomotora são iguais ou independentes dos fatores que estão atualmente associados ao DPN, através de testes diagnósticos que avaliem a função sudomotora. Por meio desse conhecimento seria clinicamente valioso para a identificação de pacientes com risco de ulceração nos pés e para o planejamento de medidas preventivas (CASELLINI *et al.*, 2013). Os estudos indicam uma alta prevalência de disfunção autonômica periférica não diagnosticada em pacientes com DM, reiterando a necessidade do diagnóstico precoce de DPN para implementação de estratégias preventivas e reconhecimento de pacientes com alto risco de ulceração nos pés (CASELLINI *et al.*, 2013; SHIVAPRASAD, *et al.*, 2018).

As várias técnicas de teste de função sudomotora são variavelmente sensíveis e específicas para a detecção de neuropatia distal de fibras finas (VINIK, NEVORET, CASELLINI, 2015). No entanto, agora permanecem subutilizadas na prática clínica devido à falta de disponibilidade, inconsistência de resultados e demandas técnicas dos testes, sendo alguns tediosos, de difícil execução e demorados (CASELLINI *et al.*, 2013; LAURIA, *et al.*, 2017).

2.3 Exames diagnósticos para neuropatias periféricas

Para a realização do diagnóstico das Neuropatias Periféricas deve-se atentar inicialmente para a história clínica e o exame físico. O diagnóstico diferencial das neuropatias é importante e evita a solicitação de exames complementares desnecessários. Os antecedentes pessoais, os tratamentos prévios e atuais, e a história social também são importantes (KRAYCHETE; SAKATA, 2011).

O diagnóstico sindrômico, na maioria das vezes, não traz grande dificuldade. Já o diagnóstico etiológico assume um desafio em cerca de 20% a 30% dos casos, mesmo aos mais experientes especialistas (VALLAT; MAGY, 2005). Portanto, dentre as Neuropatias Periféricas conhecidas, a Síndrome da Neuropatia de Fibras Finas tem sido um enigma para os profissionais, devido ao contraste inexplicável entre dor nas extremidades e uma escassez de achados neurológicos e eletrofisiológicos que possam detectá-la com fidedignidade (HOITSMA, *et al.*, 2004; TERKELSEN *et al.*, 2017).

Embora múltiplas causas de degeneração das fibras nervosas pequenas tenham sido relatadas, incluindo através de mutações genéticas, a causa da

neuropatia das fibras pequenas permanece desconhecida em até 50% dos casos (TERKELSEN *et al.*, 2017). A apresentação clínica típica da neuropatia de pequenas fibras é a de uma polineuropatia simétrica dependente do comprimento associada a sintomas sensoriais ou autonômicos. Mais raramente, a apresentação clínica é caracterizada por sintomas não dependentes do comprimento, focais ou multifocais (ZENG, ALONGKRONRUSMEE, RIJN, 2017).

Pelo exame físico geral, algumas hipóteses diagnósticas podem ser sugeridas. É importante pesquisar deformações articulares e desvios de coluna, além de hipertrofias de raízes lombossacrais. As úlceras plantares são características de neuropatias carenciais, alcoólicas ou diabéticas; a presença de púrpuras ou necrose dos dedos sugere vasculite; e despigmentação, sarcoidose ou hanseníase (KRAYCHETE; SAKATA, 2011).

Para a avaliação da dor neuropática deve-se ter atenção para a localização, qualidade e intensidade da dor, com a identificação dos sintomas e sinais positivos e negativos. A dor neuropática pode ser espontânea ou provocada. A dor espontânea normalmente mostra-se como uma “queimação”, intermitente ou paroxística e inclui disestesias, já a dor provocada (hiperalgesia ou alodínia) ocorre após estímulo térmico, químico ou mecânico (KRAYCHETE, GOZZANI, KRAYCHETE, 2008). É necessário avaliar o sistema motor, sensitivo e autonômico, assim como a sensibilidade táctil, térmica (calor e frio) e vibratória deve ser pesquisada com instrumentos simples (KRAYCHETE; SAKATA, 2011).

Além disso, inúmeros instrumentos foram desenvolvidos para a avaliação da dor neuropática. Dentre eles estão aqueles que foram validados para dores neuropáticas em geral, como a *Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs Pain Scale* e sua versão autoaplicável (*self-administered LANNS*), o *Douleur Neuropathique 4 Questions (DN4)*, o *Neuropathic Pain Questionnaire* e sua versão mais curta (*NPQ-short form*), o *painDetect* e o *ID-Pain*. Esses são os mais utilizados internacionalmente por apresentarem um ponto de corte, o que os torna instrumentos mais objetivos. Os demais instrumentos são a *Neuropathic Pain Scale*, a *Pain Quality Assessment Scale* e o *Neuropathic Pain Symptom Inventory*. Os instrumentos traduzidos e validados para o português são a *Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs Pain Scale*, o *Douleur Neuropathique 4 Questions* e o *Neuropathic Pain Symptom Inventory*. (BENNETT *et al.*, 2007; ECKELI, TEIXEIRA, GOUVÊA, 2016).

Exames bioquímicos podem ser usados para rastrear neuropatia de fibras finas, incluindo condições que variam de fibras finas exclusivamente a neuropatias com envolvimento combinado de fibras pequenas e grandes. Os exames laboratoriais de triagem são aqueles recomendados para polineuropatia simétrica distal (ENGLAND, et al, 2009). Nos exames deve-se investigar dismetabolismo de glicose; função renal, tireoidiana e hepática; deficiência de vitaminas; doença hematológica e outras causas (taxa de sedimentação de eritrócitos, hemograma completo, IgM, IgA, IgG); triagem bioquímica na neuropatia definitiva de fibras finas (desenvolvimento agudo ou subagudo de disfunção autonômica, doença autoimune ou do tecido conjuntivo, Síndrome de Sjogren); infecções; doenças do intestino; porfiria; neurotoxinas e causas hereditárias (MYGLAND, 2007; TERKELSEN *et al.*, 2017).

Dentre os diagnósticos utilizados para a detecção das Neuropatias Periféricas em geral, podem ser destacados o exame à beira leito com anamnese e exame físico específicos, exames laboratoriais; Teste Sensitivo-quantitativo (QST); Eletroneuromiografia (ENMG); Exames do Sistema Nervoso Autonômico ou Testes de Reflexo Cardiovascular; Teste do limiar de percepção; Biopsia de pele; Biópsia de nervo sural; Potenciais estimuladores evocados por laser; Microneurography C - fibra de gravação; Resposta simpática da pele (SSR); Teste quantitativo do reflexo axonal sudomotor (QSART); teste de termorregulação do suor (TST) e o método silastic de impressão na pele; Testes de temperatura vasomotora da pele; Fluxometria Laser Doppler e a Cintilografia com Metaiodobenzilguanidina (123I - MIBG) (FÉLIX; OLIVEIRA, 2010; GUIMARÃES; SILVEIRA, 2008; DEVIGILI *et al.*, 2008; HOITSMA, *et al.*, 2004;).

Os testes de diagnóstico para identificar neuropatia de fibras finas incluem biópsia de pele, testes sensoriais quantitativos e autonômicos. Testes adicionais, como os que medem pequenos potenciais evocados relacionados a fibras e microscopia confocal da córnea, podem contribuir para um melhor entendimento dessas neuropatias. Os marcadores bioquímicos também podem ajudar na triagem de pacientes quanto à presença de neuropatia de fibras pequenas e avaliar a progressão da doença (TERKELSEN *et al.*, 2017).

Apesar dos avanços em nossa compreensão do NFF, suas características e história natural apresentam várias dificuldades para o desenvolvimento de uma classificação que irá capturar todos os aspectos do transtorno. Primeiro, o curso da neuropatia pode mudar com o tempo; em segundo lugar, embora os critérios de

diagnóstico tenham sido estabelecidos para NFF dependente de comprimento simétrico, nenhum critério está disponível para mononeuropatias focais ou multifocais de pequenas fibras, ou para a apresentação ganglionar não dependente de comprimento; em terceiro, vários dos testes usados para identificar NFF são demorados, requerem conhecimentos específicos e são limitados a configurações especializadas (TERKELSEN *et al.*, 2017). Finalmente, a perda de pequenas fibras também pode ocorrer em condições que geralmente não são consideradas como tendo as características essenciais da neuropatia periférica, por exemplo, fibromialgia (LAWSON *et al.*, 2018), síndrome de Ehlers-Danlos (CAZZATO, 2016) e doença de Parkinson (SIEPMANN, PENZLIN, ILLIGENS, REICHMANN, 2017).

2.4 Exames diagnósticos para neuropatias periféricas de fibras finas

Embora a maioria das instituições tenha desenvolvido diferentes protocolos para os testes de fibras finas, os testes confirmatórios de NFF podem ser grosseiramente divididos em dois subtipos: (A) testes para avaliar fibras finas somáticas (sensoriais), como o Teste termorregulador do suor (TST); potenciais evocados por calor de contato (CHEPs); e teste sensorial quantitativo QST); e (B) testes para avaliar a função das fibras autonômicas, como o Teste quantitativo de reflexo axonal sudomotor (QSART); Testes de função cardiovaga; Respostas simpáticas da pele (SSR) e o Teste de enrugamento da pele (GONDIN *et al.*, 2018). A Biopsia de Pele (caso avalie inervação das glândulas sudoríparas) e a Microscopia Confocal de Córnea (a córnea é densamente inervada por fibras trigeminais sensoriais e autonômicas) são indicados para a detecção de ambas as lesões (CHEN *et al.*, 2015).

A análise imunohistoquímica da densidade das fibras nervosas intraepidérmicas (IENFD) de uma biópsia de pele certamente é uma ferramenta útil para identificar NFF. Uma redução na densidade dessas pequenas fibras tornou-se um “padrão ouro” para o diagnóstico de NFF (LAURIA *et al.*, 2010), principalmente as lesões de fibras finas comprimento-dependentes. A inervação intraepidérmica apresenta redução em pacientes com NFF, levando a hiperexcitabilidade dos neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal ou dos nociceptores periféricos restantes, tendo a dor como um sintoma chave (KARL *et al.*, 2019).

A IENFD foi o marcador mais utilizado nas análises de biopsia de pele nos estudos dessa revisão. Um artigo dinamarquês (KARLSSON, MLLER, JENSEN, NYENGAARD, 2013) comparou duas formas de análise da biopsia de pele: comprimentos e densidade de fibras nervosas, além dos inchaços axonais; e demonstrou que a estimativa do comprimento é tão eficaz quanto a densidade na diferenciação de NFF e normais, apesar dessas variáveis fornecem informações quantitativas diferentes. A estimativa do comprimento da fibra nervosa exige mais tempo e equipamento adicional, comparado ao IENFD, mas utilizados em conjunto podem melhorar a eficiência no diagnóstico do NFF. Um outro estudo, realizado na Itália (PROVITERA *et al.*, 2018), demonstrou que a razão/proporção de IENFD da perna para a coxa representa uma ferramenta valiosa no diagnóstico diferencial entre ganglionopatia sensorial por fibras finas (SFSG) e neuropatias periféricas de fibras finas (NFF) comprimento-dependente. O estudo demonstrou que a média da razão da IENFD da perna / coxa foi significativamente maior nos pacientes com SFSG em comparação aos pacientes com NFF comprimento-dependente.

Os estudos mostram que todas as quatro formas de análise de Biopsia de Pele demonstradas nesta revisão são capazes de detectar Neuropatia Periférica de Fibras Finas. Apesar de sua eficácia comprovada, um estudo desenvolvido nos Estados Unidos comparou a sensibilidade da biópsia de pele para o diagnóstico de neuropatia sensorial de fibras finas em pacientes sino-americanos e chineses não americanos, usando os valores de referência normativos mundiais de IENFD em segmento distal (JIN, CHENG, CHEN, ZHOU, 2018). A IENFD do grupo de indivíduos chineses americanos foi menor do que no grupo dos chineses não americanos. Diante disso, o estudo sugere que as diferenças étnicas influenciam nos resultados da avaliação da IENFD na perna distal. Outro estudo recente propôs um parâmetro auxiliar para melhorar a eficiência do diagnóstico de biópsia de pele (PISCOSQUITO *et al.*, 2020). Eles mediram a distância entre IENFs consecutivos e demonstraram que a distribuição espacial irregular é uma característica intrínseca do NFF e que precede a perda real do nervo, sugerindo a presença de um trecho da epiderme desnervada maior que 350 μm , sendo um parâmetro capaz de aumentar a eficiência diagnóstica da biópsia de pele.

O segundo teste diagnóstico mais explicitado nesta revisão foi o microscopia confocal da córnea (CCM). O uso dessa ferramenta para a avaliação de neuropatia tem crescido consideravelmente na última década e vem sendo apresentada como

uma abordagem alternativa para quantificar fibras finas *in vivo* (KALTENIECE *et al.*, 2017). A córnea é densamente inervada por fibras trigeminais sensoriais e autonômicas (fibras C e A δ) e a microscopia confocal da córnea também surgiu como uma nova ferramenta diagnóstica não invasiva para avaliar a neuropatia de fibras fibras em várias condições de saúde (GONDIN *et al.*, 2018). Quatro parâmetros principais da CCM foram avaliados de forma quantitativa: 1. densidade de fibra nervosa da córnea (CNFD); 2. densidade do ramo do nervo corneano (CNBD); 3. comprimento da fibra nervosa córnea (CNFL) - o comprimento total de todos fibras; e 4. tortuosidade da fibra nervosa da córnea (CNFT). CNFD e CNFL são analisados para refletir a degeneração geral das fibras nervosas, enquanto o CNBD reflete a regeneração das fibras nervosas (TAVAKOLI *et al.*, 2012).

Em um estudo na Alemanha (ZIEGLER *et al.*, 2014), medidas de CCM e IENFD foram comparadas entre si e também associadas à medidas neurofisiológicas, estudos de condução nervosa (NCS), teste sensorial quantitativos (QST) e testes de função autonômica cardiovascular (AFTs). Neste estudo, o CNFD foi o parâmetro mais sensível entre as seis medidas da CCM estudadas. O estudo mostrou que CCM e IENFD detectam perda de fibras finas no diabetes diagnosticado recentemente, mas nem todos os indivíduos demonstraram alterações nos dois testes. Em alguns indivíduos, a perda de comprimento da fibra nervosa da córnea pode até ser a primeira evidência de polineuropatia sensório-motora diabética (PSD) subclínica. Em 2018, também no Reino Unido, foi publicado um estudo de coorte que comparou a CCM com a técnica do Laser Doppler imager flare (LDIFLARE) em indivíduos com hipotireoidismo (HT) recém-diagnosticado, antes e após o tratamento adequado (SHARMA, TOBIN, VAS, RAYMAN, 2018). Os resultados mostraram que esses métodos são sensíveis e avaliam o envolvimento neural precoce, bem como se relacionam à gravidade da deficiência, conforme indicado pelos níveis séricos de TSH.

Em 2017, foi publicado um estudo no Canadá (Blackmore and Siddiq, 2017) com o intuito de avaliar a sensibilidade e a especificidade de testes diagnósticos disponíveis para NFF. O diagnóstico foi baseado em sintomas, exame neurológico detalhado que incluiu o teste de picada de agulha (PP) e resultados anormais em pelo menos uma modalidade de teste – QSART, QST e HRV. Após a comparação dos testes o QST foi mais sensível para detecção de NFF com o teste de dor e de calor, tendo maior sensibilidade do que resfriamento. Apesar disso, o estudo sugere para se ter um diagnóstico definitivo, o exame neurológico, QSART e QST alterados devem

estar alterados. Um estudo desenvolvido na Alemanha testou o QST e comparou com a Biopsia de Pele (ÜÇEYLER *et al.*, 2018). Em controles saudáveis, a inervação da pele teve uma correlação positiva com limiares sensoriais, enquanto esta correlação foi perdida em pacientes PNP e NFF. O estudo também demonstrou que QST não fez distinção entre neuropatias dolorosas e indolores. Outros estudos têm demonstrando que o QST é um teste bastante utilizado, mas que sozinho não é capaz de concluir um diagnóstico de NFF (TERKELSEN *et al.*, 2017). Um estudo recente comparou vários testes diagnósticos para NFF. O QST teve a sensibilidade de 72% e especificidade de 39%, quando utilizado sozinho, mas teve sua eficácia aumentada quando utilizado em conjunto com ESC, LEP e Biopsia de Pele, melhorando a sensibilidade e especificidade do diagnóstico para 90% e 87%, respectivamente (FABRY *et al.*, 2020).

Há vários anos o teste de limiar de temperatura (TTT), determinação de limiar de percepção e dor ao calor e frio, tem sido defendida como uma possível ferramenta para diagnosticar neuropatia de fibras finas (NFF) (Hoitsma *et al.*, 2004). Contudo, o longo tempo para a realização e a falta de padronização são as principais limitações encontradas para esse tipo de teste. Em um estudo nos Países Baixos (Bakkers *et al.*, 2015), o Teste de Limiar de Temperatura foi estudado com a finalidade de propor um protocolo ideal no diagnóstico de NFF. Os pacientes foram diagnosticados previamente através de Biopsia de pele, avaliando IENFD. Por local, o TTT foi realizado de acordo com o método de limites (dependente do tempo de reação: apertar um botão quando mudar a temperatura ou dor é sentida) e o método dos níveis (tempo de reação independente: por estímulo, respondendo se uma temperatura mais quente ou mais fria é detectada). A combinação de limiares de sensação de calor e frio, usando o método de níveis em pés e mãos, mostrou boa sensibilidade e especificidade, pois classificou 89% dos pacientes corretamente, em comparação com o protocolo de teste original, que também inclui o método de avaliação de limites. O estudo então afirma que, ao aplicar esta combinação, o tempo necessário para TTT pode ser reduzido, além de manter a precisão do diagnóstico, otimizando o teste. Contudo, ainda necessita de uma padronização internacional.

A comparação entre os diferentes métodos (níveis versus limites) foi descrito em outros estudos (HOITSMA *et al.*, 2005; BAKKERS *et al.*, 2013; BAKKERS *et al.*, 2015). Uma preferência pelo método de níveis foi sugerida porque nenhum efeito da taxa de mudança de temperatura de estímulo é visto, e a aplicabilidade é possível

mesmo em indivíduos que são difíceis de examinar, como sujeitos com deficiência cognitiva e crianças (DEFRIN, PICK, PERETZ, CARMELI, 2004; HOEIJMAKERS *et al.*, 2012).

Testes que avaliam a função autonômica através da sudorese foram explicitados nesta revisão. O teste Sudoscan foi desenvolvido para fornecer uma medição não invasiva, rápida, simples e quantitativa da função do suor (CALVET *et al.*, 2012). Além disso, é endossado pela American Autonomic Society (AAS) para a avaliação da função sudomotora em NFF (NOVAK, 2017). Um estudo feito nos Estados Unidos (CASELLINI *et al.*, 2013) mostrou que indivíduos diabéticos com neuropatia tiveram ESCs significativamente piores nos pés e mãos que os indivíduos com DM, mas sem neuropatia e controles saudáveis. As ESCs se correlacionaram significativamente com as medidas clínicas (NIS-LL), somáticas (QST) e autonômicas (QAFT) de neuropatia e com os escores de dor.

Cinco anos depois foram publicados dois estudos, também na França, para testar a eficácia diagnóstica do Sudoscan para NFF. O primeiro avaliou o envolvimento distal de fibras finas autonômicas na Polineuropatia amilodótica familiar (FAP) devido a várias mutações da transtirretina (TTR) (LEFAUCHEUR *et al.*, 2018). O estudo demonstrou que as medidas da ESC estão bem correlacionadas com a gravidade do TTR-FAP e podem fornecer um marcador precoce da doença. O segundo estudo francês supra citado foi o único desta revisão que teve a Biopsia de pele como teste de referência (DUCHESNE *et al.*, 2018). As medidas ESC foram comparadas com densidade de fibra nervosa autônoma da glândula sudorípara (SGNFD) e a IENFD em pacientes com polineuropatia. ESC foi mais fortemente correlacionado com SGNFD do que com IENFD, mas nos pés, ESC foi reduzido tanto em pacientes com SGNFD anormal, como em IENFD anormal. O estudo demonstrou que ESC é um método de valor potencial para avaliar a função sudomotora, que é uma das partes mais acessíveis do sistema nervoso autônomo.

Outros estudos encontrados corroboram com os achados dessa revisão sobre o Sudoscan. Usando o Michigan Neuropathy Screening Instrument (MNSI) como referência, ESC com valores anormais em mãos ou pés teve uma sensibilidade de 97% e valor preditivo positivo de 87% para detectar neuropatia em pacientes com diabetes há mais de cinco anos, e sensibilidade de 91%, e o valor preditivo positivo foi de 88% no grupo de diabéticos recentemente diagnosticados (CARBAJAL-RAMÍREZ *et al.*, 2019). Um estudo recente feito na Bulgária, mostrou que a assimetria

de resultados de sudorese dos pés, detectado pelo Sudoscan, provou ser um novo discriminador e preditor para pacientes diabéticos com pé diabético (GATEV *et al.*, 2020). Podendo ser considerado um marcador de dano precoce no protocolo de avaliação de neuropatia.

Outro teste que também avalia a sudorese como marcador é o Neuropad®, teste comercializado facilmente que mede a produção de suor com base na mudança de cor de um composto de cobalto II de azul para rosa e representa um teste clínico prático para disfunção sudomotora na neuropatia periférica diabética (PAPANAS *et al.*, 2007). Um estudo realizado nos Países Baixos (DATEMA *et al.*, 2012) mostrou que o Neuropad tem alta sensibilidade, se mostrando melhor que o Teste de enrugamento de pele (WISW), que tem sensibilidade e especificidade moderadas. Contudo, a combinação dos dois testes pode ser útil, pois quando ambos são anormais, o diagnóstico NFF é altamente provável, aumentando a especificidade da combinação para 97%. No ano seguinte foi publicado, também no Reino Unido (PONIRAKIS *et al.*, 2015), um estudo que demonstrou que a eficácia diagnóstica do Neuropad pode ser consideravelmente aprimorada usando Sudometrics, particularmente na avaliação do NFF e detecção de disfunção autonômica. Em um estudo colombiano, o Neuropad apresentou um desempenho adequado como ferramenta de triagem para neuropatia autonômica cardiovascular (CAN) em pacientes latino-americanos com DM 2, sendo 70,1% a sensibilidade do Neuropad® para qualquer grau de CAN, mas ligeiramente maior para os testes de respiração profunda e Valsalva do que para a posição deitada e em pé (MENDIVIL *et al.*, 2016).

