

**UNIVERSIDADE BRASIL
PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

JUSCÉLIA MARIA DE MOURA FEITOSA VERAS

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE UNHAS PARA O
DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS POR ESPECTROSCOPIA
RAMAN**

**STUDY OF THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF NAILS FOR THE
DIAGNOSIS OF DIABETIC PATIENTS BY RAMAN SPECTROSCOPY.**

São Paulo – SP
2021

PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

JUSCÉLIA MARIA DE MOURA FEITOSA VERAS

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE UNHAS PARA O
DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS POR ESPECTROSCOPIA
RAMAN**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Prof(a). Dr(a). Priscila Pereira Fávero
Orientador(a)

Prof(a). Dr(a). Lívia Assis Garcia
Coorientador(a)

Prof(a). Dr(a). Airton Abrahão Martin
Coorientador

São Paulo – SP
2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

V584e VERAS, Juscélia Maria de Moura Feitosa.
Estudo da composição bioquímica de unhas para o diagnóstico de Diabetes Mellitus por Espectroscopia Raman / Juscélia Maria de Moura Feitosa Veras. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2021.
85 f.: il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-Graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.
Orientação: Profa. Dra. Priscila Ferreira Fávero.
Coorientação: Profa. Dra. Lívia Assis Garcia; Prof. Dr. Airton Abrahão Martin.

1. Espectroscopia Raman Confocal. 2. Diabetes Mellitus. 3. Unhas. 4. Glicação.
I. Fávero, Priscila Ferreira. II. Garcia, Lívia Assis. III. Martin, Airton Abrahão. IV. Título.

CDD 620.82




UNIVERSIDADE
BRASIL

TERMO DE APROVAÇÃO

JUSCÉLIA MARIA DE MOURA FEITOSA VERAS

“ESTUDO DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE UNHAS PARA O DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN”.

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



Prof(a). Dr(a) Priscila Pereira Fávero (presidente-orientadora)



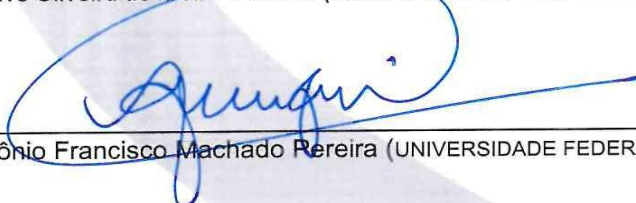
Prof(a). Dr(a) Laurita dos Santos (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof(a). Dr(a) Cláudio Alberto Tellez Soto (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof(a). Dr(a) Gustavo Oliveira de Meira Gusmão (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ)



Prof(a). Dr(a). Antônio Francisco Machado Pereira (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ)

São Paulo, 07 de dezembro de 2021.
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Priscila Pereira Fávero

Houve alteração do Título: sim () não (x):



Termo de Autorização

PARA PUBLICAÇÃO DE DISSERTAÇÕES E TESES NO FORMATO ELETRÔNICO NA PÁGINA WWW DO RESPECTIVO PROGRAMA DA UNIVERSIDADE BRASIL E NO BANCO DE TESES DA CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: “ESTUDO DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE UNHAS PARA O DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN”

AUTOR(ES):

Discente: **Juscélia Maria de Moura Feitosa Veras**

Assinatura: Juscélia Maria de Moura Feitosa Veras

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Priscila Pereira Fávero**

Assinatura: Priscila Pereira Fávero

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a)**

Assinatura: _____

Houve alteração do Título: sim () não ():

Data: 07/12/2021

DEDICATÓRIA

Á Deus por me conceber boa saúde física e mental, mantendo-me forte nas
intempéries da vida.

“Deus é bom o tempo todo, o tempo todo Deus é bom”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, quem eu confio e entrego todos os dias a minha vida e as minhas escolhas, tive momentos em que pensei em desistir diante de tantas dificuldades em conciliar trabalhos, família e vida pessoal, mas ele sempre me encorajava. Obrigada meu Deus pela realização desse sonho.

Aos meus pais, por me proporcionarem apoio e amor incondicional em toda minha trajetória de vida, incentivando e me dando força e fé para prosseguir.

Ao meu estimado esposo e companheiro Marcelo Veras, que sempre me apoiou e me incentivou, me dando força, compreensão e pelo amor de todos esses anos.

Aos meus amados filhos Guilherme e Maria Eduarda, vocês são a razão do meu viver, sempre amáveis e compreensíveis com as minhas ausências e atribulações. No início foi muito difícil deixar vocês e ir para São Paulo em busca desse sonho... Amo muito vocês.

A minha querida família, em especial aos meus irmãos, Juscelino Filho, Jusmairo, Conceição, Francisco Neto, Emanuel e Marcos Benício por nossa união e por sempre me apoiaram e me incentivaram.

A minha querida amiga Lennara, por me presentear com a sua convivência durante toda nossa caminhada, por todo o incentivo, apoio e amizade.

As minhas queridas orientadoras: Prof^a Dra Priscila Pereira Fávero e Prof^a Dra Livia Assis Garcia, pelos ensinamentos, dedicação e pelo imenso auxílio no projeto, por me ensinar com dedicação e paciência.

Ao professor Dr. Airton Abrahão Martin pela oportunidade de realizar essa pesquisa e por toda a sua ajuda e orientação.

Ao Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil por todo o apoio, auxílio e pela excelente oportunidade que me proporcionaram.

Ao Centro Universitário UNINOVAFAPI – Grupo Afya Educacional pelo apoio e incentivo na qualificação de seus docentes.