Nesta revisão os CHEPs foram demonstrados em um estudo feito nos Países Baixos com o objetivo de estabelecer valores normais de CHEPs e sua aplicabilidade em pacientes com NFF. O estudo teve como teste de referência a biopsia de pele por meio da avaliação da IENFD, demonstrando que os CHEPs foram anormais em 73,8% dos pacientes. A pesquisa mostrou que houve um aumento de 9–16% na latência por centímetro de altura com o aumento da idade, sendo as amplitudes maiores nas mulheres do que nos homens, diminuindo (17–71%) com o envelhecimento (LAGERBURG *et al.*, 2015). Dessa forma, o estudo estabeleceu valores normais, confiabilidade e aplicabilidade clínica dos CHEPs em NFF, sendo proposto como uma ferramenta adicional não invasiva no diagnóstico de NFF. Apesar disso, os estudos mostram que a utilização dos potenciais evocados nociceptivos,

juntamente com a biópsia de pele, melhoram o diagnóstico de neuropatias dolorosas (CASANOVA-MOLLA, GRAU-JUNYENT, MORALES, VALLS-SOLÉ, 2011).

Os potenciais evocados nociceptivos calor de contato (CHEPs) e a laser (LEPs) têm demonstrado sensibilidade e especificidade adequadas para serem de uso clínico no diagnóstico diferencial de dor neuropática, em condições envolvendo A δ de fibras C e vias espinotálamo-corticais (GARCIA-LARREA, HAGIWARA, 2019). De acordo com as diretrizes emitidas pela Federação Internacional de Neurofisiologia Clínica e Grupo de interesse especial em dor neuropática da International Association for the Study of Pain (IASP), LEPs são a técnica neurofisiológica fácil e confiável para avaliar fibras nociceptivas (HAANPÄÄ *et al.*, 2011). Pulso de calor radiante gerados a laser ativam seletivamente nociceptores mecanotérmicos A delta e C, e evocam sensações de picada de agulha e potenciais cerebrais (LEPs), ambos relacionados à ativação de fibras finas mielinizadas de A delta (TRUINI, GALEOTTI, CRUCCU, GARCIA-LARREA, 2007).

Na Itália foi feito um estudo clínico, neurofisiológico e de biópsia de pele, no qual foram coletadas faixas normativas de LEP corrigidas por idade. Nos participantes saudáveis, a idade influenciou fortemente os intervalos normativos para todas as variáveis LEP. Em relação aos achados da biópsia de pele, LEPs apresentou 78% de sensibilidade e 81% de especificidade no diagnóstico de Neuropatia diabética de fibras finas. Diante dos dados, a pesquisa demonstra a precisão diagnóstica do LEP e propõe esta técnica como uma alternativa menos invasiva à biópsia de pele para o diagnóstico de pequenas fibras diabéticas neuropatia.

O segundo foi um estudo francês que comparou o valor diagnóstico de cinco testes neurofisiológicos em pacientes com NFF clinicamente definido ou possível relacionado a varias condições clínicas (LEFAUCHEUR *et al.*, 2015). O LEP foi o teste mais sensível (alterado em 79% dos pacientes com pelo menos um teste anormal), seguido por ESC, usando Sudoscan (®) dispositivo (61%), limiares de detecção de calor (WDT) (55%), respostas simpáticas da pele (SSR) (41%) e limiares de detecção de frio (CDT) (32%). O estudo concluiu que a combinação de LEP, avaliando fibras sensoriais A-delta, WDT, avaliando fibras C sensoriais, e ESC, avaliando fibras C autonômicas parece uma abordagem relevante para o diagnóstico de SFN. Recentemente, na França, foi realizado um estudo semelhante comparando seis métodos diagnósticos para fibras finas nervosas sensoriais e autonômicas: biópsia de pele, QST, sistema de medição quantitativa do suor (Q-Sweat), LEP, ESC e Testes

autonômicos cardiovasculares (Fabry *et al.*, 2020). O estudo mostrou que a combinação de biópsia de pele, LEP, QST e ESC tem uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 87%, descrevendo os benefícios da combinação de biópsia de pele, ESC, LEP e QST no diagnóstico de NFF.

A partir da análise desses estudos, pode-se inferir que a biópsia de pele, em todas as suas formas de análise, mostra-se reconhecidamente superior aos demais testes, primeiro por ter sido escolhida como o principal teste de referência para avaliar a eficácia diagnóstica dos demais testes; e segundo porque demonstrou ser capaz de diagnosticar NFF de forma quantitativa e objetiva, sendo a análise da densidade das fibras nervosas intraépidermicas a mais elegível pelos estudos. Contudo, a biópsia de pele tem como desvantagem ser um procedimento invasivo e estático, por ser *in vitro*. Nesse aspecto, a Microscopia Confocal de Córnea se coloca como um teste superior e alternativo à Biópsia de Pele por ser um teste não invasivo, de alta reprodutibilidade, dinâmico e feito *in vivo*, sendo a densidade de fibra nervosa da córnea, o parâmetro mais sensível. Além disso, apresentou uma correlação significativa com a análise da Densidade das fibras intraépidermicas e também foi escolhido como teste de referência de outros estudos.

Tanto a CCM como a Biópsia de Pele foram associadas a medidas neurofisiológicas, estudos de condução nervosa e testes de função autonômica cardiovascular. Os estudos propõem o Teste Sensorial Quantitativo, Potencial Evocado a Laser e a Condutância Eletroquímica da pele pelo Sudoscan como ferramentas alternativas menos invasivas à IENFD, por serem mais sensíveis quando comparados a outros testes. Contudo, se forem usados em conjunto ou em combinação com outros testes como o Teste quantitativo de reflexo axonal sudomotor, Potenciais evocados por calor de contato e Testes de Limiares térmicos, apresentam a sensibilidade e especificidade do diagnóstico aumentadas.

O Neuropad foi sugerido como teste de triagem sensível e reprodutível para avaliação das fibras finas autonômicas na Neuropatia Diabética, e ainda teve sua eficácia melhorada com o uso em conjunto do Sudometrics e Teste de Enrugamento. De acordo com os estudos, os testes da avaliação da função autonômica cardíaca não tiveram correção significativa com os demais testes, portanto, devem ser feitos de forma adicional.

2.5 Vermelho de Alizarina S (VAS)

O vermelho de Alizarina (1,2-dihidroxiantraquinona-3-sulfonato de sódio – VAS), também chamado de carmina alizarina ou alizarina S, faz parte do grupo dos corantes hidroxiantraquinonas, disponível comercialmente em forma de pó cristalino monossódico, molido e coloração amarelo alaranjado, facilmente solúvel em água e etanol, transformando-se em uma solução amarelada, mas que se torna insolúvel em alguns solventes orgânicos, principalmente o éter (SANTOS-JÚNIOR, 2001). Esse produto é resultante do aquecimento do 1,2-dihidroxiantraquinona (ALZ) com três partes de ácido sulfúrico fumegante por várias horas em temperatura de 100 – 150°C, seguido de neutralização, com hidróxido de cálcio, convertido a sal de sódio com carbonato de sódio e evaporado até secar (WELCHER, 1948 apud SANTOS-JÚNIOR, 2001).

Em 1915, Atack descobriu que o VAS poderia ser usado para detectar alumínio na presença dos demais metais e relatou que a substância, em meio ácido, possui coloração amarela, e em meio básico, a cor púrpura. Essa coloração pode ainda variar a depender das substâncias que possam reagir com sua composição, assumindo colorações como verde ou rosa (ATACK, 1915 apud SANTOS-JÚNIOR, 2001).

Desde então os estudos sobre o VAS foram desenvolvidos, entre eles o de Owens e Yoe (1960), que compararam o uso de corantes derivados de 1,4-dihidroxiantraquinona e derivados de quinizarina como forma de indicadores metálicos de Th com EDTA. De acordo com a análise, chegaram a conclusão que o VAS proporciona uma boa titulação na faixa de pH entre 2,2 a 3,4, porém os derivados de quinizarina apresentaram um pH mais elevado que o VAS.

Parissakis e Kontoyannakos (1963) indicaram um método espectrofotométrico apropriado para determinação de fluoreto através da reação de íons fluoreto com o complexo colorido de Zr-VAS e concluíram que esse complexo é estável em determinadas faixas de pH. Saxena e colaboradores (1994) realizaram um estudo mais detalhado em relação à utilização e imobilização do VAS sobre a resina Amberlite XAD-2, resultando na síntese de uma resina quelante, bem como na sua aplicação na pré-concentração de Pb (II), Cd(II), Zn(II), Ni(II), empregando a espectrometria de absorção atômica em chama. Os autores mostraram que os quatro metais foram determinados de forma quantitativa e demonstraram a eficiência da resina estudada sobre outras resinas quelantes.

O reagente VAS também foi empregado em outros procedimentos analíticos e diversas metodologias de pesquisa, tais como catalizadores, análise de suas propriedades físicas e em estudos voltamétricos (SANTOS-JÚNIOR, 2001). Estela e colaboradores (1992) desenvolveram uma metodologia para determinação cinética de Mn pelo seu efeito catalítico, sobre a oxidação de VAS, por peróxido de hidrogênio. Abd el Wahed e colaboradores (1998) determinaram potenciométricamente parâmetros termodinâmicos que caracterizam a formação de complexos divalentes de Mn, Fe, Co, Ni e Cu com VAS. Em 1999, Mouchrek Filho e colaboradores utilizaram o VAS como agente modificador de eletrodos em análise voltamétrica de cobre.

Santos Júnior (2002) estudou as condições de separação e pré-concentração de Mn, Cu e Zn utilizando uma metodologia de extração líquido-sólido, para posterior determinação de Mn, Cu e Zn em amostras salinas, nas quais o reagente 1,2-dihidroxiantraquinona3-sulfonato de sódio, vermelho de alizarina S (VAS), é usado como agente complexante e a resina não-iônica Amberlite XAD-7, como suporte sólido.

O reagente vermelho de alizarina S já está sendo utilizado em testes diagnósticos para determinar Neuropatias Periféricas, conforme descrito em tópico anterior no Teste do Suor de Termorregulação (TST). Pode-se observar, através de vários estudos, que o VAS é utilizado como reagente colorimétrico e empregado em propósitos analíticos de forma satisfatória.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver e avaliar o efeito de membranas poliméricas de alginato de sódio contendo vermelho de alizarina (VAS) e carbonato de sódio (CS) no auxílio do diagnóstico de neuropatias periféricas.

3.2 Específicos

- Desenvolver membranas poliméricas de alginato de sódio contendo VAS e CS;
- Caracterizar as membranas poliméricas obtidas por meio de análises físico-químicas, espectroscópicas;
- Avaliar o potencial de irritabilidade por métodos ex-vivo;
- Realizar um ensaio clínico piloto para avaliar o potencial diagnóstico das membranas poliméricas em três grupos: pacientes diabéticos sem neuropatias, pacientes diabéticos com neuropatias periféricas e pessoas que não apresentam a patologia;
- Avaliar a reação colorimétrica da membrana através de registros fotográficos.

CAPÍTULO III

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE
ADESIVO DÉRMICO CONTENDO VERMELHO
DE ALIZARINA COMO TESTE RÁPIDO NO
AUXÍLIO AO DIAGNÓSTICO DE NEUROPATHIA
DIABÉTICA**

4 INTRODUÇÃO

As polineuropatias ocorrem por uma degeneração primária das fibras nervosas periféricas, como acontecem nas neuropatias hereditárias, ou estão relacionadas a condições clínicas sistêmicas, a exemplo do diabetes mellitus. Podem ser extremamente debilitantes, provocando alterações sensitivas, motora e autonômicas, que a depender da severidade, acabam por comprometer a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. A abordagem diagnóstica mais utilizada para a detecção das neuropatias periféricas incluem anamnese, exame físico neurológico e testes diagnósticos específicos, tais como a eletroneuromiografia, biópsia de nervo e de pele e testes que avaliam a função das fibras nervosas.

As neuropatias de fibras grossas são bem avaliadas através da eletroneuromiografia. Por outro lado, as neuropatias de fibras finas requerem testes mais sofisticados, uma vez que as fibras finas são quase “invisíveis” aos estudos de condução nervosa convencional (SIEPMANN, PENZLIN, ILLIGENS, REICHMANN, 2017; TERKELSEN *et al.*, 2017).

As principais manifestações clínicas das neuropatias periféricas de fibras finas (NFF) são queimação nos pés, alteração da sensibilidade térmica e dolorosa e alterações autonômicas. Um dos procedimentos clínicos mais utilizados para o diagnóstico de NFF são os testes que avaliam a função sudomotora dos pacientes, como, por exemplo, o TST. Os pacientes neuropatas apresentam a sudorese comprometida e a partir dessa condição pode ser realizado o diagnóstico de neuropatias periféricas de fibras finas (ILLIGENS, 2008; FLORES, *et al.*, 2015; SHIVAPRASAD *et al.*, 2018).

Alguns testes que envolvem a avaliação da atividade sudomotora, como o TST, apresentam limitações, como o alto custo, longo tempo de exame, complexidade, necessidade de ambiente específico e isolado, além do fato de ser bastante desconfortável para o paciente. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma alternativa tecnológica, utilizando o mesmo composto – Vermelho de alizarina (VAS), que propõe analisar uma nova forma diagnóstica com mais rapidez e conforto aos pacientes, torna-se necessário. No caso do produto desenvolvido, a reação colorimétrica acontece quando o suor do indivíduo reage com a membrana de carbonato de sódio e esta, em seguida, reage a membrana do VAS, proporcionando a alteração da cor, indicando alteração ou não na sudorese. Seguindo esse

pressuposto, o desenvolvimento de membranas poliméricas de alginato de sódio contendo VAS e CS podem apresentar-se como um produto promissor para o diagnóstico de neuropatias periféricas.

4.1 Material e Métodos

4.1.1 Preparo das membranas de vermelho de alizarina S e carbonato de sódio

As membranas de alginato de sódio contendo VAS (Memb/VAS) e as membranas de alginato de sódio contendo CS (Memb/CS) da SIGMA foram obtidas através do método de *casting*, o qual consiste em verter dispersões aquosas de polímeros em suportes adequados, como, por exemplo, superfícies de polietileno ou placas de Petri (NUNES *et al.*, 2016). Para a obtenção das Memb/VAS, inicialmente, uma solução de alginato de sódio (1,5 % p/v) foi preparada sob temperatura de 35 – 40 °C. Em seguida, 0,1 g de vermelho de alizarina S (VAS) e 0,1 g de glicerol (agente plastificante) foram adicionados à solução de alginato. A solução obtida foi mantida sob agitação magnética constante (400 rpm), em temperatura ambiente, durante 24 horas. Após decorrido o tempo de agitação, a solução das membranas foi vertida em placas de Petri de plástico estéril de poliestireno de 5 cm de diâmetro que foram submetidas à secagem em capela de fluxo laminar, sob temperatura ambiente, durante 72 horas. Após a completa secagem, as membranas obtidas foram retiradas das placas, cortadas em formato quadrado com área de 4 cm² (2 cm x 2 cm) para a Memb/VAS e 5 cm² (2,5 cm x 2,5 cm) para a Memb/CS, acondicionadas em embalagens plásticas devidamente seladas e armazenadas em dessecador para evitar a presença de umidade. As Memb/CS foram obtidas seguindo a mesma metodologia, com a adição de 0,1 g de carbonato de sódio (CS) à solução de alginato ao invés do VAS.

4.1.2 Reação das Memb/CS e Memb/VAS com suor

As Memb/VAS e Memb/CS foram colocadas em conjunto (sobrepostas) com o auxílio de plástico adesivo dérmico hospitalar de alta aderência. Para a realização do teste de detecção de neuropatias periféricas, as membranas foram aplicadas na região do antepé de um dos pés dos pacientes. Na medida que ocorre a liberação do

suor do pé dos pacientes ocorre uma reação que promove a mudança de cor (reação colorimétrica) das membranas. Portanto, após a aplicação, as membranas podem reagir com o suor, promovendo a mudança de cor de forma mais intensa ou menos intensa.

4.1.3 Determinação do pH das membranas

As análises do pH das Memb/VAS, Memb/CS, bem como das membranas após a reação colorimétrica (suor + Memb/CS + Memb/VAS), foram realizadas em pHmetro Marte® modelo MB-10. O equipamento foi previamente calibrado com solução tampão padrão pH 4 e 7. As medidas foram determinadas em triplicata ($n = 3$), sob temperatura ambiente e com as membranas imersas em recipientes contendo água.

4.1.4 Análises por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises por DSC do VAS livre, CS livre, membranas de alginato (branco), Memb/VAS e Memb/CS foram realizadas em uma faixa de temperatura de 20 - 400 °C, utilizando um equipamento DSC-60 shimadzu®, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL·min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C·min⁻¹. Antes das análises, aproximadamente 3 mg das amostras em pó e pequenos fragmentos das membranas foram prensadas em cápsulas de alumínio. O DSC-60 foi previamente calibrado com índio metálico padrão (pureza $\geq 99\%$).

4.1.5 Avaliação do intumescimento das membranas

A capacidade de intumescimento das Memb/VAS e Memb/CS foi avaliada pela técnica de imersão (HASANI-SADRABADI *et al.*, 2011). As membranas foram colocadas em conjunto (sobrepostas), com auxílio de um adesivo hospitalar, e, em seguida, foram divididas em dois grupos: A e B. As membranas do grupo A foram imersas em 5 mL de água e as do grupo B em 5 mL de uma solução de suor artificial (NaCl 0,5 g/L; CH₄N₂O 0,1 g/L; H₂O QSP) (CASTRO, 2008). Ambos os meios foram previamente submetidos à ultrassom sonicador por 30 minutos e filtrados em filtros de membrana (PTFE – 0,45 µm) antes dos ensaios. Para determinar o grau de intumescimento, as membranas foram inicialmente pesadas (tempo 0) e imersas nos

recipientes contendo os meios, em diferentes intervalos de tempo: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 minutos. Após cada tempo, as membranas foram removidas do meio, colocadas em papel filtro para retirar o excesso de líquido e pesadas novamente. Os ensaios foram realizados em triplicata ($n = 3$) e sob temperatura ambiente. A capacidade de intumescimento das membranas foi determinada de acordo com a equação 1 (LIMA, 2017).

$$I = \frac{(P_u - P_s)}{P_s} * 100 \quad \text{Eq. (1);}$$

onde I é a capacidade de intumescimento das membranas, P_u (peso úmido) é o peso da amostra após o tempo de imersão no meio e P_s (peso seco) é o peso inicial da amostra.

4.1.6 Avaliação da irritabilidade das membranas em modelo *HET-CAM*

O potencial das Memb/VAS e Memb/CS em provocar irritação foi avaliado pela técnica de *HET-CAM* (LUEPKE, 1985). Ovos de galinha fertilizados foram incubados por 8 dias sob temperatura de 37 – 38 °C. Em seguida, as cascas dos ovos foram abertas e a membrana interna foi removida cuidadosamente sem causar danos à membrana cório-alantóide (CAM). Fragmentos das Memb/VAS e Memb/CS, com área de 1 cm², foram aplicadas na CAM. Uma solução aquosa de NaOH 1N (300 µL) foi utilizada como controle positivo e solução salina (NaCl 0,9%; 300 µL), como controle negativo. Após a aplicação, a CAM foi observada por 5 minutos (300 segundos), determinando o tempo de ocorrência de hemorragia, lise vascular e coagulação. Os ensaios foram realizados em triplicata ($n = 3$). O potencial ou índice de irritação foi determinado de acordo com a equação 2 (LUEPKE, 1985; BATISTA-DUHARTE *et al.*, 2016).

Onde, IS (*irritation score*) é o índice de irritação das amostras, sH é o tempo em segundos da hemorragia, sL é o tempo em segundos da lise e sC é o tempo em segundos da coagulação.

$$IS = \left(\frac{301 - sH}{300} * 5 \right) + \left(\frac{301 - sL}{300} * 7 \right) + \left(\frac{301 - sC}{300} * 9 \right) \quad \text{Eq. (2);}$$

4.1.7 Análise das membranas por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho das Memb/VAS, membranas após a reação colorimétrica (suor + Memb/CS + Memb/VAS) e das membranas que não reagiram com o suor, foram obtidos na região entre 4000 - 400 cm^{-1} , em um equipamento FTIR Shimadzu® modelo IR Prestige-21, equipado com aparato de sistema de reflexão total atenuada (ATR). As análises foram realizadas sob temperatura ambiente.

4.1.8 Estudo piloto

Foi realizado um estudo piloto, de maio a junho de 2018, com acadêmicos da Universidade Federal de Sergipe (UFS), para testar a reação colorimétrica da membrana contendo VAS e o tempo que essa reação aconteceria. Os indivíduos foram convidados aleatoriamente para participar da pesquisa. Foram testados 54 acadêmicos e aplicado o DN4 (*Douleur neuropathique 4 questions*) (ANEXO I) para a exclusão de dor neuropática, avaliando a reação em indivíduos sem comprometimento da sudorese. Um examinador aplicava a membrana e o questionário e o outro fotografava as membranas após a aplicação. O tempo de reação também foi avaliado para verificar o tempo necessário (em minutos) para a execução do teste. Após a retirada das membranas, estas eram colocadas em uma caixa de luz controlada e fotografadas em um fundo branco. As imagens foram analisadas por um terceiro examinador, que utilizou a ferramenta *ImageJ®* para avaliar a intensidade da coloração em pixels pelo software de análise de imagens.

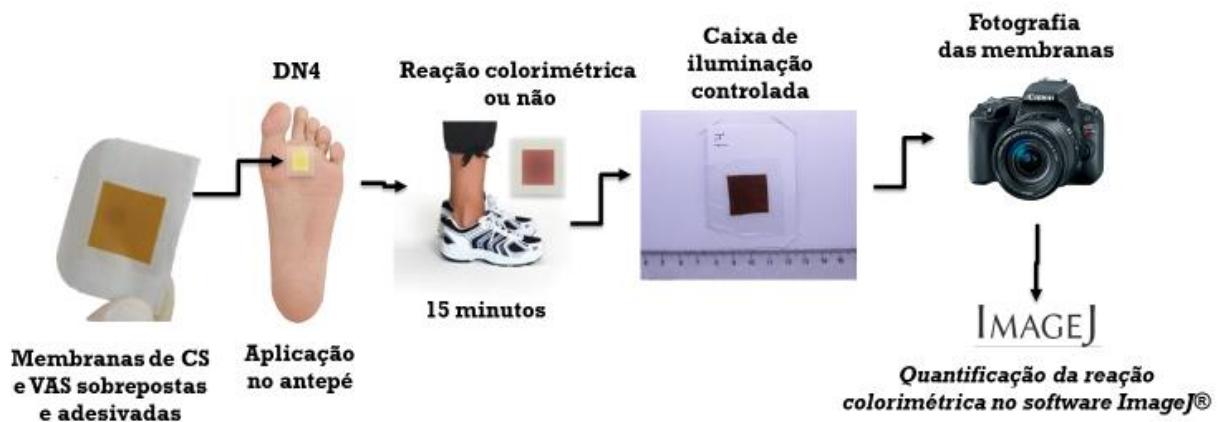
4.1.9 Metodologia da aplicação das membranas em ensaio clínico

Após as etapas de desenvolvimento e caracterização das membranas, um ensaio clínico duplo cego foi realizado com 60 voluntários divididos em três grupos (1, 2 e 3). No grupo 1 foram avaliados 20 indivíduos não diabéticos e sem neuropatias. No grupo 2 foram avaliados 20 indivíduos diabéticos e sem neuropatias. No grupo 3 foram avaliados 20 indivíduos diabéticos e com neuropatias. Essa seleção foi feita de forma aleatória durante os atendimentos, respeitando o fluxo do consultório. Os indivíduos foram submetidos à anamnese, exame físico e eletroneuromiografia, sendo

comprovadamente portadores de neuropatias periféricas ou não (pacientes controle), através de outros exames. Os indivíduos submetidos ao ensaio foram avaliados no Laboratório de Neurofisiologia Clínica do Centro de Saúde Professor José Augusto Barreto, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A). Esse estudo foi autorizado pela Clínica de Neurofisiologia (APÊNDICE B) e pela Universidade Federal de Sergipe (UFS) e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe (CAAE: 82894118.1.0000.5546) (ANEXO II). Foi feito também o Depósito de Patente do produto no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) (ANEXO III).

Para a aplicação do produto durante o ensaio clínico os participantes foram convidados a permanecer sentados e retirarem os calçados. Os pés foram previamente limpos com álcool 70%. Em seguida, foram aplicadas as Memb/VAS e Memb/CS – sobrepostas – na região do antepé de um dos pés, com o auxílio de plástico adesivo hospitalar próprio para ser aderido à pele. Decorrido os 15 minutos, as membranas foram retiradas dos pés dos participantes e avaliadas macroscopicamente para estudo clínico e análise diagnóstica. O registro fotográfico das membranas foi realizado por uma câmera digital (Cyber-shot 5.1MP – SONY®), posicionada a 20 cm da membrana, perpendicularmente à sua superfície adesivada, em um fundo branco localizado dentro de uma caixa de iluminação controlada (conforme esquema abaixo). Em seguida, as imagens foram digitalizadas no formato JPG e analisadas quanto a intensidade das cores pelo software de análise de imagens *ImageJ®*.

Figura 1. Processo de registro fotográfico das membranas.



Fonte: elaboração própria.

4.1.10 Protocolo do ensaio clínico

Se tratou de um ensaio clínico, duplo cego, não randomizado, com grupo controle. A coleta de dados ocorreu nos períodos entre agosto e outubro de 2018, e entre novembro de 2019 e fevereiro de 2020. Foram estudados indivíduos portadores de neuropatias periféricas associadas ao diabetes mellitus, provenientes de todo estado de Sergipe. Todos os indivíduos que chegavam ao consultório para realizar a eletroneurografia (ENG) de membros inferiores foram convidados a participar do estudo. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) procedeu-se a aplicação da membrana. O participante foi orientado a recolocar o calçado e permanecer com o pé no chão por 15 minutos (durante o período de espera outro pesquisador aplicava o questionário). O instrumento de coleta utilizado foi um questionário francês, traduzido e validado em português chamado DN4 (*Douleur neuropathique 4 questions*). Este constitui-se em um instrumento confiável no cenário clínico, priorizando um diagnóstico preciso e facilitando a distinção entre dor neuropática e nociceptiva (SANTOS *et al.*, 2011).

Ao final do experimento, a membrana foi retirada e colada em um fundo branco, dentro da caixa iluminada, sendo fotografada logo em seguida. Após essa etapa os indivíduos foram encaminhados ao laboratório para a realização de testes diagnósticos por outro examinador (neurologista/neurofisiologista), que não tinha o conhecimento dos resultados dos testes anteriores com a membrana. Os participantes foram submetidos a testes eletrofisiológicos através de eletroneuromiografia (ENG), que tem sido utilizado comumente em ensaios clínicos de neuropatia diabética humana, com base na facilidade de quantificação, reproduzibilidade e sensibilidade e especificidade aceitáveis (DYCK, *et al.*, 2010). Neste momento também foi captado o Período *Silent*, chamado de período de silêncio cutâneo (PSC), que se constitui em um reflexo nociceptivo protetor inibitório, e sua aferência consiste em fibras nervosas A-delta (UMAY, *et al.*, 2012). Foi verificado também o Reflexo Cutâneo Simpático, que é frequentemente usado no diagnóstico do comprometimento funcional das fibras simpáticas sudomotoras pós-ganglionares não mielinizadas nas neuropatias periféricas (KUCERA, GOLDENBERG, KURCA, 2004; SHINDO *et al.*, 2017). Além destes, foi feita a medição da variação do Intervalo R-R, que avalia a função cardiovascular e é o teste mais utilizado para avaliar o suprimento nervoso autônomo ao coração (SÈNE, 2017).

Foram incluídos no estudo os indivíduos atendidos na Clínica de Neurologia e Eletrofisiologia com encaminhamento para realizar Eletroneurografia de Membros Inferiores. Foram excluídos, em contrapartida, indivíduos com marcapasso ou alguma outra impossibilidade para a realização da eletroneurografia. Além disso, foram excluídos indivíduos com Hiperidrose e Hiperqueratinose, ou que fizessem uso de medicamentos que alteram a sudorese.

Como limitações do estudo podemos destacar a amostra por conveniência, o número pequeno de participantes e a ausência de comparação com o “padrão ouro”.

4.1.10.1 A avaliação do período de silêncio cutâneo (PSC)

A avaliação do período de silêncio cutâneo (PSC) foi realizada nos membros inferiores dos participantes com base na estimulação do nervo sural. Os eletrodos de captação ativa (E1) foram colocados no músculo tibial anterior, enquanto o eletrodo de referência (E2) foi colocado 2 cm proximal aos eletrodos ativos. Estímulos elétricos foram aplicados no terço distal da perna do paciente, lateral ao maléolo externo, com pulsos de onda quadrada de 0,5 ms de duração, na intensidade de 66-80 mA (de 14 vezes acima do limiar de sensibilidade) e na frequência de 3 Hz. Foi solicitado aos indivíduos que fizessem um esforço máximo de dorso-flexão do pé, enquanto os estímulos elétricos eram competentes. Cinco gravações foram obtidas em intervalos de 30s. Os filtros foram ajustados em 5 Hz - 10 KHz, a duração da varredura foi de 250 ms e a sensibilidade foi de 500 uV / divisão. Foram feitos registros com traçados simples, não retificados, e como latências dos registros obtidos, foram demarcadas. A latência inicial foi definida como o ponto final da atividade muscular. A latência final foi definida como o ponto em que a atividade muscular foi retomada (ONAL *et al.*, 2010).

4.1.10.2 Avaliação da variação do intervalo RR (VIRR)

A obtenção da VIRR foi realizada com equipamento de eletroneuromiografia (Viking Quest). O registro foi obtido após o período de repouso, com paciente sentado em ambiente com temperatura e ruídos controlados. Foi pedido ao paciente que permanecesse em repouso. Eletrodos de captação foram colocados no dorso de ambas as mãos e o eletrodo terra no antebraço. Durante 90 segundos foi registrado traçados de eletrocardiograma (ECG), sendo que o primeiro complexo QRS foi obtido e os demais foram captados e avaliados em milissegundos a partir do primeiro QRS.

O programa automaticamente calcula os intervalos entre o primeiro complexo QRS e os demais, e fornece dados de intervalo mínimo, máximo, relação MAX/MIN e percentual da variação do intervalo entre as ondas Rs dos complexos QRS (ALTUN *et al.*, 2008).

4.1.10.3 A avaliação do reflexo cutâneo simpático (SSR)

O eletrodo de registro ativo foi colocado em região plantar e o eletrodo de referência na região dorsal do pé. O eletrodo terra foi colocado no pulso. Cinco estímulos elétricos consecutivos com Intensidade de 20 mA e duração de 0,2 mseg foram aplicados ao nervo tibial contralateral no maleolo. O intervalo dos estímulos foi superior a 7 segundos. Banda a passagem foi definida entre 2 e 5.000 Hz. A velocidade de varredura foi de 300-500 mseg / div, a sensibilidade foi 200–500 micV / div. A latência SSR foi medida desde o início do estímulo até o pico negativo dos potenciais de ação. A amplitude SSR foi medida do pico positivo ao pico negativo (ALTUN *et al.*, 2008).

A partir do resultado dos exames, anamnese e exame físico dos participantes, eles foram classificados entre: normais, diabéticos sem neuropatia e diabéticos com neuropatia. Os exames também foram usados como testes comparativos entre si e seus resultados comparados à reação colrimétrica da membrana contendo VAS e CS, através do software Image J.

4.1.10.4 Análise Estatística

A dispersão dos dados do Image J foi analisada pelos testes de Mann-Whitney, com pós-teste de Dunn. A variação das médias pela escala de cor foi demonstrada pelo gráfico *Heatmap* nos três grupos estudados. A comparação entre os testes de variáveis numéricas utilizados nos três grupos foi feita pela Correlação de Spearman-r.

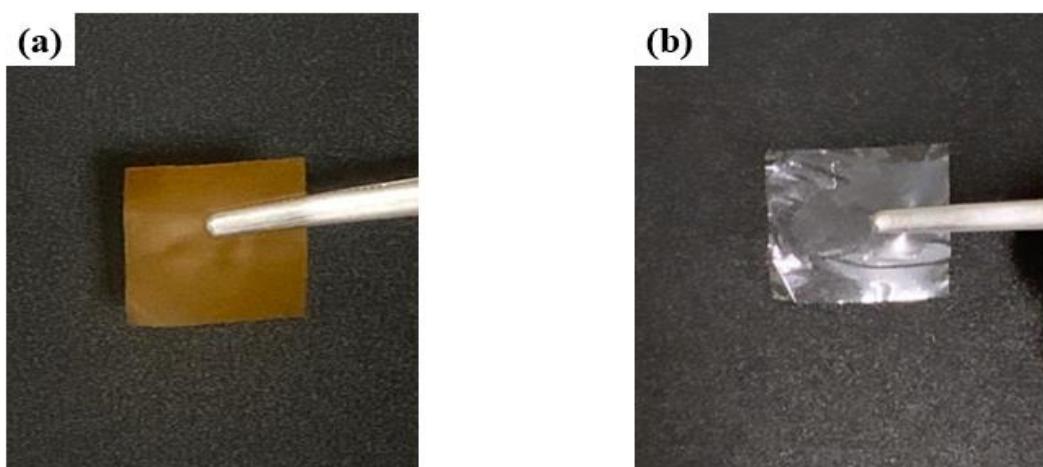
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das membranas

O VAS e CS apresentaram características adequadas para a produção de membranas com alginato de sódio, por ser atóxico, biodegradável, de baixo custo, e também por terem sido englobados na matriz polimérica. Esse polímero demonstra propriedades mecânicas reconhecidamente apropriadas para a formação de películas/filmes, principalmente com a adição de agentes plastificantes. Além disso, é também biodegradável e atóxico, podendo ser utilizado para várias aplicações farmacêuticas (BILGAINYA; KHAN; MANN, 2010; NETO *et al.*, 2017). As Memb/VAS e Memb/CS exibiram características macroscópicas homogêneas e deposição uniforme do VAS e CS, respectivamente.

As membranas foram preparadas por meio da técnica de *casting* e, após serem vertidas em placas de Petri, foram secas sob temperatura ambiente, removidas das placas com o auxílio de uma pinça de metal e em seguida as características organolépticas foram analisadas. As Memb/VAS e Memb/CS foram embaladas, identificadas e armazenadas em dessecador. As Memb/VAS apresentaram uma coloração amarelo-alaranjado, característica do VAS na forma livre em pó, enquanto que as Memb/CS exibiram coloração transparente (Figura 2). Ambas demonstraram flexibilidade, sem odor e superfície lisa, sem a presença de grumos ou ranhuras, que são características satisfatórias para membranas poliméricas (LIMA, 2017).

Figura 1 - Memb/VAS (a) (área = 4 cm²) e Memb/CS (b) (área = 5 cm²), obtidas após a secagem e corte.



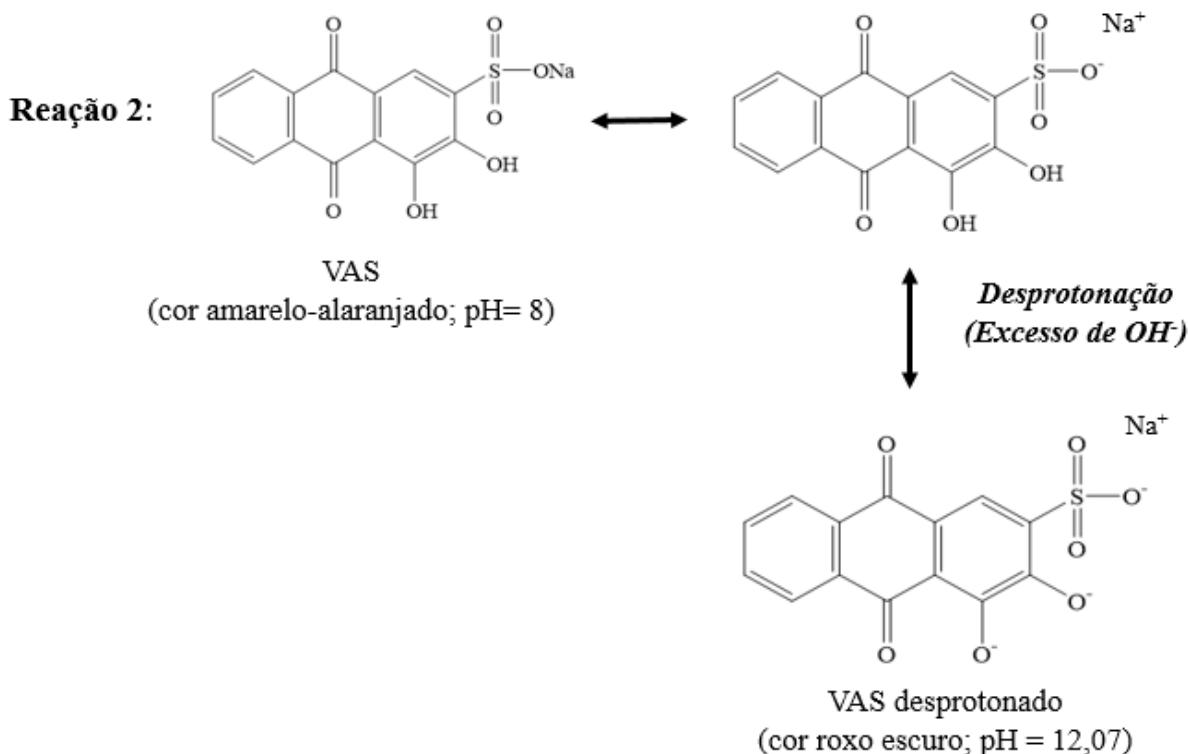
Fonte: elaboração própria.

5.2 Reação química das membranas com o suor e avaliação do pH

Após a preparação, a Memb/VAS foi colocada em contato com a Memb/CS com o auxílio de um adesivo dérmico hospitalar que garante boa adesão das membranas à pele. Essas duas membranas em contato, com a ausência de suor, não sofrem reação química e, assim, não há mudança de cor. As duas membranas são aplicadas em um dos pés dos voluntários, obedecendo a seguinte ordem de aplicação: *Pé (Antepé) → Memb/CS → Memb/VAS*. Na medida que o pé do indivíduo comece a suar, a água presente no suor reage com a Memb/CS, provocando a hidrólise básica do Na_2CO_3 , sofrida pelo ânion carbonato. A reação de hidratação desse composto se dá pela capacidade do íon carbonato de ser protonado em meio aquoso. Essa reação forma bicarbonato de sódio, excesso de hidroxilas (OH^-) e sódio (Na^+).

Com a reação de hidratação do Na_2CO_3 , a Memb/CS que está em contato com a Memb/VAS reage com esta, provocando a mudança de cor (reação colorimétrica) do VAS (amarelo-alaranjado para roxo escuro). A mudança de cor do VAS ocorre devido ao aumento do pH das membranas ocasionado pela hidratação do Na_2CO_3 (liberação de OH^-). Com o aumento de pH, ocorre a desprotonação das hidroxilas do anel fenólico da molécula do VAS, resultando na formação de um composto de cor roxo escuro. A coloração roxo do VAS desprotonado já foi descrita e elucidada por Kumar *et al.* (2017), que realizou a desprotonação desse composto utilizando íons fluoreto (F^-). As reações descritas em nosso estudo estão presentes na Figura 3.

Figura 2 - Reação colorimétrica das Memb/CS e Memb/VAS após a reação com suor. Reação 1: hidrólise básica do Na_2CO_3 provocada pela reação com o suor. Reação 2: desprotonação do VAS ocasionando a mudança de cor das Memb/VAS de amarelo-alaranjado para roxo escuro.



Fonte: elaboração própria.

A reação colorimétrica ocorre na Memb/VAS, após a reação com o Na_2CO_3 , tornando-se roxa, indicando reação química. As duas membranas devem ser aplicadas nos pacientes em conjunto, ou seja, na sequência. A Memb/CS reage com o suor e em seguida reage com a Memb/VAS, proporcionando a mudança de cor, que é o indicativo da reação química colorimétrica. Através dessa reação, é possível perceber alterações na sudorese e a possibilidade de neuropatia nos pacientes. É importante ressaltar que a Memb/CS, quando reage com o suor, continua transparente e, assim, não demonstra a reação colorimétrica, mas ao reagir com o suor entra em contato com a Memb/VAS, acontecendo a reação. Por essas razões, as duas membranas devem ser aplicadas em conjunto nos pacientes.

O pH é de grande importância nessa reação, pois a alteração no valor de pH proporciona a mudança de cor. O VAS com pH entre 3,5 – 9,4 apresenta uma coloração amarelo-alaranjado. Porém, com valor de pH ≥ 12 , essa molécula adquire

a coloração roxo escuro (SABNIS, 2007; SINGH; BHARATI, 2014). As membranas que obtiveram reação colorimétrica (suor + Memb/CS + Memb/VAS) apresentaram valor de pH de $12,07 \pm 0,03$ e mudança de cor para roxo, como descrito na literatura. Os valores de pH das Memb/VAS, Memb/CS e das membranas que reagiram com o suor (mudança de cor) estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1 - Valor de pH das Memb/VAS, Memb/CS e das membranas após a reação colorimétrica.

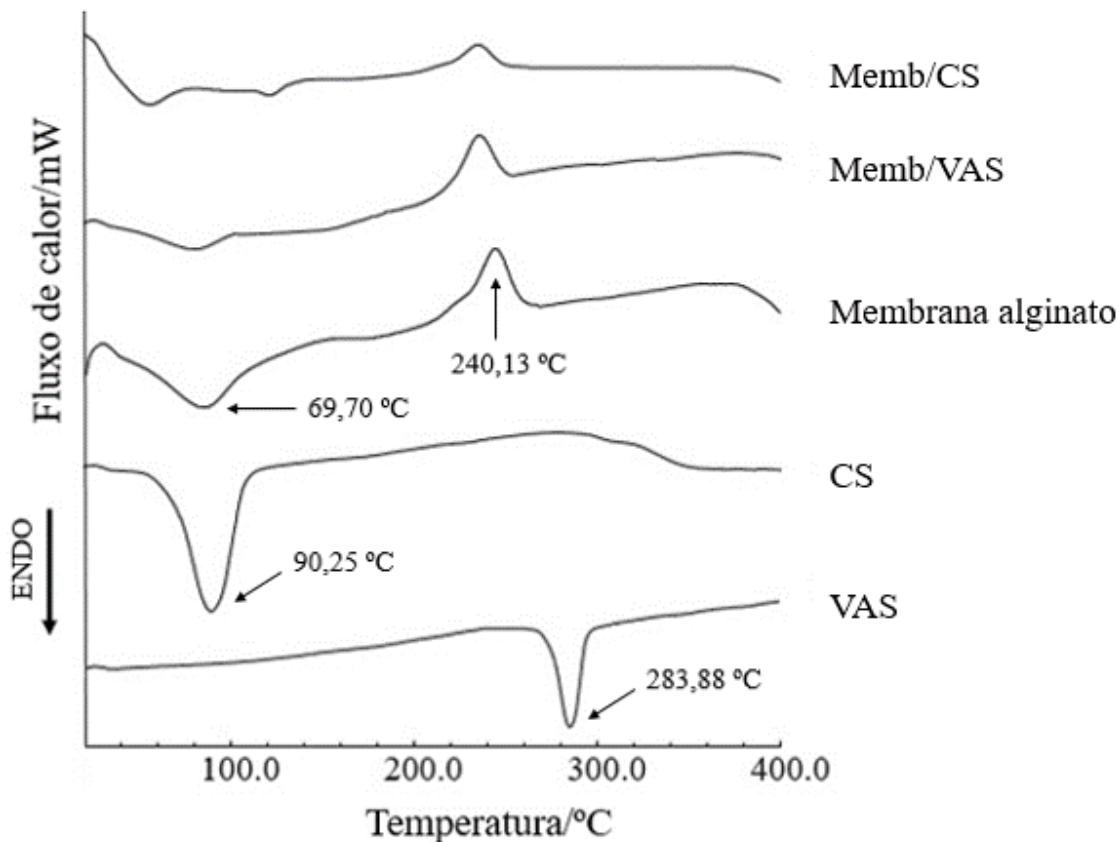
	Valor de pH	Média ± Desvio padrão (n=3)
Memb/VAS	8,01	
	8,02	$8,00 \pm 0,01$
	8,00	
Memb/CS	10,01	
	10,09	$10,07 \pm 0,05$
	10,12	
Membranas após reação	12,07	
	12,05	$12,07 \pm 0,03$
	12,12	

Fonte: elaboração própria.