E a todos os voluntários pela disposição e boa vontade em participar da pesquisa

RESUMO

O crescimento do Diabetes Mellitus (DM) é um problema de saúde pública com maior prevalência nos países em desenvolvimento. A prevalência estimada de diabetes em pessoas com idade entre 20-79 anos aumentou de 151 milhões para 463 milhões hoje, com previsão de um total de 700 milhões de diabéticos até 2045. Devido aos fatos mencionados, torna-se necessário um diagnóstico precoce, não invasivo, prático e de baixo custo para detecção e monitoramento do DM. Nenhuma técnica encontra-se disponível para avaliar clinicamente a qualidade alterada dos tecidos nos pacientes diabéticos. No entanto, estudos recentes sugerem que a qualidade da placa da unha tem um grande potencial para avaliar as complicações secundárias do DM. Assim, este estudo teve como objetivos determinar a potencialidade da técnica Raman Confocal em unhas, para o diagnóstico de diabetes mellitus. Além de identificar as assinaturas espectrais e novos biomarcadores de DM tipo 2 (DM2) em unhas. Este estudo trata-se de um estudo clínico multicêntrico (Universidade Brasil- SP e Fundação Municipal de Saúde de Teresina/PI), comparativo, randomizado e instrumental com abordagem qualitativa. Para a pesquisa, foram selecionados 30 participantes saudáveis e 30 DM2. Foi realizada a coleta e avaliação de fragmentos na região distal da unha. Os resultados obtidos demonstraram alterações em diferentes componentes bioquímicos, tais como: proteínas, lipídeos, aminoácidos, agentes finais da glicação avançada, além de alterações nas pontes dissulfídicas, importante na estabilização da queratina nas unhas. Diante disso, pela possibilidade de se adquirir tais informações pela avaliação das unhas, um material simples e de fácil aquisição, esta se torna um importante material de análise, permitindo que o DM e suas complicações possam ser detectadas de forma rápida. Além disso, o estudo também demonstrou que a avaliação das unhas pela espectroscopia Raman confocal é uma importante técnica, que aliada a avaliação das unhas, pode se tornar uma importante ferramenta no diagnóstico e acompanhamento de pacientes diabéticos.

Palavras chave: Espectroscopia Raman Confocal, Diabetes Mellitus, Unhas, Glicação.

ABSTRACT

The growth of Diabetes Mellitus (DM) is a public health problem with greater prevalence in developing countries. The estimated prevalence of diabetes in people aged 20-79 years has increased from 151 million to 463 million today, with a total forecast of 700 million diabetics by 2045. Hence the importance of an early, non-invasive, practical and low-cost diagnosis for DM detection and monitoring. Type II diabetes mellitus (DM2) gradually changes the intrinsic material properties of tissues and their structural integrity, and prolonged hyperglycemia can cause chronic damage to the quality of these tissues. No technique is available to clinically assess altered tissue quality in diabetic patients. However, recent studies suggest that the quality of the nail plate has great potential to assess the secondary complications of DM. Thus, this study aimed to determine the biochemical characteristics of nails of individuals with DM2 through confocal Raman spectroscopy, in addition to identifying the spectral signatures and new DM2 markers in nails. This study is a multicenter clinical study (Universidade Brasil - SP and Fundação Municipal de Saúde de Teresina/PI), comparative, randomized and instrumental with a qualitative approach. For the research, 30 healthy volunteers and 30 DM2 were selected. The collection and evaluation of fragments in the distal region of the nail was carried out. The results obtained demonstrated alterations in different biochemical components, such as: proteins, lipids, amino acids, advanced glycation end products, in addition to alterations in the disulfide bridges, which are important in the stabilization of keratin in the nails. Therefore, due to the possibility of acquiring such information through the evaluation of nails, a simple and easy-to-acquire material, this becomes an important material for analysis, allowing DM and its complications to be detected quickly. In addition, the study also demonstrated that the assessment of nails by confocal Raman spectroscopy is an important technique, which, together with the assessment of nails, can become an important tool in the diagnosis and follow-up of diabetic patients.

Keywords: Confocal Raman Spectroscopy, Diabetes Mellitus, Nails, Glycation.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

A avaliação das alterações bioquímicas presentes nas unhas de pacientes diabéticos tem grande importância, uma vez que pode nos fornecer informações sobre a condição estrutural da mesma em relação a doença, ou até, em casos iniciais, permitir o diagnóstico da doença. Desta forma, a utilização das unhas para a aquisição de informações bioquímicas de pacientes diabéticos por meio da espectroscopia Raman confocal pode facilitar o processo, uma vez que a mesma é de fácil aquisição e livre de processos invasivos. Foi verificado no estudo, a presença de vários elementos bioquímicos com intensidades alteradas nas unhas de participantes diabéticos em relação a não diabéticos. Os principais componentes observados foram proteínas, especialmente a queratina, lipídeos, aminoácidos, carboximetilisina, além de alterações nas ligações dissulfídicas (S-S). Portanto, foi possível caracterizar bioquimicamente a unha de pacientes diabéticos, permitindo a observação de componentes bioquímicos que futuramente, podem ser classificados como biomarcadores para o diagnóstico e acompanhamento do diabetes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema representando a interação da molécula com a energia de um fóton incidente e energia de um fóton espalhado..... **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 2** - Processo de dispersão luminosa de um fóton excitado**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 3** - Espectro Raman de unha humana..... **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 4** - Sensibilidade x Especificidade para diagnósticos de Diabetes tipo 2 por tipo de amostra..... **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 5** - Desenho esquemático da Espectroscopia Raman Confocal**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 6** - Infraestrutura do laboratório onde os experimentos foram conduzidos..... **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 7 (A-B)** - Dendrogramas realizados para verificação da homogeneidade dos espectros Raman e verificação da presença de outliers. A: Grupo diabetes; B: Grupo saudável. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 8** - Espectros Raman médios para os grupos avaliados no intervalo espectral de 400 a 1800 cm^{-1} **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 9** - Gráfico da matriz obtida pela associação entre as diferentes componentes principais (PCs) obtidas. DIA: diabético; SAU: saudável. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 10** - PLS-DA entre os grupos DIA e SAU, apresentando a separação entre a maioria das amostras DIA (acima da linha vermelha) e as amostras SAU (abaixo da linha vermelha). DIA: diabético; SAU: saudável. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 11** - Variáveis que mais contribuíram para a separação dos grupos DIA x SAU. Os picos registrados são os que mais contribuíram para a separação.**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 12 (A-B)** - Gráficos de deconvolução da região de amida I no intervalo de 1580 a 1720 cm^{-1} . A: grupo saudável; B: grupo diabético. Linhas pretas são referentes aos picos de interesse (1622 e 1654-1656 cm^{-1}), linhas azuis são referentes ao espectro. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 13** - Gráficos boxplot para marcadores bioquímicos evidenciados nos espectros da primeira derivada. Grupo 0: SAU e Grupo 1: DIA..... **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 14** - Gráficos boxplots para marcadores bioquímicos evidenciados nos espectros da segunda derivada. Grupo 0: SAU e Grupo 1: DIA..... **Error! Bookmark not defined.**

ISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de voluntários diabéticos e não-diabéticos quanto ao gênero e média de idade..... **Error! Bookmark not defined.**

Tabela 2 - Média dos valores de glicemia em jejum e hemoglobina glicada (HbA1c) de voluntários diabéticos e não-diabéticos..... **Error! Bookmark not defined.**

Tabela 3 - Principais picos identificados e suas respectivas atribuições. **Error! Bookmark not defined.**

Tabela 4 - Principais picos observados na análise VIP e que contribuíram para a discriminação entre os grupos DIA x SAU..... **Error! Bookmark not defined.**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
2 OBJETIVOS	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
2.1 Objetivos Específicos	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3 REVISÃO DA LITERATURA	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.1 Evolução histórica da análise da unha	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.2 Anatomia e Composição estrutural da unha	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.3 Composição bioquímica da unha de diabéticos ...	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.4 Reação Maillard	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.4.1 Bioquímica da Reação de Maillard.....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.4.2 - Reação de Maillard	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.4.3 Formação e mecanismo de ação dos AGEs.....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.5 Análise das unhas por espectroscopia óptica	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.6. Espectroscopia Raman Confocal	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.6.1 Breve Histórico	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.6.2 Mecanismos de Funcionamento da Espectroscopia	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.6.3 Classificação da Espectroscopia Raman	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.6.4 Funcionamento e usos atuais da Espectrografia Raman	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4 METODOLOGIA	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.1 Tipo de Estudo	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.2 Aspectos éticos e legais	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.3 Local da Pesquisa	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.4 Seleção de Voluntários da Pesquisa	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.5 Desenho do estudo	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.6 Coleta dos Dados da Pesquisa	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.7 Análise das Amostras da Pesquisa	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.8 Medidas por Espectroscopia Raman Confocal	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.9 Análise estatística	<i>Error! Bookmark not defined.</i>

5 RESULTADOS	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.1 Caracterização dos participantes	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.2 Exames bioquímicos	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.3 Análise dos espectros Raman	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.4 Análise de Componentes Principais (PCA)	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.5 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.6 Análise de Deconvolução – Amida I	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.7 Análise Estatística	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
6 DISCUSSÃO	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
7 CONCLUSÃO	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
REFERÊNCIAS	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
APÊNDICE A – Questionário	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
APÊNDICE B – Carta de Apresentação	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
APÊNDICE D – Carta de Anuência do Pesquisador principal	82
ANEXO A – Declaração de autorização da Instituição coparticipante	84
ANEXO B – Autorização do comitê de ética em pesquisa	5

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é um transtorno metabólico multifatorial causado por uma desordem na secreção e/ ou ação da insulina, resultando em resistência insulínica e mudanças metabólicas, especialmente numa elevação da glicemia (hiperglicemia) (OGURTSOVA et al., 2017). Concentrações plasmáticas elevadas de glicose levam ao desenvolvimento de degenerações crônicas associadas à falência de diversos órgãos, principalmente olhos, rins, coração, nervos e vasos sanguíneos (KISHABONGO et al., 2014).

Diabetes mellitus é um importante e crescente problema de saúde pública, independentemente do seu grau de desenvolvimento, cerca de 79% dos casos vivem em países em desenvolvimento, nos quais deverá ocorrer o maior aumento dos casos de diabetes nas próximas décadas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019). Ressalta-se ainda que, principalmente os jovens são afetados pela doença nesses países (COOPMAN et al., 2016).

A prevalência estimada de diabetes em pessoas com idade entre 20-79 anos aumentou de 151 milhões para 463 milhões hoje. Sem ação suficiente para enfrentar esse problema, a previsão é de que 578 milhões pessoas (10,2% da população) terão diabetes em 2030. Esse número saltará para impressionantes 700 milhões (10,9%) até 2045 (INTERNACIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

Devido à tendência crescente no número de pessoas tornando-se diabético em todo o mundo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que serão 300 milhões de diabéticos até 2025 (EBA et al., 2016). Na África têm-se observado uma crescente prevalência de diabetes Mellitus, dados atuais indicam 19,8 milhões de diabéticos, e este número deverá dobrar até 2035 (KATCHUNGA et al., 2015).

A estimativa no Brasil, da realidade do crescimento do DM é de que até 2025 aproximadamente 11 milhões de pessoas serão diabéticas (BERTOLDI et al., 2013). No final da década de 1980, estimou-se em 7,6% a prevalência de diabetes na população adulta. Estudo recente realizado em seis capitais brasileiras, com servidores de universidades públicas na faixa etária de 35 a 74 anos, incluindo teste oral de tolerância à glicose, encontrou prevalência de 20%, em que aproximadamente metade dos casos não tinha diagnóstico prévio (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

Com base nas estimativas atuais, a prevalência de diabetes mellitus aumentará dramaticamente nas próximas décadas. O maior aumento é esperado nos países em desenvolvimento, isto é justificado por motivos de crescimento e envelhecimento populacional, maior urbanização, crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, e da maior sobrevivência das pessoas com diabetes (WHITING et al., 2011).

Corroborando com esses autores, Kishabongo et al., 2014, também reforçam que a prevalência do diabetes tem aumentado devido à rápida urbanização, crescimento e envelhecimento da população. A morbidade / mortalidade, prevenção e tratamento primário podem reduzir a incidência de diabetes e doenças relacionadas, como retinopatia, catarata, aterosclerose, nefropatia e neuropatia diabética.

Foram também identificados vários determinantes do incidente pré-diabetes e diabetes mellitus tipo 2 nos países em desenvolvimento, como a dieta não saudável, ganho de cintura, obesidade, hipertensão arterial, hipertrigliceridemia, história genética e morarem em áreas rurais (COOPMAN et al., 2016).