5.3 Análises das membranas por DSC

A técnica de DSC nas análises de membranas foi utilizada para avaliar os eventos térmicos e a interação entre os compostos com a matriz polimérica após o processo de obtenção. As curvas de DSC do VAS, CS, membranas de alginato, Memb/VAS e Memb/CS estão apresentadas na Figura 4. O VAS demonstrou um pico endotérmico em $283,88^{\circ}\text{C}$ ($278,62$ – $287,70^{\circ}\text{C}$), o qual corresponde ao ponto de fusão dessa molécula (ponto de fusão $> 250^{\circ}\text{C}$) (SABNIS, 2007). O CS apresentou um pico endotérmico em $90,25^{\circ}\text{C}$ ($53,97$ – $110,40^{\circ}\text{C}$), característico da fusão desse composto. A curva de DSC da membrana de alginato exibiu um evento térmico em torno de $69,70^{\circ}\text{C}$ ($37,28$ – $94,75^{\circ}\text{C}$), que está relacionado com a perda de água. Além disso, a curva apresentou um evento exotérmico em $240,13^{\circ}\text{C}$ ($228,60$ – $253,30^{\circ}\text{C}$) associado à degradação térmica e eliminação de material carbonáceo desse polímero (SMITHA; SRIDHAR; KHAN, 2005; NETO *et al.*, 2017).

Figura 3 - Curvas de DSC do VAS, CS, membrana de alginato, Memb/VAS e Memb/CS.



Fonte: elaboração própria.

Na curva de DSC da Memb/VAS, o pico endotérmico do VAS foi englobado completamente, indicando interação entre VAS e o polímero utilizado para o preparo das membranas (alginato de sódio). Adicionalmente, a Memb/VAS demonstrou um evento endotérmico relacionado à perda de água e um evento exotérmico referente à degradação do alginato. A curva de DSC da Memb/CS também apresentou a ausência do pico endotérmico correspondente ao ponto de fusão do CS e os eventos de perda de água e degradação do alginato. Os resultados obtidos com as análises por DSC sugerem a interação entre o VAS e CS, com o alginato de sódio, possibilitando a formação de membranas poliméricas de alginato de sódio contendo esses compostos.

5.4 Capacidade intumescimento das membranas

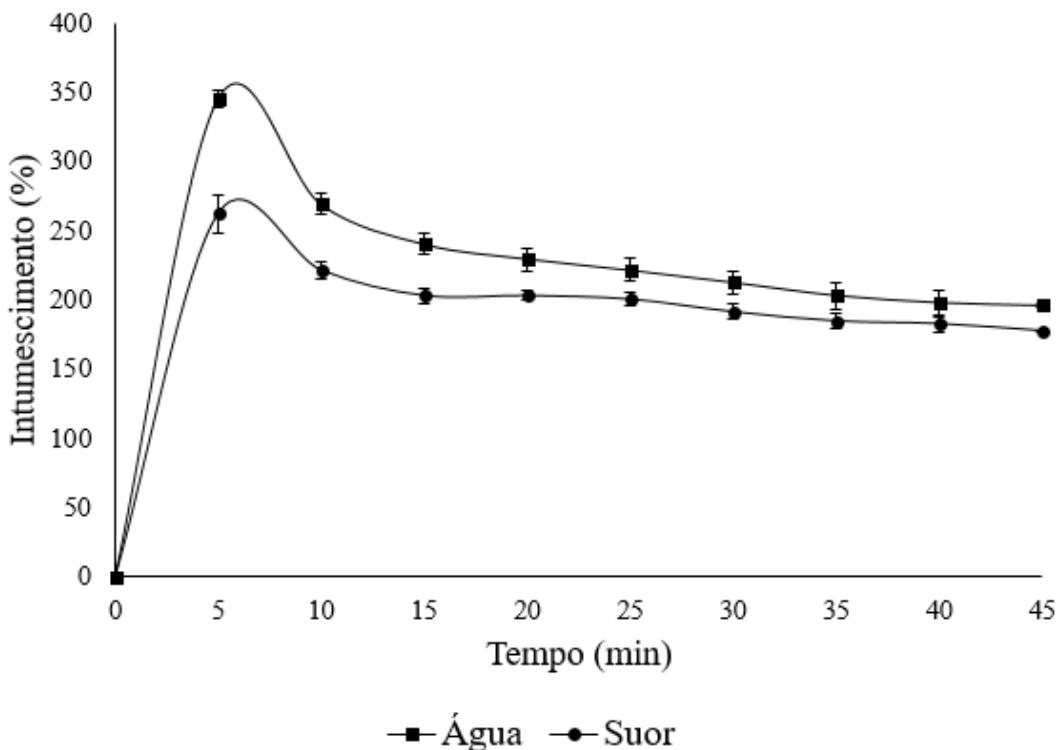
O intumescimento de membranas poliméricas pode ser relatado como o aumento do volume/peso do polímero que as constitui, devido à absorção de um determinado solvente (SHAH; PARADKAR, 2007; LIMA, 2017). Esse processo está relacionado com a entrada do solvente na matriz por capilaridade ou difusão. As

membranas desenvolvidas para esse estudo utilizam o alginato de sódio como matriz polimérica. O alginato apresenta grande capacidade de intumescimento devido à hidratação dos seus grupos hidrofílicos. Dessa forma, a solução utilizada como meio penetra na estrutura do polímero, preenchendo os espaços vazios entre as cadeias poliméricas. O equilíbrio é atingido quando a pressão osmótica se iguala às forças de ligação que mantém a estabilidade do polímero (PASPARAKIS; BOUROPOULOS, 2006; BAHRAMI; AKBARI; EFTEKHARI-SIS, 2019).

Além do potencial de intumescimento, as membranas não podem apresentar rápida degradação no meio. Com isso, as Memb/VAS e Memb/CS devem apresentar capacidade de intumescimento e resistência à degradação no meio, pois precisam absorver o suor liberado pelos pacientes e, assim, apresentar a reação colorimétrica para avaliação da possibilidade de neuropatia periférica. A capacidade de intumescimento da Memb/VAS e Memb/CS foi avaliada em dois meios: água, que é o solvente universal, e em uma solução artificial de suor, a qual simula o suor liberado pelos pacientes, possibilitando a reação entre a Memb/CS e a Memb/VAS. É importante ressaltar que o ensaio foi realizado com as duas membranas em contato, com auxílio de adesivo hospitalar, para simular a aplicação nos pacientes.

De acordo com a Figura 5, as membranas exibiram aumento na porcentagem de intumescimento, devido ao aumento de peso a partir do tempo que foram imersas nos meios. As membranas apresentaram intumescimento máximo em 5 minutos, com ganho de massa de 345,68 % e 262,59 % em água e suor, respectivamente. De 5 a 45 minutos, a porcentagem de intumescimento decaiu para 196,11 % e 177,59 % em água e suor, respectivamente. O potencial de intumescimento em água foi maior do que no suor artificial, pois a presença dos sais como o NaCl diminuem a entrada de água na matriz polimérica.

Figura 4 - Perfil de intumescimento das membranas em água e suor artificial. Os resultados foram expressos de acordo com a média \pm desvio padrão ($n = 3$) das análises.



Fonte: elaboração própria.

Os resultados demonstram que as membranas em contato com o adesivo apresentam capacidade de intumescimento em água e suor. É importante ressaltar que, durante todo o experimento (45 minutos), as membranas não foram degradadas no meio. Além disso, em 15 minutos de experimento, a porcentagem de intumescimento foi de 240,31% e 203,23% em água e suor, respectivamente. As membranas foram aplicadas em um dos pés do pacientes durante 15 minutos para realização do ensaio clínico para avaliar a presença neuropatia periférica. Portanto, esse tempo é adequado para que os pacientes liberem suor sem degradar a membrana. Ademais, caso seja necessário, a membrana pode ser aplicada pelo menos até os 45 minutos, uma vez que nesse tempo não foram degradadas e apresentaram potencial de intumescimento.

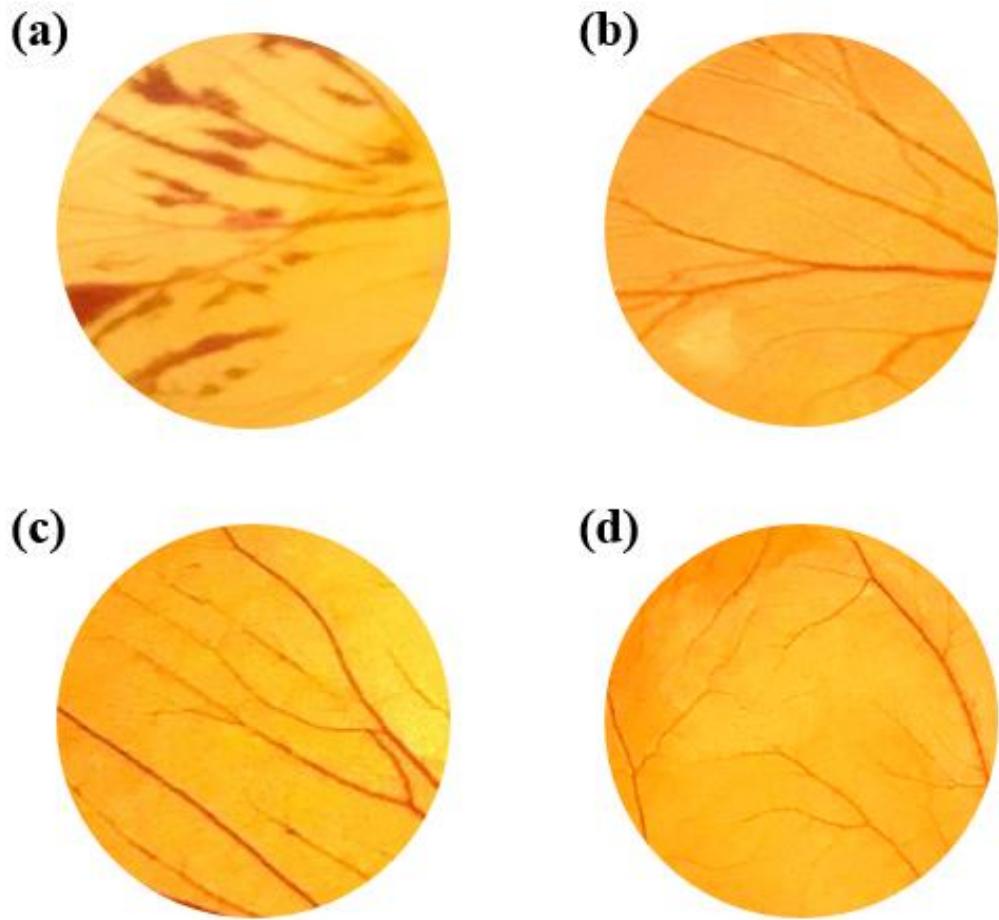
5.5 Ensaio de *HET-CAM*

A CAM é uma membrana embrionária altamente vascularizada formada pela fusão da parede alantóide com o córion, que responde a lesões de maneira semelhante ao tecido subcutâneo. Os ensaios na CAM de ovos de galinha fertilizados são uma metodologia utilizada em estudos para avaliar o potencial de irritação de substâncias e formulações na pele e/ou mucosas (LUEPKE, 1985; BENDER *et al.*, 2011; BATISTA-DUHARTE *et al.*, 2016). Dessa forma, o teste de *HET-CAM* é de grande importância para avaliar se as Memb/VAS e Memb/CS apresentam potencial de irritabilidade no local que serão aplicadas nos pacientes (antepé de um dos pés) durante a realização de ensaio clínico.

O potencial ou índice de irritação (IS) das membranas avaliadas foi calculado pela equação 2, a qual foi desenvolvida por Luepke (1985). Se o IS apresentar valor entre 0 – 0,9, a formulação é classificada como não irritante, entre 1 – 4,9 levemente irritante, entre 5 – 8,9 moderadamente irritante e entre 9 – 21 altamente irritante. O cálculo do IS baseia-se na substituição dos valores de tempo (segundos) de hemorragia, lise e coagulação dos vasos na equação. Caso não aconteça nenhum desses três fenômenos, considera-se o IS como 0 (LUEPKE, 1985). Solução de NaOH 1N foi utilizada como controle positivo, pois é altamente irritante para a CAM e para a pele. A solução salina foi utilizada como controle negativo, pois não provoca irritação (LUEPKE, 1985; BENDER *et al.*, 2011; BATISTA-DUHARTE *et al.*, 2016).

NaOH 1N apresentou IS de $15,22 \pm 0,47$, confirmando a sua característica altamente irritante provocando hemorragia, lise e coagulação na CAM, enquanto que a solução salina apresentou IS de 0. Assim como a salina, as Memb/VAS e Memb/CS também apresentaram IS de 0, devido à ausência de hemorragia, lise ou coagulação (Figura 6). É importante ressaltar que as Memb/VAS e Memb/CS utilizam o alginato de sódio como matriz polimérica, o qual é um polímero biodegradável, atóxico e que não provoca irritação (BILGAINYA; KHAN; MANN, 2010). Esses resultados demonstram que as Memb/VAS e Memb/CS não apresentam potencial de irritação e, dessa forma, podem ser aplicadas em pacientes para a realização de ensaios clínicos para diagnóstico de neuropatia periférica.

Figura 5 - Ensaio de HET-CAM das membranas. (a) NaOH 1N, (b) solução salina, (c) Memb/CS e (d) Memb/VAS.



Fonte: elaboração própria.

5.6 Análises das membranas por FTIR-ATR

As Memb/VAS, as membranas que não apresentaram reação colorimétrica e as membranas que apresentaram reação colorimétrica foram analisadas por FTIR-ATR para a identificação e avaliação de mudança nas bandas de absorção dos grupos funcionais das membranas e do indicador colorimétrico (VAS). Os espectros de FTIR-ATR das membranas estão presentes na Figura 7. O espectro de FTIR-ATR da Memb/VAS apresentou uma banda de absorção proeminente dos grupos hidroxila (O–H) em 3389 cm^{-1} , que estão presentes tanto no VAS (posições 1 e 2 do 1º anel aromático) e no alginato de sódio (associação polimérica), além de bandas de absorção em 2958 e 2874 cm^{-1} , as quais correspondem à presença de carbonos alifáticos (C–H alongamento de vibração). Em 1597 cm^{-1} foi identificada uma banda

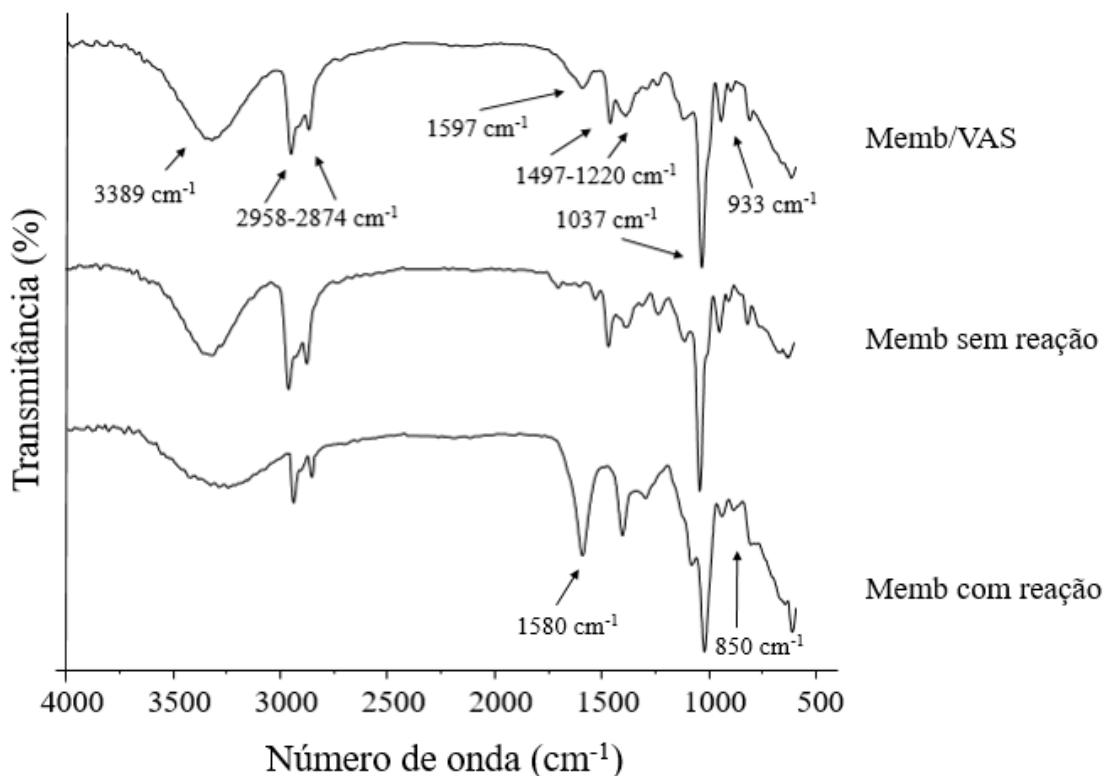
de absorção correspondente à vibrações de C=C em anéis aromáticos, uma vez que, dois anéis aromáticos estão presentes na molécula de VAS. Em 1497 e 1220 cm⁻¹ foram identificadas duas bandas de absorção de deformação axial referente à grupamentos C–O de ácidos carboxílicos, que estão presentes na molécula de alginato de sódio. A banda de absorção em 1037 cm⁻¹ é a mais intensa da Memb/VAS e corresponde a vibrações de grupos sulfóxidos (S=O alongamento de vibração), os quais estão presentes na molécula do VAS, com o objetivo de aumentar a solubilidade desse composto (SANTOS-JÚNIOR, 2001). A banda em 933 cm⁻¹ se refere a impressão digital da molécula.

A membranas que não apresentaram reação colorimétrica demonstraram bandas de absorção semelhantes à Memb/VAS, uma vez que essa molécula não sofreu nenhuma modificação química em sua estrutura. Nas membranas que não apresentaram reação, algumas bandas foram mais intensas do que as de VAS pura, como por exemplo as bandas de absorção dos grupos hidroxila (O–H) e de ácidos carboxílicos (C–O), devido à maior quantidade de alginato de sódio na associação entre as Memb/CS e Memb/VAS. No espectro dessa membrana também está presente a banda relacionada à impressão digital do VAS.

As membranas que apresentaram reação colorimétrica apresentaram banda de absorção dos grupamentos hidroxilas (O–H) menos intensas do que as membranas analisadas anteriormente. Essa condição está relacionada com a desprotonação da molécula do VAS, na qual as hidroxilas tornaram-se oxigênio com pares de elétrons livres (O⁻). Nas membranas que apresentaram reação, as bandas de absorção em 2958 e 2874 cm⁻¹ (carbonos alifáticos) apresentaram menor intensidade. Além disso, após a reação as membranas demonstraram uma banda de absorção intensa em 1580 cm⁻¹, a qual está relacionada com vibrações de núcleos aromáticos em que o anel está ligado a átomos com pares de elétrons livres. Essa banda corresponde a formação de grupos O⁻ decorrentes da desprotonação do VAS após a reação (suor + Memb/CS + Memb/VAS). A banda da impressão digital observada em 933 cm⁻¹ no espectro da Memb/VAS não está presente no espectro das membranas que apresentaram reação colorimétrica, devido a modificação na estrutura dessa molécula. No entanto, demonstrou pequenas bandas em 850 cm⁻¹ que estão relacionadas com o grupo carbonato (–CO₃²⁻) (TALEB; ALKAHTANI; MOHAMED, 2015), o qual está relacionado com a reação das membranas com suor. Essas mudanças nas bandas de absorção das membranas após a reação colorimétrica

identificadas por FTIR-ATR corroboram com as reações químicas apresentadas pelas membranas após a reação com o suor.

Figura 6- Espectros de FTIR-ATR das Memb/VAS, membranas que não apresentaram e membranas que apresentaram reação colorimétrica.



Fonte: elaboração própria.

5.7 Estudo Piloto

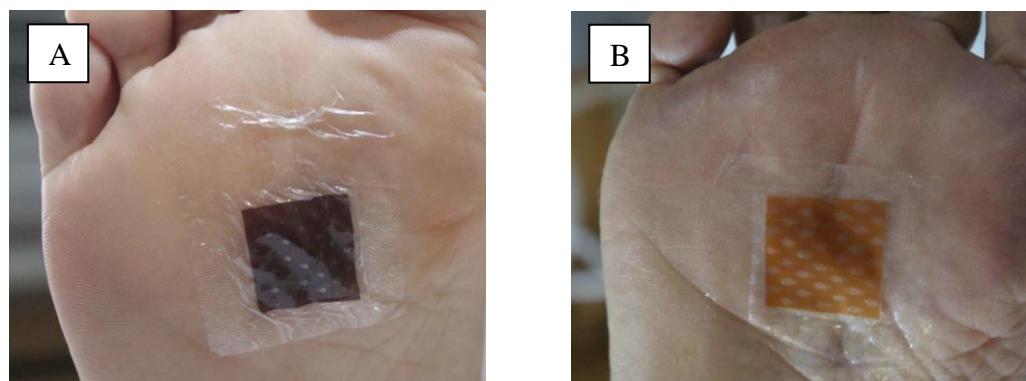
O estudo piloto foi realizado previamente com 54 acadêmicos da Universidade Federal de Sergipe (UFS), entre 16 e 34 anos, 66% eram mulheres. Todos eles apresentaram ausência de dor neuropática pelo questionário DN4. Destes, 90% apresentaram reação colorimérica da membrana acima de 40%, quanto à coloração quantificada em pixels, após a sudorese pelo software *ImageJ*®. O tempo estimado para a reação da membrana e realização do teste foi de 15 min e a partir desse tempo houve poucas mudanças na coloração. Dessa forma, para a otimização do tempo do teste, sem interferir no resultado, considerando também esse dado, esse tempo foi considerado o ideal.

5.8 Ensaio clínico e análise da quantificação da reação colorimétrica (mudança de cor) das membranas após aplicação nos indivíduos

O ensaio clínico foi realizado com voluntários divididos em três grupos: indivíduos sem diabetes e sem neuropatia (grupo 1), indivíduos diabéticos e sem neuropatia (grupo 2), e o grupo de diabéticos com neuropatia (grupo 3). Após a retirada das membranas do antepé dos indivíduos, elas foram avaliadas macroscopicamente para o estudo clínico e análise diagnóstica. Além disso, as membranas foram fotografadas para análises quanto à coloração apresentada após a sudorese no software *ImageJ®*, que permite o acompanhamento quantitativo da coloração das membranas por um método de análise não-invasivo.

Macroscopicamente, as membranas, após os 15 minutos de aplicação, apresentaram coloração arroxeadas por completo ou quase por completo, ou seja, toda, ou quase toda área da membrana aplicada com reação colorimétrica, indicando não positivo para neuropatia periférica, pois sugere sudorese satisfatória. Em contrapartida, as que apresentaram áreas isoladas na coloração arroxeadas ou ausência da coloração, isto é, mantendo a coloração amarelo-alaranjado padrão, indicariam resultado positivo, pois sugere sudorese comprometida (Figura 8).

Figura 7 - Representação das membranas que apresentaram reação colorimétrica após aplicação (a) e as que não apresentaram reação colorimétrica após aplicação (b).



Fonte: elaboração própria.

A mudança de cor da Memb/VAS de amarelo-alaranjado para roxo escuro (coloração arroxeadas) acontece devido à reação do suor dos pacientes com a membrana. Os indivíduos que não têm neuropatia periférica apresentam capacidade de sudorese sem comprometimentos e, assim, as membranas aplicadas durante os

15 minutos irão exibir reação colorimétrica completa ou pelo menos mais da metade da membrana apresentará reação. Por outro lado, os indivíduos que apresentam neuropatia periférica demonstram sudorese comprometida, ou seja, não apresentam capacidade de liberar suor ou suam minimamente pelos pés, indicando lesão nos nervos que inervam as glândulas sudoríparas. Dessa forma, as membranas não irão exibir reação colorimétrica ou pouca reação, pois não se tornam completamente arroxeadas, apenas pequenas áreas.

Após a aplicação das membranas nos grupos 1 e 2, constituídos de indivíduos sem neuropatias (diabéticos ou não), macroscopicamente, as membranas exibiram reação colorimétrica intensa, com toda ou praticamente toda área da membrana apresentando reação colorimétrica de amarelo-alaranjado para roxo, principalmente no grupo 1. Por outro lado, as membranas aplicadas nos pacientes do grupo 3 (pacientes com neuropatia periférica confirmada), macroscopicamente, as membranas exibiram pouca ou nenhuma reação colorimétrica.

Como explicado anteriormente, a reação depende da sudorese dos indivíduos. Contudo, alguns podem suar mais que outros, ou seja, o nível de liberação de suor pode variar. Portanto, nos grupos 1 e 2, apesar de todas as membranas aplicadas apresentarem mudança de cor, o nível e intensidade da coloração foram diferentes, principalmente no grupo 2. No grupo 3, as membranas não apresentaram reação ou exibiram pouca reação, indicando baixa sudorese dos pacientes, que é indicativo de neuropatia por lesão de fibras autonômicas. Porém, mesmo com pouca reação, a intensidade da coloração entre as membranas avaliadas foi diferente. Por esse motivo, as membranas não foram avaliadas apenas macroscopicamente. Após a aplicação nos participantes, as membranas foram fotografadas e analisadas no software *ImageJ*®, que possibilita uma quantificação rápida, segura e eficaz do nível de mudança de cor (reação colorimétrica) após a reação.

Para a quantificação da reação colorimétrica que ocorreu ou não nas membranas aplicadas, inicialmente, analisou-se a quantidade de pixels de uma Memb/VAS que não apresentou nenhuma reação, ou seja, uma Memb/VAS não aplicada nos pacientes foi fotografada e o valor médio de pixels foi utilizado como controle. A Memb/VAS controle apresentou uma média de pixels de $79,377 \pm 0,12$. Esse valor médio de pixels corresponde a 100% da membrana com coloração amarelo-alaranjado, isto é, sem nenhuma reação colorimétrica e 0% da membrana com coloração arroxeadas.

À medida que as membranas apresentam reação colorimétrica, ou seja, reagem com o suor, mudando a coloração para roxo escuro, o valor médio de pixels diminui. Quanto mais roxa as membranas ficarem após os 15 minutos de aplicação, menor o valor de pixels da membranas. Esse valor encontrado é convertido para porcentagem, de acordo com valor da Memb/VAS controle. Essa conversão para porcentagem é de grande importância para determinar uma faixa na qual será possível detectar a possibilidade da presença ou ausência de neuropatias nos pacientes.

As membranas aplicadas nos voluntários dos grupos 1 e 2, os quais não apresentam neuropatias pela Eletroneurografia (ENG), demonstraram uma média de porcentagem de reação colorimétrica de amarelo-alaranjado para arroxeados acima de 40% (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados dos testes realizados durante o ensaio clínico nos três grupos estudados.

Variável	Grupo Controle (n= 20)	Grupo DM (n=20)	Grupo PNP (n=20)	P
Idade (anos)	56,2±15,4	62,5±13,0	63,3±17,6	0,2889
Amplitude Idade (anos)	31-89	32-84	21-89	-
Sexo				
Masculino	9	9	9	-
Feminino	11	11	11	
DN4				
Média±d.p.	1,95±1,46	1,80±1,54	5,10±1,55 ^a	p<0,001
PSC				
Latência Inicial (ms)	103,1±9,7 ^a	114,8±9,4 ^b	126,1±10,5 ^c	p<0,01
Latência Final (ms)	143,3±13,0	147,5±14,5	164,6±19,1 ^a	p<0,001
SSR				
Presente	13	13	2	-
Ausente	7	7	18	-
ENG				
SEM PNP	100%	100%	0%	-
COM PNP	0%	0%	100%	-
INTERVALO RR				
MIM (bpm)	63,3±10,1	69,0±14,0	71,3±12,2	0,6705
MAX (bpm)	76,3±11,2	78,8±15,1	78,0±13,6	0,8306
MAX/MIN	1,21±0,14	1,14±0,08	1,10±0,12 ^a	p<0,001
VIRR (%)	18,8±11,4	13,8±7,3	9,5±11,7 ^a	p<0,001
RESULTADO ImageJ				
%	53,4±11,5 ^a	39,9±12,0 ^b	27,4±13,0 ^c	p<0,01
Faixa extrapolada	50-70	35-50	0-35	

Fonte: elaboração própria.

Por outro lado, as membranas aplicadas nos pacientes do grupo 3, os quais antes do ensaio clínico já foram comprovados com a presença de neuropatias, demonstraram a média de porcentagem de reação colorimétrica de amarelo-alaranjado para arroxeados bem abaixo dos 40%. Um estudo recente, feito na Bulgária, mostrou que a assimetria de resultados de sudorese dos pés, detectado pelo Sudoscan, provou ser um novo discriminador e preditor para pacientes diabéticos com pé diabético, pois a assimetria de pés detectada pelo Sudoscan nesses pacientes foi significativamente maior (19,6%), em comparação com aqueles com apenas neuropatia diabética (7,9%) e em comparação com o grupo com diabetes recém-diagnosticado (7,44%) e o grupo com controle (2,5%) (GATEV *et al.*, 2020). Desse modo, a quantificação do suor se constitui como um marcador de dano precoce no protocolo de avaliação de neuropatia.

Os indivíduos foram pareados por sexo e idade, sendo a maioria do sexo feminino. A Tabela 2 mostra um comparativo entre os testes utilizados nos três grupos estudados, demonstrando concordância com os resultados prévios da eletroneurografia (ENG), como estudo de condução, e da análise colorimétrica da membrana pelo Image J. O estudo de condução avaliou a presença de neuropatias de fibras grossas, tendo o diagnóstico de polineuropatia (PNP). Então, o grupo de diabéticos com neuropatia, demonstrou sinais de comprometimento de fibras nervosas de grosso calibre (PNP), podendo ser precedidas de comprometimento de fibras finas. Assim, pode-se observar que o grupo controle teve ENG normal e o grupo de diabéticos sem neuropatia demonstra ENG normal, indicando que não havia degeneração de fibras nervosas de grosso calibre.

O questionário DN4, que demonstra presença de sinais e sintomas sugestivos de dor neuropática, esteve sugestivo de dor neuropática apenas no grupo de diabéticos com neuropatia, tendo uma média de pontuação superior a 5. O DN4 constitui-se em um instrumento bastante utilizado no cenário clínico, facilitando a distinção entre dor neuropática e nociceptiva (SANTOS *et al.*, 2011), a partir da pontuação 4 é considerado dor neuropática. Os resultados do estudo de validação da versão em português demonstraram sensibilidade de 100% e especificidade de 93,2%, sendo também capaz de identificar pacientes com dor neuropática a fim de obter informações sobre os sinais e sintomas atualmente apresentados, tempo da doença e exames diagnósticos já utilizados (ECKELI, TEIXEIRA, GOUVÉIA, 2016).

Em relação ao reflexo cutâneo simpático (SSR), ele está relacionado a atividade das fibras finas simpáticas, que inervam glândulas sudorípara. A sua ausência sugere neuropatia de fibras finas. Observamos que a maioria dos indivíduos do grupo de diabéticos com neuropatia demonstram ausência de SSR. Esses dados são apoiados por achados recentes de estudos que demonstraram que o SSR anormal tem associação com história de ulceração do pé em pacientes com polineuropatia diabética (GERAWARAPONG, 2015).

Foi observado ainda que a taxa de variância do intervalo RR demonstra significativa redução no grupo de diabéticos com neuropatia, tendo um média abaixo de 10%, sugerindo a presença de neuropatia autonômica cardíaca (um tipo de neuropatia de fibras finas). O grupo de diabéticos sem neuropatia demonstra valores menores que o grupo controle, porém não estatisticamente significativo. A oscilação entre batimentos sinusais sucessivos ou intervalos RR, denominada variabilidade da frequência cardíaca, é um marcador importante da função autonômica do coração (RIBEIRO *et al.*, 2018). A disfunção autonômica cardíaca é uma complicaçāo frequente, mas subdiagnosticada, do diabetes tipo 2, que está associada a arritmia, infarto do miocárdio e morte súbita, acarretando um risco de mortalidade aproximadamente cinco vezes maior (MASER *et al.*, 2003). A perda da variação da frequência cardíaca é uma das primeiras manifestações desse processo (SHAH *et al.*, 2019).

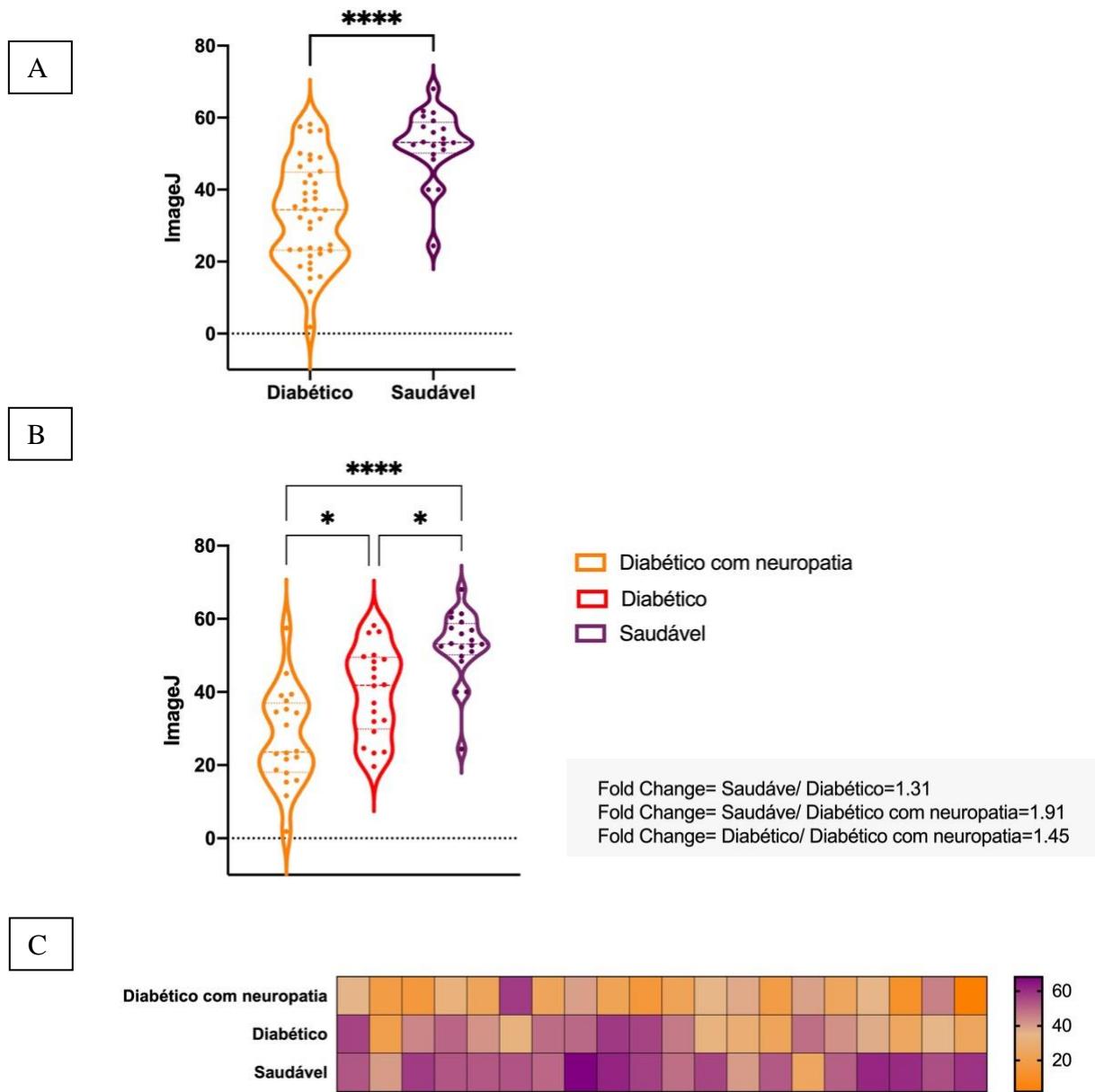
O Período de Silêncio Cutâneo (PSC) é um teste utilizado para avaliar as fibras nervosas aferentes relacionadas a dor, portanto fibras finas. Ele foi realizado em membros inferiores apenas e medidas as latências de início e final. Foi demonstrado na tabela 2 que em relação a latência de início houve um prolongamento nos grupos de diabéticos sem neuropatia e com neuropatia, sendo que neste último o aumento da latência foi maior. Em relação a latência final do CSP observamos que apenas o grupo de diabéticos com neuropatia demonstrou prolongamento. Este período de inatividade elétrica, chamado de período de silêncio, é examinado nas extremidades após estimulação nervosa durante a contração voluntária (KIMURA, 1989; ISHIKAWA *et al.*, 2001). Estudos afirmam que essa ferramenta pode ser um método útil para a detecção precoce de neuropatia diabética de fibras finas (YAMAN, *et al.*, 2007; KOYTAK *et al.*, 2011; KAMEL, *et al.*, 2015).

De acordo com os resultados de quantificação da reação colorimétrica das membranas fotografadas após o ensaio clínico através do *ImageJ*®, é possível

estimar a presença ou ausência de neuropatias periféricas (Figura 9). Inicialmente, foi possível observar um menor número de pixels nos pacientes diabéticos neuropatas ou não, comparado ao grupo saudável (Figura 9A). Essa diferença foi melhor visualizada ao separarmos os grupos diabéticos com e sem neuropatia (Figura 9B). No grupo de diabéticos com neuropatia, os pixels sofrem pouca alteração. Nos diabéticos sem neuropatia e no grupo dos indivíduos saudáveis essa alteração é mais perceptível, principalmente no grupo dos saudáveis, que apresenta sudorese mais intensa, redução do número de pixels alaranjados e aumento do número de pixels arroxeados. Estudo realizado nos Estados Unidos, que corrobora com estes resultados, mostrou que indivíduos diabéticos com neuropatia tiveram resultados do teste Sudoscan significativamente piores nos pés e mãos que os indivíduos com diabetes sem neuropatia e controles saudáveis (CASELLINI *et al.*, 2013).

Para melhor visualizar esses dados foi construído um Heatmap com as variações do número de pixel em relação às medianas, com os 3 grupos (Figura 9C). O Heatmap representa a mediana dos percentis do ImageJ através da conversão de cores. A cor laranja representa a menor conversão e o roxo uma maior conversão. Como descrito anteriormente, foi observado que a maioria dos pacientes com neuropatia apresentam pouca mudança da cor. De fato, a mediana do grupo com neuropatia foi 1,91 vezes menor que o grupo controle e 1,45 vezes menor que no grupo com diabetes; além disso, foi observado que o grupo diabético apresenta uma mediana 1,3 menor que o grupo saudável. Assim, o grupo de diabéticos sem neuropatia apresenta uma redução da sudorese em relação ao grupo saudável. Esse dado chama a atenção para a importância de se ter um protocolo com teste de triagem para neuropatia nos serviços de atenção à saúde para esse público específico.

Figura 8 - Demonstração da reação colorimétrica pelo software Image J. A Figura A representa a mediana dos valores dos grupos de diabéticos, comparados com os grupos saudáveis pela dispersão dos dados por gráfico de violino e as diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. A Figura B representa a mediana dos valores dos três grupos por gráfico de violino e as diferenças estatísticas foram calculadas pelo teste múltiplo de Dunn's. A figura C representa a variação dessas médias pela escala de cor, pelo gráfico Heatmap nos três grupos estudados.

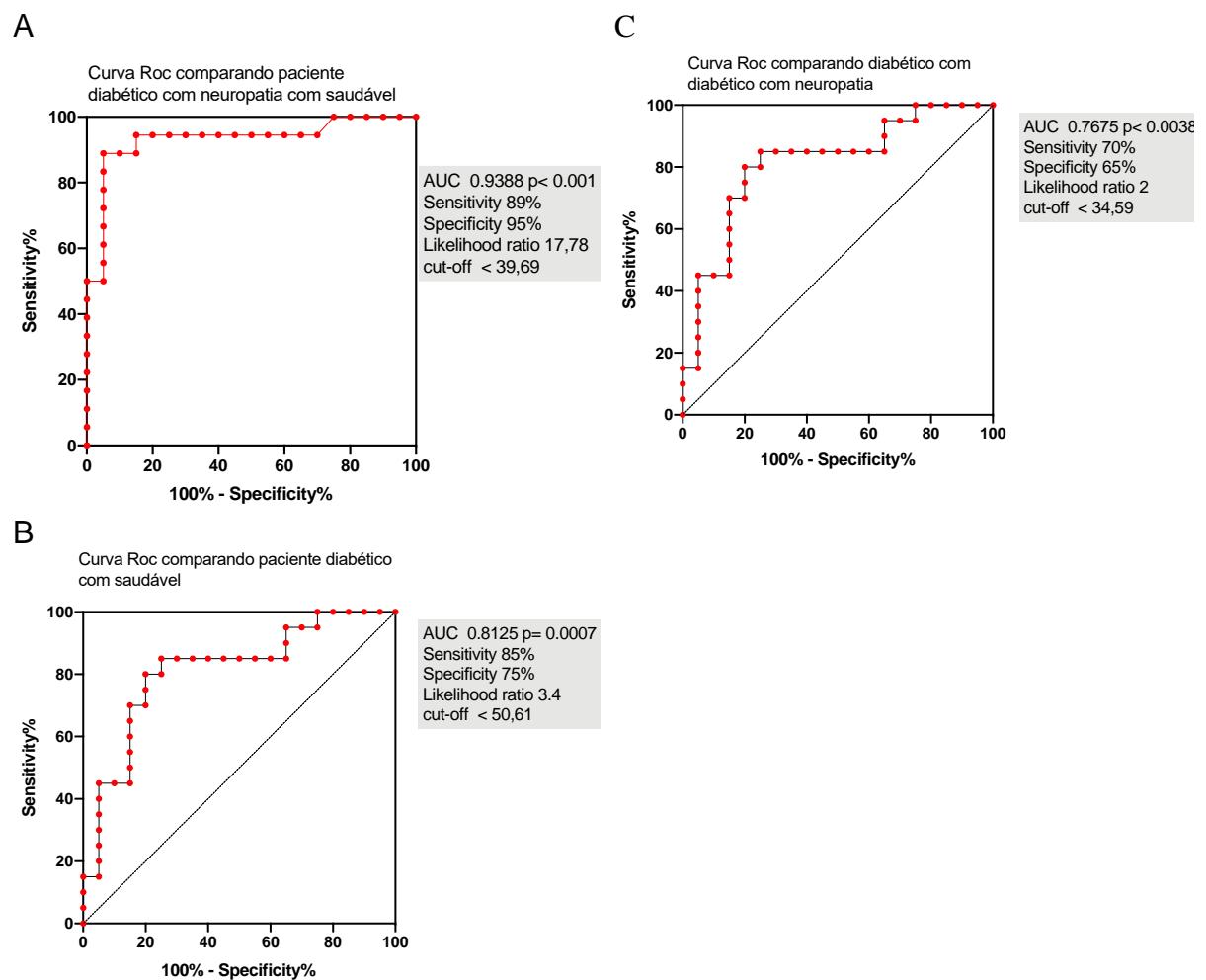


Fonte: elaboração própria.