O DM é classificado em tipo 1 e 2, diabetes gestacional e outros tipos. No DM tipo 1 (DM1) ocorre uma destruição crônica das células β pancreáticas, por meio de mecanismos autoimunes, poligênica, mediados por células como linfócitos T e macrófagos. O processo de autodestruição se inicia meses a anos antes do diagnóstico clínico da doença e, dependendo da idade do diagnóstico, cerca de 70 a 90% das células β já foram destruídas após os primeiros sintomas de hiperglicemia (VOLTARELLI et al., 2009).

Embora a prevalência de DM1 esteja aumentando, corresponde a apenas 5 a 10% de todos os casos de DM. É mais frequentemente diagnosticado em crianças, adolescentes e, em alguns casos, em adultos jovens. Subdivide-se em DM tipo 1A e DM tipo 1B, a depender respectivamente, da presença ou da ausência laboratorial de autoanticorpos circulantes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

No DM tipo 2 (DM2), o principal fenômeno fisiopatológico é a resistência à ação da insulina, diminuindo a captação de glicose em tecidos insulina dependentes. No início da doença, em resposta a esta resistência, ocorre hiperinsulinemia compensatória, continuando por meses ou anos. Com o avanço do DM2, por causa da disfunção e redução das células β pancreáticas, a síntese e a secreção de insulina poderão ficar comprometidas (VOLTARELLI et al., 2009).

Destaca-se ainda que o diabetes mellitus tipo 2 corresponde a 90 a 95% de todos os casos de DM. Possui etiologia complexa e multifatorial, envolvendo componentes genético e ambiental, acomete indivíduos a partir dos 40 anos de vida, embora se descreva, em alguns países, aumento na sua incidência em crianças e jovens. Trata-se de doença poligênica, com forte herança familiar, ainda não completamente esclarecida, cuja ocorrência tem contribuição significativa de fatores ambientais. Dentre eles, hábitos dietéticos e inatividade física, que contribuem para a obesidade (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

O diabetes mellitus deve ser investigado em relação às complicações agudas e crônicas e sua relação com o tempo de diagnóstico. As complicações agudas incluem a hipoglicemia, o estado hiperglicêmico hiperosmolar e a cetoacidose diabética. Já as crônicas incluem a retinopatia, nefropatia, cardiopatia isquêmica, neuropatias, doença cerebrovascular e vascular periférica. As degenerativas mais frequentes são o infarto agudo do miocárdio, a arteriopatia periférica, o acidente vascular encefálico e a microangiopatia (GINTER; SIMKO, 2012; ASSOCIAÇÃO AMERICANA DIABETES, 2013).

Desse modo, o estudo de Guevara et al., (2018) destaca o monitoramento da hemoglobina glicada (HbA1c) no sangue humano, utilizado como padrão-ouro para o controle de pacientes diabéticos em longo prazo.

Ressalta-se com relação ao diagnóstico laboratorial do diabetes mellitus, que além da hemoglobina glicada (HbA1c), pode ainda ser realizado glicemia de jejum e glicemia 2 horas após teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Critérios diagnósticos recomendados pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) para cada um desses parâmetros são os mesmos recomendados pela Associação Americana de Diabetes (American Diabetes Association - ADA). Considera-se glicemia de jejum (mg/dL) < 100 (normal), 100 a 125 (pré-diabetes) e \geq 126 (diabetes). Glicemia 2 horas após TOTG com 75 g de glicose (mg/dL) < 140 (normal), 140 a 199 (pré-diabetes) e \geq 200 (diabetes) e Hemoglobina glicada (%) < 5,7 (normal), 5,7 a 6,4 (pré-diabetes) e \geq 6,5 (diabetes) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

Mesmo a glicemia venosa sendo uma ferramenta amplamente utilizada para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com diabetes, essa análise está sujeito a variação pré-analítica, como: paciente em jejum; condições de transporte: uma perda esperada de glicose de 10 mg/dl/h. E apesar, da HbA1c ser considerada como uma boa

ferramenta de diagnóstico com alta especificidade e baixa sensibilidade (ZEMLIN, et al. 2011), vários fatores de hemoglobinopatias como talassemias, afetam a sobrevivência de glóbulos vermelhos. E os glóbulos vermelhos, a idade, uremia, hiperbilirrubinemia e deficiência de ferro pode influenciar os resultados (KISHABONGO et al., 2014).

Dessa maneira, de acordo com os autores acima, o rastreamento e monitoramento de DM é de extrema importância, pois está associado com morbidades importantes como doença cardíaca, nefropatia, neuropatia e retinopatia e mortalidade, bem como com uma influência negativa na economia.

Pesquisadores e clínicos vêm buscando focar suas ações nos cuidados no controle dos biomarcadores metabólicos de pessoas com DM, buscando-se minimizar os impactos da doença (RAEE et al., 2017). Dessa maneira, Guevara et al., (2018) destaca que a utilização da espectroscopia Raman associada com a rede neural artificial (RNA), tem se destacado como potencial para rastreamento in vivo na medição de glicose de maneira não-invasiva. Essa técnica possui um baixo custo, considerada inofensiva, possibilitando assim um diagnóstico rápido, de modo simples e confortável para o paciente.

O controle do diabetes mellitus constitui atualmente um desafio para os profissionais de saúde, pois é preciso desenvolver ações onde se possam negociar prioridades, monitorar a adesão ao tratamento, motivar a participação e reforçar o esforço do cliente no manejo do autocuidado. Dessa maneira para que mantenha um bom controle glicêmico e metabólico, é necessário realizar mudanças de comportamentos e adesão ao tratamento medicamentoso e assim fazer a prevenção das complicações agudas e crônicas, minimizando complicações em curto e longo prazo, sabendo-se que mesmo assim, é difícil manter o controle metabólico por longo tempo pois o tratamento do diabetes envolve vários componentes complexos (ARAÚJO et al., 2011).

O controle dos biomarcadores metabólicos estudados por alguns pesquisadores são: a hemoglobina glicada (HbA_{1c}), glicemia de jejum (GJ), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e pressão arterial (PA), em pessoas com DM, pela existência de uma correlação entre as alterações ligadas ao DM (ARRELIAS et al., 2015). Os exames bioquímicos geralmente são invasivos, por coleta de sangue, requerem preparo antecipado, como jejum e transporte do paciente em unidade básica de saúde. Tais inconvenientes podem limitar o acompanhamento e histórico da doença.