Para verificar se esse teste é capaz de separar os grupos foi realizado a CURVA ROC com os valores do Image J entre os grupos com diabetes, diabetes com neuropatia e saudáveis (Figura 10). A melhor curva foi obtida comparando o grupo Diabéticos com neuropatia com o grupo saudável, foi observada uma área sobre a

curva de 0,9388 com sensibilidade de 89% e especificidade de 95%, com cut-off < 39,95% (Figura 10A). Esse teste também foi capaz de separar os pacientes diabéticos dos saudáveis (Figura 10B). Destacando que o teste apresentou uma sensibilidade de 70% e especificidade de 65% em um cut-off abaixo de 34,59%, para separar pacientes diabéticos com e sem neuropatia (Figura 10C).

Figura 9 - Curva ROC realizada com os dados do ImageJ, demonstrando a sensibilidade e especificidade do teste a partir da comparação entre os grupos Diabéticos com neuropatia e saudáveis (A), Diabéticos e Saudáveis (B), e Diabéticos com e sem neuropatia.



Fonte: elaboração própria.

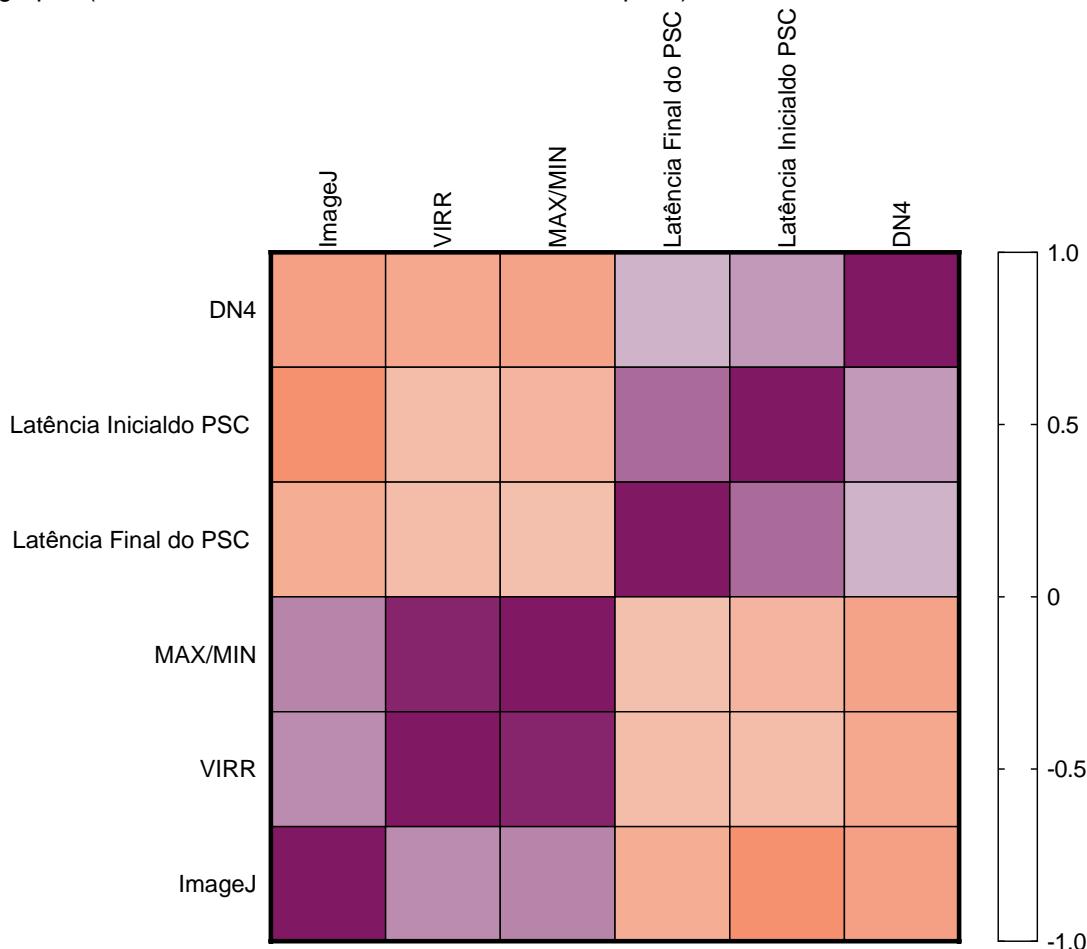
De acordo com os resultados do teste proposto, se após a aplicação as membranas apresentarem uma reação colorimétrica de 0 - 40%, os indivíduos apresentam possibilidade de ter neuropatias periféricas, pois demonstram uma sudorese comprometida, uma vez que a membrana reagiu fracamente. Se após a aplicação as membranas apresentarem uma reação colorimétrica de 40 - 100%, os

indivíduos apresentam possibilidade reduzida de terem neuropatias periféricas de fibras finas, demonstrando a sudorese esperada, que possibilita a reação colorimétrica nas membranas. Apesar dos diabéticos sem neuropatia não apresentarem reação média abaixo dos 40%, seus valores se mostraram inferiores à porcentagem de reação dos indivíduos sem diabetes, inclusive alguns dos pacientes apresentaram reações inferiores ao padrão estabelecido.

Esses dados podem ser explicados porque a disfunção nervosa da fibra fina ocorre no início do curso da Neuropatia Diabética (DPN), frequentemente assintomática e difícil de diagnosticar com testes tradicionais de função e condução nervosa (SAID, 2007). Consequentemente, identificar DPN pode ser difícil nos estágios iniciais da neuropatia (VINIK *et al.*, 2008) e essa pode ser a explicação da diferença de porcentagem de reação colorimétrica entre os grupos saudáveis e diabéticos sem neuropatia. Um estudo feito na Índia mostrou que a disfunção sudomotora é altamente prevalente em pacientes com DM tipo 2, especialmente naqueles com DPN. Vários fatores relacionados ao diabetes, como duração da doença e níveis de hemoglobina glicada foram associados a valores mais baixos de Condutância Eletroquímica da Pele (ESC), indicando uma associação entre hiperglycemia crônica e a função sudomotora (SHIVAPRASAD *et al.*, 2018).

Além disso, para melhor entender as diversas formas de diagnóstico para neuropatia de fibras finas utilizadas nesse estudo, um mapa de correlação entre testes de variáveis numéricas nos três grupos foi construído (Figura 11). Ao nosso saber, ainda não havia sido descrito uma análise de correlação entre todos esses testes. Foi observado que todos apresentam correlações significativas entre si. A cor arroxeadada indica correlação positiva entre os testes, a cor alaranjada indica correlação negativa. A intensidade da cor indica a força da correlação, quanto mais intensa seja para o roxo ou para o laranja mais forte é a correlação, os valores das correlações estão descritos no Quadro 1.

Figura 10 - Mapa de correlação de Spearman-r entre os testes de variáveis numéricas utilizados nos três grupos (Controle, Diabéticos e Diabéticos com neuropatia).



Fonte: elaboração própria.

Quadro 1 - Valores da correlação entre os testes variáveis numéricas utilizados nos três grupos (Controle, Diabéticos e Diabéticos com neuropatia). Correlação de Spearman (*< 0.05 **< 0.01 ***< 0.001).

	DN4				
Latência Inicial do PSC	0,412**	Latência Inicial do PSC			
Latência Final do PSC	0,295*	0,618***	Latência Final do PSC		
MAX/MIN	0,473***	-0,373***	-0,306*	MAX/MIN	
VIRR	-0,445 ***	-0,322*	-0,324*	0,939***	VIRR
ImageJ	-0,489***	-0,581***	-0,418***	0,505***	0,475***

Fonte: elaboração própria.

Nesse sentido, ainda foi calculada a curva ROC para cada um dos métodos utilizados na HEATMAP de correlação (Figura 14), comparando indivíduos com diabetes e neuropatia e indivíduos saudáveis (Tabela 3). Foi observado que os testes DN4 e Image J (reação colorimétrica da membrana) apresentaram as maiores áreas abaixo da curva, mostrando a alta força desses diagnósticos em separar doentes e saudáveis. Essa correlação entre DN4 e Image J mostra a força em que a dor neuropática está relacionada a alterações da sudorese. Em contrapartida, o teste de Latência Final do PSC apresentou menor área abaixo da curva. Apesar das diferenças entre as forças dos testes diagnósticos pela curva ROC, todos aqueles utilizados no estudo foram significativos, estatisticamente, para diagnosticar neuropatia de fibras finas.

Tabela 3 - Demonstração das áreas abaixo da curva ROC dos testes entre os grupos de Diabéticos com Neuropatia e Indivíduos saudáveis.

Teste	Área abaixo da curva	Valor de P
DN4	0.964	<0.0001
Latência Inicial do PSC	0.903	<0.0001
Latência Final do PSC	0.790	0.0017
MAX/MIN	0.846	0.0002
VIRR	0.818	0.0006
ImageJ	0.939	<0.0001

Fonte: elaboração própria.

De acordo com o mapa de correlação, o DN4 demonstra uma moderada correlação positiva com a latência inicial do PCS. Isto significa que quanto maior a pontuação do DN4 maior a latência inicial do PCS. O DN4 é um escore que associa sintomas e sinais de exame físico que quanto maior a pontuação maior a chance do indivíduo ter dor neuropática, dessa forma, os indivíduos que pontuam igual ou maior que 4 têm dor neuropática (AHO, MUSTONEN, KALSO, HARNO, 2019). O DN4 tem sido amplamente utilizado em vários estudos de NP com diferentes etiologias (ATTAL *et al.*, 2018). A dor neuropática é causada por disfunção das fibras nervosas sensitivas, principalmente fibras finas A delta e tipo C (JENSEN *et al.*, 2011). O PCS

é um reflexo nociceptivo, no qual há uma interrupção momentânea da atividade muscular voluntária após um vigoroso estímulo elétrico no nervo cutâneo periférico (KOFLER, LEIS, VALLS-SOLÉ, 2019). Este período de silêncio elétrico muscular é denominado de PCS. O início da cessação da atividade muscular é latência de início e o retorno da atividade muscular seria a latência final do PSC (ONAL *et al.*, 2010). Este reflexo tem a via aferente composta por fibras finas. Portanto, na vigência de neuropatia de fibras finas pode haver um prolongamento das latências do PSC. Neste caso, de fato, foi observado que quanto maior a pontuação do DN4 maior a latência inicial do PSC. Ambos sugerindo presença de neuropatia de fibras finas somáticas distais.

O DN4 ainda demonstrou uma moderada correlação negativa com imagem J, o que significa que quanto maior a pontuação do DN4, menor sudorese. A interpretação deste resultado faz sentido tendo em vista que ambos os dados sugerem que há uma alteração da função das fibras finas. O DN4 elevado sugere haver dor neuropática, portanto disfunção de fibras finas e redução da sudorese sugere redução da atividade de fibras finas simpáticas que inervam as glândulas sudoríparas. O DN4 demonstrou também uma moderada correlação negativa com a variância do intervalo RR (VIRR), isto significa que quanto maior a pontuação do DN4, menor a VIRR. A redução da VIRR sugere presença de neuropatia autonômica cardíaca (ON *et al.*, 2009), ou seja, comprometimento de fibras finas autonômicas cardíacas. Portanto, o aumento da pontuação do DN4 e a redução da VIRR sugerem a presença de neuropatia de fibras finas. No primeiro caso de fibras finas somáticas e no segundo de fibras finas autonômicas cardíaca.

Foi detectada uma moderada correlação positiva entre Imagem J e VIRR. Isto demonstra que aqueles que apresentaram menor sudorese também apresentaram menor VIRR. Podemos interpretar que ambos os métodos sugerem neuropatia de fibras finas, sendo a membrana indicativa de neuropatia de fibras finas autonômicas distais e VIRR neuropatia de fibras finas autonômica cardíaca. Este dado é interessante pois ambos os métodos avaliam fibras finas autonômicas, porém uma avalia fibras distais e outra fibras cardíacas. No caso dessa alteração em indivíduos diabéticos, acredita-se que a hiperglicemias esteja associada à sinalização anormal de neurônios autônomos via acúmulo de produtos finais de glicação avançada, ativação da via do poliol e atrofia induzida por isquemia das fibras nervosas autonômicas que inervam o tecido cardíaco e vascular (GAEDE *et al.*, 1999).

O ‘image J’ também se correlacionou moderadamente com a latência inicial do PSC, porém desta vez de forma inversa. Os dois métodos avaliam fibras finas distais, porém enquanto o Imagem J avalia fibras finas autonômicas, o PSC avalia fibras finas somáticas. Estes dois métodos se complementam quando queremos avaliar comprometimento de fibras finas somáticas e autonômicas. Além disso, a correlação mais forte apresentada foi a de VIRR com Max/min (0,9399), ambos os testes feitos durante a avaliação de neuropatia autonômica cardíaca.

De uma forma geral foi detectada a correlação entre os métodos, podendo-se inferir que todos os testes utilizados no estudo são úteis para a avaliação de neuropatias de fibras finas. Uns avaliam fibras finas somáticas distais enquanto outros avaliam fibras finais autonômicas. Alguns autores têm ressaltado a importância de associar métodos diferentes para melhorar a acurácia diagnóstica de neuropatias de fibras finas (BLACKMORE; SIDDIQ, 2017; FABRY *et al.*, 2020). Além disso, a presença de neuropatia autonômica cardíaca implica em riscos de morte em pacientes diabéticos. Portanto, a pesquisa de neuropatia autonômica cardíaca deveria ser sempre valorizada para a instituição de medidas preventivas.

5.9 Conclusão

O desenvolvimento de membranas poliméricas de alginato de sódio contendo VAS e CS apresentou-se como um produto promissor para o diagnóstico de neuropatias periféricas. O VAS e o CS apresentaram características adequadas para a produção de membranas com alginato de sódio, por serem atóxicos, biodegradáveis, de baixo custo, e também por terem sido englobados na matriz polimérica. Os resultados apresentados e discutidos com a caracterização das membranas, bem como com a realização do ensaio clínico forneceram informações que possibilitam o uso das membranas desenvolvidas para o auxílio do diagnóstico de neuropatias periféricas de fibras finas.

As análises por DSC demonstraram a interação do VAS e CS com o alginato de sódio, possibilitando a formação das membranas poliméricas. O ensaio de intumescimento evidenciou a capacidade das membranas em reagir com o suor, possibilitando a reação colorimétrica, que evidencia a presença ou ausência de neuropatias. Além disso, esse ensaio demonstrou que o tempo de 15 minutos pode ser utilizado para o diagnóstico. Análises por FTIR-ATR exibiram mudanças nas

bandas de absorção das membranas após a reação colorimétrica que corroboraram com as reações químicas apresentadas pelas membranas após a reação com o suor. A avaliação da irritabilidade pelo ensaio de HET-CAM demonstrou que as membranas não têm potencial de irritação da pele, pois não apresentaram hemorragia, lise ou coagulação.

A partir do ensaio clínico foi observado que as duas membranas obtidas (Memb/VAS e Memb/CS) apresentaram aspectos satisfatórios e devem ser aplicadas em contato uma com a outra, envoltas de adesivo hospitalar que garanta boa adesão à pele. A faixa de reação colorimétrica de 0 - 40%, quantificada pelo Image J, sugere que os indivíduos apresentem possibilidade de exibirem neuropatias periféricas, visto que a sudorese comprometida não possibilitou a mudança de cor da membrana ou possibilitou apenas uma pequena modificação.

Além disso, a análise da curva ROC mostrou que os valores do Image J tiveram maiores áreas abaixo da curva, mostrando sua força diagnóstica em separar doentes e saudáveis. Tanto os resultados do *ImageJ®*, quanto os estudos de condução, tiveram correlação com os testes comparativos para diagnóstico de neuropatia periférica de fibras finas aplicados durante o ensaio clínico, inclusive com sinais de severidade da neuropatia, reforçando a qualidade do teste desenvolvido a partir das membranas.

Os resultados apresentados e discutidos com a caracterização das membranas, bem como com a realização do ensaio clínico forneceram informações que possibilitam a utilização das membranas desenvolvidas para o auxílio do diagnóstico de neuropatias periféricas de fibras finas com um teste rápido, prático e facilmente reproduzível.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento das membranas poliméricas de alginato de sódio deste estudo apresentou-se como um produto útil para o diagnóstico de neuropatias periféricas. A quantificação da reação colorimétrica por meio do software *ImageJ®* permitiu mensurar o percentual de reação, atestando as alterações no padrão de sudorese, indicando presença de neuropatia de fibras finas. As análises da curva ROC demonstraram a força desse teste em separar doentes e saudáveis.

Com os resultados apresentados e discutidos com a caracterização das membranas, bem como com a realização do ensaio, pode-se inferir que o produto em questão foi preparado, caracterizado e avaliado quanto ao seu efeito diagnóstico para evidenciar a presença de neuropatias. Trata-se de um produto biodegradável, de baixo custo, de fácil aplicação e eficaz para auxiliar no diagnóstico rápido de neuropatias periféricas sem apresentar desconforto aos pacientes, diferenciando-se dos demais testes existentes.

O produto desenvolvido nessa pesquisa pode ser considerado promissor, pois além de contribuir para a prática clínica, possui uma relevância social, no sentido de poder tornar-se público e acessível, devido ao baixo custo e capacidade de reproduzibilidade, podendo assim, futuramente, ser aplicado em consultórios de neurologistas e endocrinologistas, bem como por profissionais da estratégia de saúde da família, como um teste de triagem para os indivíduos com diabetes mellitus, identificando precocemente sinais de neuropatia, reduzindo as complicações comumente apresentadas por essa condição ainda tão vigente.

Contudo, torna-se necessário a continuidade de ensaios clínicos, com o objetivo de avaliar um maior número de pacientes para a obtenção de dados mais robustos, que garantam a total eficácia e segurança da utilização dessas membranas poliméricas, buscando entender também a eficácia desse teste para a pesquisa de neuropatia autonômica cardíaca, considerada uma neuropatia de fibras finas bastante grave.

Além disso, deve-se levar em consideração o desenvolvimento de ferramentas para auxiliar no diagnóstico e praticidade da utilização desse produto, como por exemplo o desenvolvimento de um aplicativo para *smartphones* que possibilite a rápida quantificação da reação colorimétrica após a captura da fotografia das membranas. Tudo isso deve ser realizado por meio de parcerias e planejamentos

concretos, com o intuito de otimizar a utilização desse produto farmacêutico oportuno e vantajoso para o diagnóstico de neuropatias periféricas.

Para reduzir os fatores limitantes da produção e reprodutibilidade desse produto, o estudo em questão tem perspectivas para sua continuidade através de duas teses de doutorado, uma delas com o objetivo de desenvolver um aplicativo, que englobe as funções do image J, conseguindo quantificar em tempo real a reação colorimétrica da membrana. E com o objetivo de ampliar o ensaio clínico e aprimorar as questões relacionadas a produção, reprodutibilidade e inserção do teste no mercado farmacêutico.

REFERÊNCIAS

- AHO, T.; MUSTONEN, L.; KALSO, E. *et al.* Douleur Neuropathique 4 (DN4) stratifies possible and definite neuropathic pain after surgical peripheral nerve lesion. **European Journal of Pain**, v. 24, n. 2, p. 413-422, 2020. Disponível: <https://doi.org/10.1002/ejp.1498>. Acesso em: 15 jan. 2020.
- ALTUN, A.; TURGUT N.; TATLI E. *et al.* Sympathetic skin response and RR interval variation in patients with cardiac syndrome X. **Angiology**, v. 58, n. 6, p.747-50, 2008. Disponível: <https://doi.org/10.1177/0003319707309117>. Acesso em: 30 nov. 2020.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 35, n. 1, p.11–63. Disponível: <https://doi.org/10.2337/dc12-s011>. Acesso em: 20 dez. 2019.
- ATTAL, N.; BOUHASSIRA, D.; BARON, R. Diagnosis and assessment of neuropathic pain through questionnaires. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 5, p. 456-466, maio 2018. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(18\)30071-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(18)30071-1). Acesso em: 15 jan. 2020.
- BAHRAMI, Z.; AKBARI, A.; EFTEKHARI-SIS, B. Double network hydrogel of sodium alginate/polyacrylamide cross-linked with POSS: Swelling, dye removal and mechanical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, n. 187-197, maio 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.046>. Acesso em: 1 maio 2020.
- BATISTA-DUHARTE, A; JORGE MURILLO, G.; PÉREZ, U. M. *et al.* The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane: An Alternative Assay for the Assessment of the Irritating Effect of Vaccine Adjuvants. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 627-633, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/173867>. Acesso em: 10 set. 2020.
- BENDER, C.; PARTECKE, L.; KINDEL, E. *et al.* The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. **Toxicology In Vitro**, v. 25, n. 2, p. 530-537, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.11.012>. Acesso em: 30 nov. 2020.
- BENNETT, D.L.H.; GROVES, M.; BLAKE, J. *et al.* The use of nerve and muscle biopsy in the diagnosis of vasculitis: a 5 year retrospective study. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 79, n.12, p.1376-81, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.2008.151126>. Acesso em: 30 set. 2020.
- BENNETT, M. I.; ATTAL. N.; BACKONJA, M. M. *et al.* Using screening tools to identify neuropathic pain. **Pain**, v. 127, n. 3, p.199-203, fev. 2007. Disponível em: [10.1016 / j.pain.2006.10.034](https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.10.034). Acesso em: 30 nov. 2019.
- BILGAINYA, R.; KHAN, F.; MANN, S. Spontaneous patterning and nanoparticle encapsulation in carboxymethylcellulose/alginate/dextran hydrogels and sponges.

Materials Science and Engineering C Mater Biol Appl, v. 30, n. 3, p. 352-356, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.11.010>. Acesso em: 15 fev. 2020.

BLACKMORE, D; SIDDIQI, Z A. Pinprick Testing in Small Fiber Neuropathy. **Journal of Clinical Neuromuscular Disease**, v. 17, n. 4, p.181–186, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/cnd.0000000000000116>. Acesso em: 15 out. 2020.

BLACKMORE, D.; SIDDIQI, Z. A. Diagnostic Criteria for Small Fiber Neuropathy. **Journal of Clinical Neuromuscular Disease**, v. 18, n. 3, p.125–131, 2017. Disponível em:<http://dx.doi.org/10.1097/cnd.0000000000000154>. Acesso em: 10 abr. 2020.

BOULTON, A.J.; VINIK, A.I.; AREZZO, J.C. *et al.* Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 28, n. 4, p. 956– 962, 2005. Disponível em: [10.2337/diacare.28.4.956](https://doi.org/10.2337/diacare.28.4.956). Acesso em: 12 ago. 2020.

CABEZAS-CERRATO, J. The prevalence of clinical diabetic polyneuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. Neuropathy Spanish Study Group of the Spanish Diabetes Society (SDS). **Diabetologia**, v. 41, n. 11, 1263–9, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s001250051063>. Acesso em: 3 jun. 2020.

CALLAGHAN, B. C.; CHENG, H. T.; STABLES, C. L. *et al.* Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 6, p. 521-534, jun. 2012. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(12\)70065-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(12)70065-0). Acesso em: 13 out. 2020.

CASELLINI, C. M.; PARSON, H. K.; RICHARDSON, M. S. *et al.* Sudoscan, a Noninvasive Tool for Detecting Diabetic Small Fiber Neuropathy and Autonomic Dysfunction. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 15, n. 11, p. 948-953, nov. 2013. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1089/dia.2013.0129>. Acesso em: 25 ago. 2020.

CASTRO, T. C. de. **Avaliação da resistência ao esmagamento do silicone submetido à ação do suor superficial**. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2008.

CAZZATO, D; CASTORI, M; LOMBARDI, R; *et al.* Small fiber neuropathy is a common feature of Ehlers–Danlos syndromes. **Neurology**, v. 87, n. 2 p. 155–59, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002847>. Acesso em: 10 abr. 2020.

CRUCCU, G.; SOMMER, C.; ANAND, P.; *et al.* EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. **European Journal Of Neurology**, v. 17, n. 8, p. 1010-1018, 8 mar. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.02969.x>. Acesso em: 22 maio 2020.

DATEMA, M.; VAN DIJK, J. Gert; HOITSMA, E. The diagnostic value of water immersion skin wrinkling and Neuropads® in small fiber neuropathy. **Clinical Neurophysiology**, v. 123, n. 10, p. 2074-2079, out. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2012.01.026>. Acesso em: 13 out. 2020.

DEVIGILI, G.; TUGNOLI, V.; PENZA, P. *et al.* The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology. **Brain**, v. 131, n. 7, p. 1912-1925, 4 jun. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awn093>. Acesso em: 13 jun. 2020.

ENGLAND, J. D.; GRONSETH, G. S.; FRANKLIN, G. *et al.* Practice Parameter: evaluation of distal symmetric polyneuropathy. **Neurology**, v. 72, n. 2, p. 185-192, 3 dez. 2008. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000336370.51010.a1>. Acesso em: 20 out. 2019.

ESTELA, J. M.; CARO, A.; FORTEZA, R. *et al.* Kinetic determination of manganese by its catalytic effect on the oxidation of Alizarin S by hydrogen peroxide. **Thermochimica Acta**, v. 200, p. 467-474, jul. 1992. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0040-6031\(92\)85138-I](http://dx.doi.org/10.1016/0040-6031(92)85138-I). Acesso em: 20 out. 2019.

FABRY, V.; GERDELAT, A.; ACKET, B. *et al.* Which Method for Diagnosing Small Fiber Neuropathy? **Frontiers in Neurology**, v. 11, p. 1-9, 5 mai. 2020 Disponível em: [doi:10.3389/fneur.2020.00342](https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00342). Acesso em: 20 out. 2020.

FÉLIX, E. P. V.; OLIVEIRA, A. de S. B. Diretrizes para abordagem diagnóstica das neuropatias em serviço de referência em doenças neuromusculares. **Revista Neurociências**, v. 18, n. 1, p. 74-80, 31 mar. 2001. Disponível: <http://dx.doi.org/10.34024/rnc.2010.v18.8506>. Acesso em: 15 nov. 2019.

FLORES, S.; DAVIS, M. D. P.; PITTELKOW, M. R. *et al.* Abnormal sweating patterns associated with itching, burning and tingling of the skin indicate possible underlying small-fibre neuropathy. **British Journal Of Dermatology**, v. 172, n. 2, p. 412-418, 18 jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/bjd.13576>. Acesso em: 22 maio 2020.

GATEV, T.; GATEVA, A.; ASSYOV, Y., *et al.* The role of Sudoscan feet asymmetry in the diabetic foot. **Primary Care Diabetes**, p. 1-6, 12 mai. 2019 Disponível em: [doi:10.1016/j.pcd.2019.05.003](https://doi.org/10.1016/j.pcd.2019.05.003). Acesso em: 5 jan. 2020.

GERAWARAPONG, C. Association of Peripheral Autonomic Neuropathy and Sympathetic Skin Response in the Patients with Diabetic Polyneuropathy: A Pilot Study in Thailand. **Journal Medical Association of Thailand**, v. 98, n.12, p.1222-30, dez. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27004308/>. Acesso em: 20 ago. 2020.

GONDIM, F. A. A.; OLIVEIRA, I. S. C.; ARAÚJO, D. F. *et al.* Fenótipos Raros de Neuropatia Hereditária. **Revista Neurociências**, v. 22, n. 1, p. 84-94, 31 mar. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.34024/rnc.2014.v22.8121>. Acesso em: 15 maio 2020.

GUIMARÃES, J.; SILVEIRA, F. Abordagem diagnóstica das neuropatias periféricas. **Acta Med Port**, v. 21, p. 83-88, 2008. Disponível em: <https://actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/download/759/436>. Acesso em: 15 jan. 2020.

HASANI-SADRABADI, M. M.i; MOKARRAM, N.; AZAMI, M. et al. Preparation and characterization of nanocomposite polyelectrolyte membranes based on Nafion® ionomer and nanocrystalline hydroxyapatite. **Polymer**, v. 52, n. 5, p. 1286-1296, mar. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2010.11.033>. Acesso em: 15 jan. 2020.

HOITSMA, E.; REULEN, J.P.H.; BAETS, M. de et al. Small fiber neuropathy: a common and important clinical disorder. **Journal Of The Neurological Sciences**, v. 227, n. 1, p. 119-130, dez. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2004.08.012>. Acesso em: 10 jun. 2020.

ILLIGENS, B. M. W.; GIBBONS, C. H. Sweat testing to evaluate autonomic function. **Clinical Autonomic Research**, v. 19, n. 2, p. 79-87, 6 nov. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10286-008-0506-8>. Acesso em: 15 jan. 2020.

ISHIKAWA, M.; TAKASE, M.; NAMIKI, J. et al. Silent Period in the Mentalis Muscle Induced by Facial Nerve and Cutaneous Stimulation. **Journal Of Clinical Neurophysiology**, v. 18, n. 4, p. 386-392, jul. 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/00004691-200107000-00011>. Acesso em: 13 out. 2020.

JENSEN, T. S.; BARON, R.; HAANPÄÄ, M. et al. A new definition of neuropathic pain. **Pain**, v. 152, n. 10, p. 2204-2205, out. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.06.017>. Acesso em: 10 jun. 2020.

KAMEL, J.T.; VOGRIN, S.J.; KNIGHT-SADLER, R.J. et al. Combining cutaneous silent periods with quantitative sudomotor axon reflex testing in the assessment of diabetic small fiber neuropathy. **Clinical Neurophysiology**, v. 126, n. 5, p. 1047-1053, maio 2015. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2014.09.011>. Acesso em: 15 jan. 2020.

KIMURA, J.H.T; MASSETER, other reflexes. In: Kimura J, ed. **Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice**. Philadelphia: Davis, 1989:356-74.

KOFLER, M.; LEIS, A. A.; VALLS-SOLÉ, J. Cutaneous silent periods – Part 1: update on physiological mechanisms. **Clinical Neurophysiology**, v. 130, n. 4, p. 588-603, abr. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2019.01.002>. Acesso em: 13 out. 2020.

KOYTAK, P. K.; ISAK, B.; BORUCU, D. et al. Assessment of symptomatic diabetic patients with normal nerve conduction studies: utility of cutaneous silent periods and autonomic tests. **Muscle Nerve**, v. 43, n. 3, p. 317-323, 14 fev. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/mus.21877>. Acesso em: 01 dez. 2020.

KRAYCHETE, D. C.; GOZZANI, J. L.; KRAYCHETE, A. C. Dor neuropática: aspectos neuroquímicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n. 5, p. 492-505, out. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-70942008000500008>. Acesso em: 01 dez. 2020.

KRAYCHETE, D. C.; SAKATA, R. K. Neuropatias periféricas dolorosas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 5, p. 649-658, out. 2011. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-70942011000500014>. Acesso em: 10 1 dez. 2019.

KUMAR, P.; SAKLA, R.; GHOSH, A. *et al.* Reversible Colorimetric Sensor for Moisture Detection in Organic Solvents and Application in Inkless Writing. **AcS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 30, p. 25600-25605, jul. 2017. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.7b05335>. Acesso em: 5 fev. 2020.

LAHRMANN, H.; ROCHA, I.; STRUHAL, W. *et al.* Diagnosing Autonomic Nervous System Disorders - Existing Guidelines and Future Perspectives. **European Neurological Review**, v. 6, n. 1, p. 52-56, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.17925/enr.2011.06.01.52>. Acesso em: 10 mar. 2020

LAHRMANN, H.; MAGNIFICO, F.; HAENSCH, C. A. *et al.* Autonomic nervous system laboratories: a european survey. **European Journal Of Neurology**, v. 12, n. 5, p.375 -379, maio 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-1331.2004.01114.x>. Acesso em: 15 jan. 2020.

LAURIA, G.; DEVIGILI, Grazia. Skin biopsy as a diagnostic tool in peripheral neuropathy. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 3, n. 10, p. 546-557, out. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/hcpneuro0630>. Acesso em: 10 jun. 2020.

LAURIA, G.; HSIEH, S. T.; JOHANSSON, O. *et al.* European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve. **European Journal Of Neurology**, v. 17, n. 7, p. 903-912, 21 jun. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03023.x>. Acesso em: 15 jan. 2020.

LAWSON, V. H.; GREWAL, J.; HACKSHAW, K. V. *et al.* Fibromyalgia syndrome and small fiber, early or mild sensory polyneuropathy. **Muscle & Nerve**, v. 58, n. 5, p. 625-630, 26 abr. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/mus.26131>. Acesso em: 22 maio 2020.

LOW, P. A. Evaluation of sudomotor function. **Clinical Neurophysiology**, v. 115, n. 7, p. 1506-1513, jul. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2004.01.023>. Acesso em: 15 jan. 2020.

LIMA, B. dos S. **Estudos de liberação, permeação, adesão e estabilidade de membranas de gelatina contendo ácido úsnico na forma lipossomal para o tratamento de queimaduras**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Núcleo de Pós Graduação em Ciências da Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe, São Cristivão, 2017.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food And Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, fev. 1985. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90030-4](http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915(85)90030-4). Acesso em: 13 out. 2020.

MASER, R. E.; MITCHELL, B. D.; VINIK, A. I.; FREEMAN, R. The Association Between Cardiovascular Autonomic Neuropathy and Mortality in Individuals With Diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 26, n. 6, p. 1895-1901, 1 jun. 2003. American Diabetes Association. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.26.6.1895>. Acesso em: 13 out. 2020.

MYGLAND, Å. Approach to the patient with chronic polyneuropathy. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 115, n. 187, p. 15-21, maio 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00841.x>. Acesso em: 22 maio 2020.

NEVES, E. L. de A.; KOK, F. Clinical and neurophysiological investigation of a large family with dominant Charcot-Marie-Tooth type 2 disease with pyramidal signs. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 69, n. 3, p. 424-430, jun. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-282x2011000400003>. Acesso em: 13 out. 2020.

NOVAK, V.; FREIMER, M. L.; KISSEL, J. T. *et al.* Autonomic impairment in painful neuropathy. **Neurology**, v. 56, n. 7, p. 861-868, 10 abr. 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.56.7.861>. Acesso em: 10 jun. 2020.

NOVAK, P. Electrochemical skin conductance: a systematic review. **Clinical Autonomic Research**, v. 29, n. 1, p. 17-29, 26 set. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10286-017-0467-x>. Acesso em: 10 mar. 2020.

NUNES, P. S.; RABELO, A. S.; SOUZA, J. C. C. *et al.* Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1-2, p. 473-482, nov. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.040>. Acesso em: 15 jan. 2020.

ON, A.; KARAPOLAT, H.; ZOGHI, M. *et al.* Analysis of Heart Rate Variability with Electromyography in Heart Transplant Recipients. **Archives Of Physical Medicine And Rehabilitation**, v. 90, n. 9, p. 1635-1638, set. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apmr.2009.03.012>. Acesso em: 22 maio 2020.

ONAL, M. R.; ULAS, U. H.; OZ, O. *et al.* Cutaneous silent period changes in Type 2 diabetes mellitus patients with small fiber neuropathy. **Clinical Neurophysiology**, v. 121, n. 5, p. 714-718, maio 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2009.12.024>. Acesso em: 10 jun. 2020.

OWENS, E.G; YOE, J.H; Derivatives of 1,4-dihydroxyantraquinone as metal indicators in the titration of thorium with disodium EDTA. **Analytica Chimica Acta**, v.23, p.321-324, 1960.

PARISSAKIS, G.; KONTOYANNAKOS, J. Structure of the zirconium-alizarin s complex in relation to pH changes. **Analytica Chimica Acta**, v. 29, p. 220-226, jan. 1963. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0003-2670\(00\)88607-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0003-2670(00)88607-9). Acesso em: 10 abr. 2020.

PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 323, n. 1-2, p. 34-42, out. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.05.054>. Acesso em: 10 jun. 2020.

POP-BUSUI, R.; BOULTON, A. J. M.; FELDMAN, E. L. *et al.* Diabetic Neuropathy: a position statement by the american diabetes association. **Diabetes Care**, v. 40, n. 1, p. 136-154, dez. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2337/dc16-2042>. Acesso em: 22 maio 2020.

PROVITERA, V.; NOLANO, M.; CAPORASO, G. *et al.* Evaluation of sudomotor function in diabetes using the dynamic sweat test. **Neurology**, v. 74, n. 1, p. 50-56, dez. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.0b013e3181c7da4b>. Acesso em: 10 mar. 2020.

RIBEIRO, G. S.; NEVES, V. R.; DERESZ, L. F. *et al.* Can RR intervals editing and selection techniques interfere with the analysis of heart rate variability? **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 22, n. 5, p. 383-390, set. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjpt.2018.03.008>. Acesso em: 13 out. 2020.

SABNIS, R.W. **Handbook of Acid-Base Indicators**. Flórida: CRC Press, 2007.

SANTOS JÚNIOR, A. F.; KORN, M. G. A.; JAEGER, H. V.; *et al.* Determinação de Mn, Cu e Zn em matrizes salinas após separação e pré-concentração usando Amberlite XAD-7 impregnada com Vermelho de Alizarina S. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1086-1090, dez. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000700008>. Acesso em: 22 maio 2020.

SANTOS-JÚNIOR, A. de F. **Potencialidades do vermelho de alizarina S impregnado em resinas para separação e pré-concentração de Cu, Zn e Mn em matrizes salinas**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

SANTO, V. E.; GOMES, M. E.; MANO, J. F. *et al.* Chitosan-chondroitin sulphate nanoparticles for controlled delivery of platelet lysates in bone regenerative medicine. **Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, v. 6, n. 3, p. s47-s59, jun. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/term.1519>. Acesso em: 10 nov. 2019.

SAXENA, R.; SINGH, A. K.; SAMBI, S. S. Synthesis of a chelating polymer matrix by immobilizing Alizarin Red-S on Amberlite XAD-2 and its application to the preconcentration of lead (II), cadmium (II), zinc(II) and nickel(II). **Analytica Chimica Acta**, v. 295, n. 1-2, p. 199-204, set. 1994. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)80351-x](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(94)80351-x). Acesso em: 15 jan. 2020.

SCHUBERT, M.; BERLI, M. Diabetischer Fuss - eine Frage der Nerven? **Fuß & Sprunggelenk**, v. 16, n. 2, p. 90-98, jun. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuspru.2018.03.003>. Acesso em: 10 jun. 2020.

SÈNE, D. Small fiber neuropathy: diagnosis, causes, and treatment. Joint **Bone Spine**, v. 85, n. 5, p. 553-559, out. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2017.11.002>. Acesso em: 10 mar. 2020.

SHIVAPRASAD, C.; AMIT, G.; ANISH, K. *et al.* Clinical correlates of sudomotor dysfunction in patients with type 2 diabetes and peripheral neuropathy. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 139, p. 188-194, maio 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2018.03.004>. Acesso em: 15 jan. 2020.

SHAH, M. H.; PARADKAR, A. Effect of HLB of additives on the properties and drug release from the glyceryl monooleate matrices. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 166-174, ago. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.01.001>. Acesso em: 10 jun. 2020.

SHAH, A. S.; GHORMLI, L. EI; VAJRAVELU, M. E. *et al.* Heart Rate Variability and Cardiac Autonomic Dysfunction: prevalence, risk factors, and relationship to arterial stiffness in the treatment options for type 2 diabetes in adolescents and youth (today) study. **Diabetes Care**, v. 42, n. 11, p. 2143-2150, 9 set. 2019. American Diabetes Association. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2337/dc19-0993>. Acesso em: 10 nov. 2020.

SINGH, H. B.; BHARATI, K. A. **Handbook of Natural Dyes and Pigments**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014.

SHY, M. E.; LUPSKI, J. R.; CHANCE, P. F. *et al.* Hereditary Motor and Sensory Neuropathies: an overview of clinical, genetic, electrophysiologic, and pathologic features. **Peripheral Neuropathy**, p. 1623-1658, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-7216-9491-7.50072-7>. Acesso em: 10 nov. 2019.

SIEPMANN, T.; PENZLIN, A. I.; ILLIGENS, B. M.-W. *et al.* Should Skin Biopsies Be Performed in Patients Suspected of Having Parkinson's Disease? **Parkinson'S Disease**, v. 2017, p. 1-6, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/6064974>. Acesso em: 22 maio 2020.

SLOAN, G.; SHILLO, P.; SELVARAJAH, D. *et al.* A new look at painful diabetic neuropathy. **Diabetes Research And Clinical Practice**, v. 144, p. 177-191, out. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2018.08.020>. Acesso em: 15 jan. 2020.

SMITH, A. G.; SINGLETON, J. R. Diabetic Neuropathy. **Continuum: Lifelong Learning in Neurology**, v. 18, p. 60-84, fev. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1212/01.con.0000411568.34085.3e>. Acesso em: 10 abr. 2020.

SMITHA, B.; SRIDHAR, S.; KHAN, A. A. Chitosan–sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 8, p. 1859-1866, ago. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.02.018>. Acesso em: 1 jul. 2020.

STOJKOVIC, T. Les neuropathies périphériques: orientations et moyens diagnostiques. **La Revue de Médecine Interne**, v. 27, n. 4, p. 302-312, abr. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2005.10.018>. Acesso em: 10 jun. 2020.

SZTANEK, F.; BALOGH, B.; MOLNÁR, Á.; ZÖLD, E. et al. A diabeteses neuropathia és egyéb szövődmények előfordulása a Debreceni Egyetem Diabeteses Neuropathia Centrumában. **Orvosi Hetilap**, v. 161, n. 30, p. 1243-1251, jul. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2020.31799>. Acesso em: 22 maio 2020.

TENTOLOURIS, N.; ACHTSIDIS, V.; MARINOU, K. et al. Evaluation of the Self-Administered Indicator Plaster Neuropad for the Diagnosis of Neuropathy in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 31, n. 2, p. 236-237, nov. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2337/dc07-1942>. Acesso em: 1 jul. 2020.

TALEB, M. F. A.; ALKAHTANI, A.; MOHAMED, S. K.. Radiation synthesis and characterization of sodium alginate/chitosan/hydroxyapatite nanocomposite hydrogels: a drug delivery system for liver cancer. **Polymer Bulletin**, v. 72, n. 4, p. 725-742, jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00289-015-1301-z>. Acesso em: 10 nov. 2019.

TESFAYE, S.; CHATURVEDI, N.; EATON, S. E. M. et al. Vascular Risk Factors and Diabetic Neuropathy. **New England Journal Of Medicine**, v. 352, n. 4, p. 341-350, jan. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa032782>. Acesso em: 10 abr. 2020.

TRUINI, A.; CRUCCU, G.; GARCIA-LARREA, L. G-L. Painful sensory neuropathy. **N Engl J Med**, v.349, n. 3, p.306-7, Jul 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12870463/>. Acesso em: 15 jan. 2020.

TRUINI, A.; SPALLONE, V.; MORGANTI, R. et al. A cross-sectional study investigating frequency and features of definitely diagnosed diabetic painful polyneuropathy. **Pain**, v. 159, n. 12, p. 2658-2666, dez. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001378>. Acesso em: 10 mar. 2020.

VALLAT, J.-M.; MAGY, L. Neuropathies périphériques: généralités. **Emc - Neurologie**, v. 2, n. 2, p. 175-181, maio 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.emcn.2004.09.004>. Acesso em: 15 jan. 2020.

VINIK, A. I.; NEVORET, M.-L.; CASELLINI, C. et al. Diabetic Neuropathy. **Endocrinology And Metabolism Clinics Of North America**, v. 42, n. 4, p. 747-787, dez. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2013.06.001>. Acesso em: 22 maio 2020.