Diante deste problema e realidade, além da coleta de unha ser um procedimento indolor e possível de ser realizado na residência do paciente, surgiu a proposta de realizar esta pesquisa para que seja possível determinar as características bioquímicas da unha de indivíduos diabéticos tipo II através da espectroscopia Raman confocal, considerando a hipótese de que a espectroscopia Raman é capaz de diferenciar unhas diabéticas de unhas sadias.

2 OBJETIVOS

Constatar a potencialidade da técnica Raman confocal em unhas, para o diagnóstico de Diabetes Mellitus.

2.1 Objetivos Específicos

- Identificar as assinaturas espectrais de indivíduos com diabetes mellitus tipo II;
- Identificar novos biomarcadores de diabetes mellitus tipo II em unhas através da espectroscopia Raman Confocal.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Evolução histórica da análise da unha

Desde os primórdios da medicina que o conhecimento sobre as unhas e suas doenças despertou interesse na sociedade. Foram feitos estudos sobre o crescimento ungueal por Robert Boyle em 1684. Em 1852, foi apresentada uma descrição do chamado “complexo ungueal” no Manual of Human Histology. O primeiro trabalho sobre doenças de unhas encontrado na literatura médica brasileira foi de Clóvis de Castro em 1948, que descreve um caso de pigmentação ungueal relacionada com o uso de creme contendo mercúrio. Em 1983 houve relato do primeiro uso de unhas dos pés como monitor biológico de selênio para estudo de doenças crônicas por meio de um instrumento de ativação de neutrons (MORRIS et al., 2006).

O referido estudo considerou as unhas como um bom ponto de análise, uma vez que são basicamente proteicas e qualquer alteração no valor do selênio no organismo será refletido nas unhas. No estudo em questão, o selênio foi utilizado tanto em suplementação oral quanto em forma de shampoo. Como suplementação foi possível analisar a variação da dieta em si, e o uso como shampoo foi para fazer uma análise se era possível a absorção pela pele e, conseqüentemente, gerar um viés de pesquisa que anulasse ou invalidasse o estudo. A análise ocorreu por laser de alta frequência, com presença de raios gama para análise das amostras. Concluiu que as unhas são viáveis para realizar um estudo influenciado pela dieta, ingestão calórica e mudanças no organismo a longo prazo, como no caso das doenças crônicas. O autor sugere ainda que é possível a realização dessa análise através de outros métodos.

3.2 Anatomia e Composição estrutural da unha

A anatomia da unha apresenta diferentes compartimentos como: a lâmina ungueal, a matriz ungueal, o leito ungueal e os tecidos moles circundantes com a inervação e a vascularização da falange distal. A lâmina ungueal é uma forma modificada do estrato córneo que se encontra em duas estruturas: a matriz ungueal e o leito ungueal. As camadas mais profundas da lâmina ungueal são formadas pela região intermediária da matriz ungueal e pelo leito ungueal. A seção dorsal da matriz ungueal é responsável pela formação das camadas superficiais da lâmina ungueal. O crescimento da lâmina ungueal

é caracterizado por um alongamento longitudinal, usando a lúnula ou prega ungueal proximal como estrutura de referência. O fornecimento de sangue dos dedos ocorre pelas artérias radial e ulnar, formando arcadas palmares profundas e superficiais com ramos alinhados com as falanges. Os tecidos das unhas e das lentes dos olhos são compostos de proteínas de filamento intermediário, também chamadas de queratinas e cristalinas, respectivamente (KISHABONGO et al., 2015).

A lâmina ungueal humana é composta principalmente por 10 a 20% de queratinas moles ou citoqueratinas (tipo epitelial) e 80-90% de queratinas duras ou tricocíticas (tipo de cabelo). A diferença entre os dois tipos de queratinas são o teor de enxofre em seus domínios de cabeça e cauda não- α -helicoidais. As queratinas são caracterizadas por uma ampla diversidade molecular e têm um peso molecular de 44-66 kDa (KISHABONGO et al., 2015).

Dessa forma, os queratinócitos da matriz ungueal, leito ungueal e polpa do dedo foram caracterizados por diferentes tipos de expressão de queratina. A matriz da unha foi o único local de expressão da queratina do tipo capilar Ha1, localizada na epiderme da matriz suprabasal com queratinas epidérmicas K1 e K10. Foram encontradas pequenas quantidades de K17 no ápice da matriz em alguns casos. A presença de K6 e K16 na prega ungueal proximal. No leito ungueal foram detectados K6, K16 e K17 (D.DE BERKER et al., 2000).

Para Resende (2015), as unhas são anexos cutâneos formados por queratina e que possuem a função de proteção das superfícies distais dos dedos contra impactos traumáticos e também utilizadas para arranhar e manipular objetos. Possuem consistência dura, porém flexível. É um apêndice de pele queratinizada especializado que cresce aproximadamente 2-3 mm por mês, com total substituição alcançada em 6-9 meses (KISHABONGO et al., 2014). A dureza da lâmina ungueal e sua aderência ao leito subjacente tornam a unha um apêndice útil e protetor, resistente a trauma e permitindo assim que seja moldado em uma ferramenta afiada (D.DE BERKER et al., 2000).

De acordo com D.de Berker et al., (2000) provavelmente estão presentes na unha humana as proteínas de queratina molecular dura Ha1 \pm 4 e Hb1 \pm 4, constituindo oito proteínas principais e duas proteínas menores Hax e Hbx. Bem como, as queratinas epiteliais isoladas da lâmina ungueal que incluem K1, K10, K5, K14, K6, K16, K17, K9 e

K19 de unha fetal. Ha1 é uma das principais queratinas duras encontradas em unha, representando cerca de 80 a 90% da queratina da unha.

A taxa de crescimento das unhas é altamente variável entre indivíduos, variando de 3 – 1 mm por mês para unhas das mãos e dos pés, respectivamente. Uma unha normalmente cresce completamente em cerca de 6 meses, enquanto a uma unha dos pés aproximadamente 10 - 12 meses (LUBRIZOL LIFE SCIENCE, 2019).