VINIK, A. I.; NEVORET, M-L.; CASELLINI, C. The New Age of Sudomotor Function Testing: a sensitive and specific biomarker for diagnosis, estimation of severity, monitoring progression, and regression in response to intervention. **Frontiers In Endocrinology**, v. 6, p. 1-12, jun. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2015.00094>. Acesso em: 10 jun. 2020.

VINIK, A. I.; STROTMEYER, E. S.; NAKAVE, A. A. *et al.* Diabetic Neuropathy in Older Adults. **Clinics In Geriatric Medicine**, v. 24, n. 3, p. 407-435, ago. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cger.2008.03.011>. Acesso em: 15 jan. 2020.

VINIK, A.; ULLAL, J.; PARSON, H. K; *et al.* Diabetic neuropathies: clinical manifestations and current treatment options. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**, v. 2, n. 5, p. 269-281, maio 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ncpendmet0142>. Acesso em: 10 mar. 2020.

WELCHER. F. J. **Organic Analytical Reagents**, v. 4, 3st ed., 624 pgs. USA, 1948.

YAMAN, M.; ULUDÜZ, D.; YÜKSEL, Ş. *et al.* The cutaneous silent period in diabetes mellitus. **Neuroscience Letters**, v. 419, n. 3, p. 258-262, jun. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2007.04.018>. Acesso em: 15 jan. 2020.

ANEXO A - Douleur neuropathique 4 questions (DN4)

Nome do paciente: _____ Data: ____/____/____

Queixa: _____

Questionário de Avaliação de Dor Neuropática - DN4¹

Por favor, complete este questionário marcando a resposta de cada item das questões abaixo.

Questões	SIM	NÃO
1. A dor que seu paciente sente tem uma ou mais das seguintes características?		
1 Frio doloroso?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2 Queimação?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3 Choque elétrico?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. A dor está associada a um ou mais dos seguintes sintomas na mesma área?		
4 Formigamento?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5 Agulhada e alfinetada?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6 Adormecimento?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7 Coceira?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

EXAME DO PACIENTE

3. A dor está localizada em uma área em que o exame físico pode revelar uma ou mais das seguintes características?		
8 Hipoestesia ao toque?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9 Hipoestesia a uma picada de agulha?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Na área dolorosa, a dor pode ser causada ou aumentada por:		
10 toque por um pincel?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

RESULTADO: 1 ponto para cada SIM / 0 ponto para cada NÃO

Se o TOTAL DE SIM for igual ou maior que 4, o teste é positivo para DOR NEUROPATHICA (sensibilidade 82,9% e especificidade 89,9%)

Referência Bibliográfica: 1. Bouhassira D, Attal N, Alchaar H et al. Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain* 2005; 114(1-2): 29-36

ANEXO B - Parecer Consustanciado do CEP

UFS - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE



PARECER CONSUSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MEMBRANA PARA AUXÍLIO NO DIAGNÓSTICO DE NEUROPATHIA PERIFÉRICA DE FIBRAS FINAS

Pesquisador: Déborah Danielle Tertuliano Marinho e Albuquerque

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 82894118.1.0000.5546

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.587.622

Apresentação do Projeto:

O Projeto pretende estudar a hipótese de que a membrana de alizarina avalie com sucesso a função sudomotora e autonômica de membros inferiores, indicando assim a presença ou ausência da neuropatia periférica de fibras finas em indivíduos normais e doentes.

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar o efeito diagnóstico das membranas de vermelho de alizarina (VAS) e carbonato de sódio (CS), em pacientes com Neuropatias Periféricas.

Objetivos Secundários:

- Desenvolver uma membrana contendo o reagente colorimétrico vermelho de alizarina (VAS) e carbonato de sódio (CS).- Realizar revisão sistemática sobre as formas diagnósticas para neuropatias periféricas de fibras finas.- Testar quantidades distintas de Vermelho de alizarina (VAS) e carbonato de sódio (CS) na preparação das membranas a fim de obter a quantidade suficiente do reagente para diagnosticar as alterações de sudorese em pacientes com neuropatias.- Caracterizar fisico-quimicamente a membrana desenvolvida utilizando métodos termoanalíticos, microscópicos e espectroscópicos.- Identificar sinais e sintomas atualmente apresentados, tempo da doença e exames diagnósticos já utilizados antes da aplicação do teste diagnóstico.- Comparar a ação diagnóstica da membrana de Vermelho de

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cephu@ufs.br

Continuação do Parecer: 2.587.622

alizarina (VAS) e carbonato de sódio (CS) em três grupos: pacientes diabéticos sem neuropatias, pacientes diabéticos com neuropatias periféricas e pessoas que não apresentam a patologia.- Comparar os resultados dos testes das membranas de Vermelho de alizarina (VAS) e carbonato de sódio (CS), com os resultados de Eletroneuromiografia, Instrumento Validado para Dor Neuropática (DN4), Neuropathy Disability Scale (NDS) e o Período Silent.- Avaliar a reação colorimétrica através de registros fotográficos, utilizando o Image J.- Verificar a sensibilidade, especificidade, precisão, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste com membrana de Vermelho de alizarina (VAS) e carbonato de sódio (CS).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresentados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa contará com indivíduos atendidos na Clínica de Neurologia e Eletrofisiologia do Centro de Saúde, Prof. Dr. José Augusto Barreto com suspeita de Neuropatias Periféricas de Membros Inferiores. A população inicial será composta por indivíduos sem neuropatias, para analisar o comportamento padrão de ação da membrana. Na segunda Etapa a população será composta por todos os pacientes atendidos na Clínica de Neurologia e Eletrofisiologia do referido Centro de Saúde, no período de Fevereiro à Maio de 2018 com suspeita de Neuropatias Periféricas de Membros Inferiores diabéticos e não diabéticos e com controles saudáveis selecionados aleatoriamente. Os participantes serão submetidos à anamnese e exame físico e eletroneuromiografia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados, no entanto, o orçamento não apresenta a especificação do custeio.

Recomendações:

Recomendamos sempre especificar o custeio por itens.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplicam.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº	CEP: 49.060-110
Bairro: Sanatório	
UF: SE	Município: ARACAJU
Telefone: (79)3194-7208	E-mail: cephu@ufs.br

**UFS - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE**



Continuação do Parecer: 2.587.622

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_1067021.pdf	26/03/2018 10:54:07		Aceito
Cronograma	cronograma2_comite.pdf	26/03/2018 10:51:14	Déborah Danielle Tertulliano Marinho e Albuquerque	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto2_comite.pdf	26/03/2018 10:49:25	Déborah Danielle Tertulliano Marinho e Albuquerque	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2_comite.pdf	26/03/2018 10:48:43	Déborah Danielle Tertulliano Marinho e Albuquerque	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_neuropatias001.pdf	29/01/2018 16:31:04	Déborah Danielle Tertulliano Marinho	Aceito
Outros	termo_de_anuencia.jpg	26/01/2018 19:48:56	Déborah Danielle Tertulliano Marinho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACAJU, 09 de Abril de 2018

Assinado por:
Anita Hermínia Oliveira Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº	CEP: 49.060-110
Bairro: Sanatório	
UF: SE	Município: ARACAJU
Telefone: (79)3194-7208	E-mail: cephu@ufs.br

ANEXO C – Pedido Nacional de Registro de Patente



11/10/2019

870190102435

14:48



29409161909435790

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 021432 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 13031547000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária,"Prof. José Aloísio de Campos", Bairro Rosa Elze

Cidade: São Cristovão

Estado: SE

CEP: 49100000

País: Brasil

Telefone: (79) 3194-6865

Fax:

Email: cinttec.ufs@gmail.com

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 11/10/2019 às 14:48, Petição 870190102435

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de MEMBRANAS POLIMÉRICAS CONTENDO INDICADOR
Utilidade (54): COLORIMÉTRICO PARA AUXILIAR O DIAGNÓSTICO DE
NEUROPATIAS PERIFÉRICAS

Resumo: O presente pedido de patente de invenção consiste de membranas poliméricas de alginato de sódio contendo vermelho de alizarina S e carbonato de sódio destinadas à auxiliar no diagnóstico de neuropatias periféricas de fibras finas, com conforto aos pacientes que necessitam de diagnóstico rápido e menos doloroso. Trata-se de um produto de baixo custo e sobretudo, mais confortável ao paciente do que os testes existentes atualmente, podendo ser comercializado por empresas do setor farmacêutico.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 11/10/2019 às 14:48, Petição 870190102435

Dados do Inventor (72)**Inventor 1 de 9**

Nome: ADRIANO ANTUNES DE SOUZA ARAÚJO

CPF: 83134948400

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Melício Machado, Cond. Maria Rezende Machado, 4000, Casa 08, Lote 21, Aracaju-SE Bairro: Aruana

Cidade: ARACAJU

Estado: SE

CEP: 49000-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 9

Nome: DÉBORAH DANIELLE TERTULIANO MARINHO E ALBUQUERQUE

CPF: 05240828474

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Av. Oceânica, 2261, BL A – 102 Bairro: Coroa do Meio

Cidade: ARACAJU

Estado: SE

CEP: 49035-655

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 9

Nome: BRUNO DOS SANTOS LIMA
CPF: 04472511550
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Doutorando
Endereço: Rua Abdon Pinto Monteiro, 578, Itabaiana-SE Bairro: Rotary
Cidade: ITABAIANA
Estado: SE
CEP: 49506-195
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email:

Inventor 4 de 9

Nome: MARIA JOSELI MELO DE JESUS
CPF: 04893339583
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Mestrando
Endereço: Rua Rafael de Aguiar 1430, bloco caxagós, apartamento: 402.
Bairro: Pereira Lobo
Cidade: ARACAJU
Estado: SE
CEP: 49050-660
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email:

Inventor 5 de 9

Nome: EDUARDO LUIS DE AQUINO NEVES
CPF: 51783053534
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Rua; José Oliva Nascimento. N 84. Ap 804 Bairro: Jardins
Cidade: ARACAJU
Estado: SE
CEP: 49025-730
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email:

Inventor 6 de 9

Nome: IGOR ARAÚJO SANTOS TRINDADE
CPF: 06304828535
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Estudante de Graduação
Endereço: Rua Anatólio Garcia Moreno, 24 Bairro: Industrial
Cidade: ARACAJU
Estado: SE
CEP: 49065-100
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email:

Inventor 7 de 9

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 11/10/2019 às 14:48, Petição 870190102435

Nome: CAIO DE ALCÂNTARA CAMPOS
CPF: 03215053527
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Mestrando
Endereço: Av. Oceânica, 2261, Condomínio Barramares, bloco C, apto 204
Bairro: Coroa do Meio
Cidade: ARACAJU
Estado: SE
CEP: 49035-655
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email:

Inventor 8 de 9

Nome: DAYANNE VALÉRIA SOARES SANTANA
CPF: 03448708550
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Estudante de Graduação
Endereço: Rua 24 de outubro nº 108 Bairro: Palestina
Cidade: ARACAJU
Estado: SE
CEP: 49060-670
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email:

Inventor 9 de 9

Nome: PAULA SANTOS NUNES
 CPF: 01009865528
 Nacionalidade: Brasileira
 Qualificação Física: Professor do ensino superior
 Endereço: Avenida Melício Machado, 4000, casa 21, condomínio Maria Rezende Machado Bairro: Aruana
 Cidade: ARACAJU
 Estado: SE
 CEP: 49037-440
 País: BRASIL
 Telefone:
 Fax:
 Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	comprovante pagamento.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Resumo	Resumo.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 11/10/2019 às 14:48, Petição 870190102435

SIAFI2019-DOCUMENTO-CONSULTA-CONDCC (CONSULTA DOCUMENTO)
 30/09/19 11:51 USUARIO : ARISSCN
 DATA EMISSAO : 27Set19 TIPO CH: 59 NUMERO : 20190E804969
 UG/GESTAO EMITENTE: 154050 / 15267 - FUNCACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
 BANCO : 001 AGENCIA : 3611 CONTA CORRENTE : 997380632
 FAVIDECIDO : 00000000/0001-91 - BANCO DO BRASIL SA
 BANCO : 001 AGENCIA : 3611 CONTA CORRENTE : FATURA
 DOCUMENTO ORIGEM : 154050/15267/2019RF001015 SIST. ORIGEM : GESTACCCMP
 NUMERO BANCARIO : 004692849-9 PROCESSO : 23113.052478/2019-61
 VALCR : 70,00

IDENT. TRANSFER. : LISTA FATURA: 2019IF000592
 CBSERVACAO DATA SAQUE BACEN: 27/09/19
 LIQUIDAÇÃO DO PROCESSO 052478/2019-61, FAT. 29409161909435790, PAGAMENTO DA GR
 U ANEXA, COM VENCIMENTO EM 01/10/2019, CORRESPONDENTE AO DEPÓSITO DE PATENTE,
 PATRIMÔNIO 257342. DEFINIDA EM 20 ANCS.

CONTINUA ...

PF1-AJUDA PF3-SAI PF4-ESPELHO PF6-DETALHA LISTA PF12-RETORNA

SIAFI2019-DOCUMENTO-CONSULTA-CONDCC (CONSULTA DOCUMENTO)
 30/09/19 11:51 USUARIO : ARISSCN
 DATA EMISSAO : 27Set19 TIPO CH: 59 NUMERO : 20190E804969
 UG/GESTAO EMITENTE: 154050 / 15267 - FUNCACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
 BANCO : 001 AGENCIA : 3611 CONTA CORRENTE : 997380632
 FAVIDECIDO : 00000000/0001-91 - BANCO DO BRASIL SA
 BANCO : 001 AGENCIA : 3611 CONTA CORRENTE : FATURA
 VALCR : 70,00
 I EVENTO INSCRIÇÃO CLAS.CONT CLAS.ORG VALCR
 01 401003 2019NE000161400 44913981 70,00
 02 531115 2019NE000161 00000000000191 213120400 44913981 70,00
 03 561602 8100000000400E 70,00

LANCADO POR : 42061121500 - ABEL SMITH UG : 154050 27Set19 15:49
 PF1-AJUDA PF2-SN PF3-SAI PF4-ESPELHO PF12-RETORNA

SIAPI2019-DOCUMENTO-CONSULTA-CONS (CONSULTA LISTA DE SATURA)
30/05/19 11:52 USUARIO : ASIEGON
PAGINA 1
UF/SEETAC EMITENTE: 154050 / 15267 - FUNDACAO UNIVERSITARIA FEDERAL DO CEARA
NUMERO LS: 000592 PEC. NUMERO CH: 804969 TIPO DE LISTA: EXTRIA
BANCO : 001 BANCO DO BRASIL
CSCAC DE PAGAMENTO: TITULOS

SRC BENEFICIARIO NOME BENEFIC. PAGADOR VAOR LIQUIDO SIT.
000001 42521068000137 INPI 13031547000104 30,00

TOTAL: 30,00

001=AJUDA 102=DETALHA 003=GAI 0012=RETONNA

REIVINDICAÇÕES

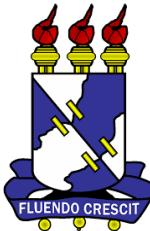
1. MEMBRANAS POLIMÉRICAS, caracterizada por conter matriz polimérica constituída de alginato de sódio e glicerol.
2. MEMBRANAS POLIMÉRICAS de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por conter indicador colorimétrico e outro reagente químico, sendo o indicador vermelho de alizarina S e o reagente carbonato de sódio.
3. MEMBRANAS POLIMÉRICAS CONTENDO VERMELHO DE ALIZARINA S e CARBONATO DE SÓDIO de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por diagnóstico rápido de neuropatias periféricas de fibras finas através de reação colorimétrica.
4. MEMBRANAS POLIMÉRICAS CONTENDO VERMELHO DE ALIZARINA S e CARBONATO DE SÓDIO de acordo com a reivindicação 3, caracterizada por diagnosticar neuropatias periféricas através da reação com o suor proporcionando mudança de cor de amarelo-alaranjado para roxo.
5. MEMBRANAS POLIMÉRICAS CONTENDO VERMELHO DE ALIZARINA S e CARBONATO DE SÓDIO, caracterizada por ser aplicada preferencialmente no antepé dos pacientes, em conjunto (sobrepostas), com auxílio de adesivo hospitalar aderente.
6. MEMBRANAS POLIMÉRICAS CONTENDO VERMELHO DE ALIZARINA S e CARBONATO DE SÓDIO de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por ser aplicada no antepé dos pacientes, durante 10 - 20 minutos, para diagnosticar a possibilidade de neuropatias periféricas com conforto, eficácia e rapidez.

1/1

RESUMO**MEMBRANAS POLIMÉRICAS CONTENDO INDICADOR COLORIMÉTRICO PARA AUXILIAR O DIAGNÓSTICO DE NEUROPATHIAS PERIFÉRICAS**

O presente pedido de patente de invenção consiste de membranas poliméricas de alginato de sódio contendo vermelho de alizarina S e carbonato de sódio destinadas à auxiliar no diagnóstico de neuropatias periféricas de fibras finas, com conforto aos pacientes que necessitam de diagnóstico rápido e menos doloroso. Trata-se de um produto de baixo custo e sobre tudo, mais confortável ao paciente do que os testes existentes atualmente, podendo ser comercializado por empresas do setor farmacêutico.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa-POSGRAP

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde-PPGCS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você, cidadão brasileiro, em pleno exercício dos seus direitos, está sendo convidado a participar da pesquisa de Tese de Doutorado em Ciências da Saúde intitulada **Desenvolvimento e avaliação de membrana contendo alizarina como teste rápido no auxílio ao diagnóstico de neuropatia diabética**, da pesquisadora Deborah Danielle Tertuliano Marinho, orientanda do professor Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo e do professor Dr. Eduardo Luis de Aquino Neves.

O seu consentimento, em particular, se dará após ter sido informado (a) pelo pesquisador, de que a pesquisa se justifica pela necessidade de avaliarmos a resposta diagnóstica da membrana de colágeno-ácido contendo vermelho de alizarina S (1,2 – Dihidroxiantraquinona-3-sulfonato de sódio – VAS) enquanto inovação no campo dos testes diagnósticos, observando a relação entre os sintomas apresentados e a resposta ao teste. Terá como objetivo geral avaliar o efeito diagnóstico da membrana de colágeno-ácido contendo vermelho de alizarina S (1,2 – Dihidroxiantraquinona-3-sulfonato de sódio – VAS) em pacientes com Neuropatias Periféricas. Os dados serão coletados através de uma entrevista estruturada com pacientes normais, diagnosticados e com suspeita de Neuropatias Periféricas. Serão coletados dados também através de imagens das membranas do entrevistado, através de câmeras fotográficas. Serão coletados dados ainda através da eletroneuromiografia para os suspeitos e diagnosticados com neuropatias periféricas. A participação é voluntária, estando ciente dos riscos e benefícios dessa pesquisa:

RISCOS: caso o entrevistado sinta-se constrangido com o fato de ser entrevistado por uma pessoa estranha ou em responder determinadas questões, ele terá a liberdade de desistir ou responder apenas o que se sinta bem, a qualquer momento, sem risco de qualquer penalização. Os componentes químicos que constituem a membrana apresentam efeitos adversos pouco notificados para a pele e são classificados como não perigosos pela ABNT NBR 14725-2. Além disso, as concentrações de cada componente na formulação são muito baixas. Existe ainda a possibilidade de um possível desconforto ao exame da eletroneuromiografia, por ser um exame invasivo.

BENFÍCIOS: o benefício maior da pesquisa diz respeito à contribuição científica para entender o processo de inovação diagnóstica das Neuropatias Periféricas de Fibras Finas. Outro possível benefício é o conhecimento que servirá de base para reflexão e construção de ferramentas em saúde mais efetivas e adequadas à realidade local, melhorando a qualidade da avaliação e do atendimento prestado. Apesar do desconforto, existe o benefício direto da eletroneuromiografia, que é o diagnóstico mais preciso.

Será garantida a confidencialidade do nome do entrevistado no resultado final. Ao término da pesquisa o entrevistado terá livre acesso ao conteúdo, podendo discutir os dados, com o pesquisador. Caso sinta necessidade de contatar o pesquisador durante e/ou após a coleta de dados, poderá fazê-lo no endereço: Avenida Oceânica, 2261, Aracaju-SE, pelo telefone (79) 3024-0805, ou por e-mail: deborahdani5@yahoo.com.br. Caso queira contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFS: Hospital Universitário - Rua Cláudio Batista s/n – Prédio do Centro de Pesquisas Biomédicas – Bairro Sanatório CEP: 49060-100, Aracaju/SE, e-mail: cephu@ufs.br Fone: 3194-1708.

Aracaju, ____ de _____ de _____

Participante

Pesquisador

APÊNDICE B - Termo de Anuênciâ

Declaramos para os devidos fins que concordamos em receber Déborah Danielle Tertuliano Marinho, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPCCS), da Saúde da Universidade Federal de Sergipe (UFS), facultando-lhe o uso das instalações do Centro Eletroneuromiográfico (CEMG) situada à Av. Gonçalo Prado Rollemburg, 211 - Sala 507 - São José - Aracaju/SE, para desenvolver a pesquisa intitulada **"DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MEMBRANA PARA AUXÍLIO NO DIAGNÓSTICO DE NEUROPATHIA PERIFÉRICA DE FIBRAS FINAS"** sob a orientação do Professor Doutor Adriano Antunes de Souza Araújo, após a aprovação da referida pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UFS).

Declaramos conhecer e cumprir as resoluções éticas brasileiras, em especial a resolução 466/2012/CNS. Estamos cientes dos objetivos do presente projeto e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos da pesquisa.

Aracajú, 18 de janeiro de 2018.

Assinatura e Carimbo: 
CPF ou RG: 517.830.535-34
Cargo ou Função no CEMEG: Dir. de Tóccico - Neurofisiologia
Telefone para Contato: 3234-6634

Dr. Eduardo Luís de Aquino N'evés
Neurologia - Eletroneuromiografia
CRM/SE 2105
CPF: 517.830.535-34