No processo de proteína das unhas, a glicação pode levar seis a nove meses, pois este é o intervalo de tempo para a completa substituição das unhas em humanos, por isso o nível de glicação das unhas sofre flutuações (KISHABONGO et al., 2015).

Corroborando com os autores acima, Resende (2015) reafirma que o crescimento das unhas das mãos é em média 3 mm por mês, possuindo o crescimento completo cerca de seis meses e as unhas dos pés crescem em média 1mm por mês, possuindo crescimento completo entre 12 a 18 meses. A presença de doenças como, por exemplo, onicomicoses e doenças vasculares periféricas e a idade avançada podem diminuir a velocidade de crescimento das unhas.

Desse modo, como o crescimento da placa ungueal é lento, Sihota et al., (2019) salientam quanto a importância do estudo desse material para avaliação dos efeitos da hiperglicemia a longo prazo no organismo. Considerando-se que a morfologia e rugosidade da superfície da unha, densidade do tecido, conteúdo mineral, suas propriedades, o conteúdo da ligação dissulfeto, a composição da proteína e sua estrutura contribuem para a qualidade da placa ungueal.

Em relação a composição estrutural das unhas, temos: matriz, cutícula, lúnula, dobra ungueal proximal e lateral, placa ungueal, leito ungueal e hiponíquio. A matriz está localizada abaixo da dobra proximal e fixa a unha ao seu leito. É a porção geradora, o centro de crescimento da unha. A proliferação celular da matriz dá origem à placa ungueal, estrutura translúcida e retangular localizada entre as pregas proximais e laterais. A lâmina é a maior estrutura da unha, constituída de queratina, sendo produzida na matriz pelos queratinócitos, ficando aderida ao leito. As pregas proximais e laterais formam a junção da unha a pele (MAIFREDE, 2009).

A estrutura da unha possui três camadas (externa para interna) - dorsal, intermediária e ventral. A camada exterior dorsal é densa e dura, consistindo de queratina cornificada, apenas algumas células espessas. As células na superfície dorsal da placa se

sobrepõem e produzem uma superfície lisa. A camada intermediária, em contraste com a camada dorsal, tem uma estrutura altamente fibrosa, na direção do crescimento das unhas e constitui aproximadamente 75% da espessura da placa. Acredita-se que as fibras de queratina sejam mantidas juntas por globular, rico em cisteína e proteínas, cujas ligações dissulfeto agem como cola. A camada intermediária acredita-se ser mais suave e mais grossa. A camada ventral é muito fina e consiste em algumas camadas de células que conectam o prego ao leito ungueal abaixo (LUBRIZOL LIFE SCIENCE, 2019).

Dessa maneira, enfatiza-se que a placa da unha humana tem propriedades físico-químicas que se diferenciam da epiderme, resultando em diferente característica de permeabilidade. Considerando que o estrato córneo se comporta como uma barreira de lipídeo, permitindo a permeabilidade de produtos químicos, a placa ungueal exibe comportamentos semelhantes aos de um hidrogel com alta força iônica e, de fato, a estrutura da unha do ser humano foi comparada a uma membrana de gel hidrofílico (LUBRIZOL LIFE SCIENCE, 2019).

3.3 Composição bioquímica da unha de diabéticos

Com relação a bioquímica da unha, o estudo de Sihota et al., 2019 observou que a concentração de cálcio é comprometida nos pacientes diabético tipo II, quanto ao nível de conteúdo relativo da ligação Carboximetil-lisina (CML), destaca-se uma taxa mais elevada nas pessoas diabéticas. Com relação a estrutura das proteínas, estas apresentam uma estrutura secundária alterada nos pacientes diabético, possuem uma diminuição do conteúdo de Amida I e II. Ou seja, o conteúdo total de proteínas diminui devido ao diabetes. Ressalta-se ainda que o conteúdo da ligação dissulfeto é alto nos pacientes saudáveis, quando comparado com os diabéticos, por tanto o conteúdo total da ligação dissulfeto diminui com o diabetes. E o conteúdo de dissulfeto é o principal responsável pela alteração na integridade estrutural da queratina das unhas.

Dessa forma, o presente estudo, mostrou que o diabetes mellitus tipo 2 afeta a qualidade da placa da unha, alterando sua estrutura, propriedades bioquímicas e materiais. Considera que a hiperglicemia prolongada, leva ao acúmulo de AGEs na matriz ungueal, levando a degradação da qualidade da placa ungueal. No caso de acumulação contínua de AGEs, provoca um estresse prolongado do retículo endoplasmático, levando a uma alteração na sua homeostase, ocasionando uma disfunção celular e apoptose

celular. Estes resultados são consistentes quando comparados com estudos anteriores, que também relataram que a acumulação de AGEs é responsável pela estrutura secundária alterada da proteína, pela diminuição do conteúdo total de proteína, desnaturação de proteínas, síntese anormal de colágeno e alterações na estrutura do colágeno no osso nos diabéticos (SIHOTA et al., 2019).

Nas últimas décadas, determinações de elementos químicos em tecidos biológicos têm se tornado assunto de grande interesse devido principalmente ao aprimoramento dos conhecimentos sobre função de diversos elementos nos organismos vivos e também devido ao aperfeiçoamento de técnicas analíticas que possibilitam a detecção de suas baixíssimas concentrações (RESENDE, 2015).

A determinação dos níveis de elementos químicos no organismo humano geralmente é feita pela análise de fluídos humanos como o sangue e urina que são considerados o padrão ouro para avaliar exposição, porém outros tipos de amostra como a unha também vêm sendo analisadas, uma vez que é parte final do metabolismo de muitos elementos ou produtos que são incorporados em sua estrutura. Na unha saudável podem ser encontrados os seguintes elementos: Ag (prata), Al (alumínio), Au (ouro), C (carbono), Ca (cálcio), Cl (cloro), Co (cobalto), Cr (cromo), Cu (cobre), Fe (ferro), K (potássio), Mg (magnésio), N (nitrogênio), Na (sódio), O (oxigênio), P (fósforo), Pb (chumbo), S (enxofre), Sb (antimônio), V (vanádio) e Zn (zinco). Vários elementos de interesse por sua essencialidade ou toxicidade são acumulados nas unhas, cujos os íons possuem afinidade com os átomos de N, O, S do grupo de proteínas das unhas (SANCHES, 2012).

Reforçando sobre a estrutura das unhas humanas, Kishabongo et al., (2015) ressaltam que é um apêndice tegumentar e forma uma estrutura contínua e integrada com a pele. Como o leito ungueal é uma membrana profunda com nervos, vasos linfáticos e vasos sanguíneos, à medida que as proteínas das unhas são expostas à glicose, provenientes do sangue e fluidos extracelulares através de sua parte do leito ungueal, pode ocorrer a glicação das queratinas ungueais. Por causa da estrutura morfológica das unhas (abundância de reticulações dissulfureto), a difusão de glicose da parte profunda para a parte superficial ocorre muito lento, explicando a concentração diferencial de proteínas glicadas em ambas as camadas da unha humana. Por esse motivo, a concentração de proteínas glicadas na camada profunda da unha é provavelmente melhor

marcador de diabetes mellitus e suas complicações em comparação com a camada superficial.

Os achados de níveis aumentados de frutossamina em cortes de unhas de dedos de pacientes com diabetes mellitus confirma que as proteínas de unhas glicadas poderiam funcionar como um potencial diagnóstico/ prognóstico marcador de diabetes mellitus. A análise de glicação das proteínas de camadas profundas e superficiais da unha contribui para a compreensão de formação de queratina glicada. A maior concentração significativa de frutossamina na camada mais profunda do que na camada superficial da unha sugere que a glicação da queratina ocorre na camada profunda das unhas (KISHABONGO et al., 2015).

Os autores acima relatam ainda, que apesar das diferenças marcantes observadas em valores de glicação de proteína das unhas entre diabéticos e não diabéticos, os valores da proteína de unha glicada correlacionaram-se mal com valores de hemoglobina glicada. Discordâncias entre HbA1c e outras medidas do controle glicêmico são comuns na prática clínica onde esses marcadores refletem diferentes tempos de exposição. Em contraste com a formação de HbA1c, que é um processo intracelular lento que ocorre durante a vida inteira de um eritrócito (cerca de 120 dias), exposição das proteínas das unhas à glicose extracelular é um processo mais longo (> 6 meses), como a transferência da zona basal para a parte distal do prego demora vários meses. Curiosamente, HbA1c não é um substrato para enzimas de glicação como os valores de HbA1c dependem da glicação de valina ligada glicação. A glicação ligada à lisina é um substrato para frutossamina 3 quinases. Esta enzima não foi descoberta no momento HbA1c, foi introduzido como um marcador de diabetes a longo prazo. Atualmente, sabemos que a frutossamina 3 quinase é polimórfica. Além de razões bioquímicas, também a difusão de glicose a taxa do vaso sanguíneo para o leito ungueal pode mostrar variação.

Klonoff (2015) evidenciou em uma pesquisa que em 1989, foi realizado por uma equipe do Japão um estudo comparativo com os graus de proteínas não enzimaticamente glicosiladas em unhas, na pele, cabelo e hemoglobina de 51 indivíduos diabéticos e 20 indivíduos controle sem diabetes. Destacou a Furosina como um intermediário de glicação não enzimática de grupos amino livres em proteínas, resultante como produto final de glicação avançada (AGE). Pode-se perceber no estudo, que os níveis de hemoglobina glicada é o que melhor se relaciona com os níveis de furosina em unhas ($r = 0,58$, P

<0,001) quando comparado com outros dois tecidos examinados. Destacou que a furosina da unha é um bom indicador para avaliação e controle a longo prazo, podendo auxiliar no manejo de complicações da diabetes.

Destaca-se o estudo realizado por pesquisadores do Japão e da China em 2012, onde foi analisado os produtos intermediários de AGEs nas unhas de pacientes diabéticos usando cromatografia líquida de ultra-performance com ionização por espectrometria eletropray de massa. Ressalta-se que as unhas de indivíduos diabéticos, apresentou uma maior concentração do composto intermediário 3-desoxiglucosona (3-DG) quando comparado com as dos indivíduos saudáveis. Constataram que o método proposto fornece com precisão a massa e a detecção de rastreamento de um produto intermediário AGE na unha humana e que essa técnica não invasiva auxilia no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com DM (MIN et al., 2012).

Dois anos depois, em 2014 estudiosos da República do Congo e da Bélgica também ressaltaram que a glicação de proteínas da unha pode ser usada com uma nova ferramenta para a detecção e controle de complicações decorrentes de DM. Observaram a medida de glicação de frutamina das proteínas de unhas estratificadas em pacientes diabéticos com complicações como retinopatia diabética ou nefropatia. Comparou-se a quantidade de glicação com a idade e a Hemoglobina glicada. Detectou-se maior glicação nas unhas de pacientes diabéticos mais velhos e com complicações da doença, do que em pacientes sem complicações. Desse modo, a taxa de glicação aumenta com a idade, devido ao crescimento mais lento das unhas em indivíduos com idade mais avançada. O método utilizado avaliou o período em que a unha foi exposta à glicose de fluidos extracelulares (KLONOFF, 2015).

Destaca-se a importância de ensaios de soro de frutamina que medem a glicação das proteínas séricas e refletem a glicemia durante 2 semanas. Esta análise apresenta várias vantagens aos métodos tradicionais (FPG e OGTT), incluindo uma maior estabilidade pré-analítica e uma melhor interpretação em pacientes com hemoglobinopatias ou anemia. Embora vários estudos tenham demonstrado uma correlação significativa entre frutamina e HbA1c, diferenças entre frutamina e HbA1c em vários estudos também foram relatados. Esse fato pode ser justificado pelo fato de que ambos os marcadores refletem um status glicêmico em intervalos de tempo muito diferentes como consequência de semividas muito diversas (NAYAK et al., 2011).

Marcadores de glicação como a frutossamina permitem o monitoramento da média de níveis de glicose nas últimas semanas. A glicação das proteínas das unhas representa aproximadamente 80% da massa total. Como os cortes de unhas podem ser obtidos facilmente, esses métodos foram considerados como uma abordagem inovadora em vez da análise clássica de sangue. Desse modo, os ensaios químicos têm sido utilizados para investigar a glicação da queratina (COOPMAN et al., 2016).

Ainda corroborando com esses achados Katchunga et al., (2015) reforçam que embora a glicemia sanguínea continue a ser um marcador bioquímico do diabetes mellitus, vários outros marcadores de glicemia (frutossamina, albumina glicada, hemoglobina A1c (HbA1c), 1,5-anidroglicitol) foram propostos para o diagnóstico e acompanhamento desta doença, cada um com suas próprias vantagens e limitações. Visto que, embora o HbA1c seja útil no controle médio de glicose no sangue em diabéticos, esta medida é indisponível na maioria das partes da África. A medição de proteínas de unhas glicosiladas poderia ser usada para monitorar o diabetes mellitus durante um longo período de tempo em indivíduos negros da África. As unhas do dedo crescem lentamente em aproximadamente 2-3 mm / mês com uma substituição completa realizada entre 6 e 9 meses. Este período permite uma longa exposição da unha no meio glicêmico conforme relatado nos estudos citados anteriormente.

Coopman et al., (2016) relatam as diferenças acentuadas nos valores de proteína de unha glicada entre diabéticos e não diabéticos, essa correlação fraca observada entre valores de proteína de unha glicosilados e valores de HbA1c, pode ser explicada pela relação das razões bioquímicas e variação na glicose a taxa de difusão dos vasos sanguíneos para o leito das unhas. Além disso, a falta de correlação entre as concentrações da proteína de unha glicada e os valores de HbA1c também podem ser justificados pelo intervalo de tempo diferente que ambos os parâmetros refletem (substituição total da unha leva 6-9 meses, enquanto um teste HbA1c dá uma indicação dos níveis médios de glicose no sangue durante um período de 2-3 meses).

Estudo de diabéticos evidenciou que os valores de proteínas de unhas glicosiladas foram significativamente maiores do que na população em geral. As proteínas das unhas estão sujeitas a glicação não enzimática. Evidencia pela primeira vez, a aplicação bem sucedida de um nitroblue tetrazolium- teste baseado na medição da glicação da proteína em unhas humanas. A proteína de unha glicada apresentada no ensaio revelou-se

reprodutível. Em contraste com a determinação de glicose, a glicação da proteína das unhas não necessita de avaliação pré-analítica minuciosa. Daí a sensibilidade obtida para a análise de glicação da proteína das unhas é mais vantajoso do que a avaliação de glicose urinária. Visto que, os cuidados pré-analíticos (muitas vezes um problema nas comunidades nos países em desenvolvimento) é muito menos crítico para proteínas de unhas glicadas. Pois a glicosúria pode ser afetada por dieta e diurese (KISHABONGO et al., 2014).

Assim, o teste fornece informações sobre o período em que o a unha foi exposta à glicose extracelular. O método pode ser considerado como uma alternativa para detecção da glicemia a longo prazo. Esses dados corroboram com achados na literatura sobre a glicação da proteína das unhas obtidos em *stratum corneum* de unhas e cabelo. O aumento da taxa nos valores de referência sobre o envelhecimento pode ser explicado pelo crescimento mais lento de unhas, por presença de produto químico, pela composição das proteínas das unhas e pela crescente faixa de referência para a glicose sérica após o envelhecimento (GHASEMI; ZAHEDIASL; AZIZI, 2011).

Ressalta-se que na África rural, esse método pode ter um significado importante, visto que muitos têm uma aversão à amostragem de sangue, a coleta de recortes de unhas é uma alternativa salutar devido ao limiar psicológico muito menor. Além disso, a coleta de recortes de unha não requer profissional capacitado. Em comparação com a glicemia convencional, a fase pré-analítica é muito menos crítica como os cortes de unhas e podem ser armazenados por um longo período, mesmo a 37 °C. O custo do reagente para o teste da unha glicada de proteína é muito menor (custo de reagente: 0.1 dólar / teste), os reagentes podem ser facilmente preparados e o equipamento é simples. Dessa maneira, o teste demonstra ser perfeitamente adequado para países em desenvolvimento. Este estudo ressalta que os resultados sugerem que a determinação de proteínas de unhas glicadas pode ter potencial para servir como marcador de diagnóstico de diabetes mellitus e pode fornecer informações úteis para o gerenciamento de complicações diabéticas em situações quando a amostra de sangue e a análise não são possíveis (KISHABONGO et al., 2014).

Outro estudo também reforça que na África subsaariana, a avaliação das proteínas glicadas em unhas pode ser um marcador importante para o monitoramento de diabetes em comparação com os marcadores clássicos de glicemia como, medição da

concentração plasmática de glicose, teste oral de tolerância à glicose (OGTT) e determinação de HbA1c. Devido a uma fase pré-analítica menos crítica e baixo custo de reagentes. Recentemente, a avaliação da glicação da proteína das unhas foi apresentada como uma alternativa simples para diagnosticar diabetes mellitus em áreas distantes onde têm maiores concentrações de unhas glicadas (KISHABONGO et al., 2015).

Levando em consideração a falta de infra-estrutura e a aversão à amostragem de sangue em algumas populações da África, a medição de proteínas glicadas (frutosamina) em unhas humanas pode ser uma excelente opção em países de baixa renda. A frutosamina (1-amino-1-desoxi-D- frutose) é o resultado de uma reação não enzimática do grupo carbonil de glicose com um grupo amino de proteínas séricas circulantes. Como o teor de proteína das unhas humanas é cerca de 80%, a relação fisiológica de frutosamina / proteína é da ordem de 2-2,5 $\mu\text{mol} / \text{g}$ proteína das unhas. Em recortes de unhas humanas, uma matriz de proteína pura na ausência de interferência é encontrada substâncias que são ideais para testes de frutosamina (KATCHUNGA et al., 2015).

Além das alterações moleculares e bioquímicas, a alta concentração de glicose pode resultar em reações de glicação nas diversas proteínas do corpo. A reação de glicação é conhecida como Reação de Maillard.

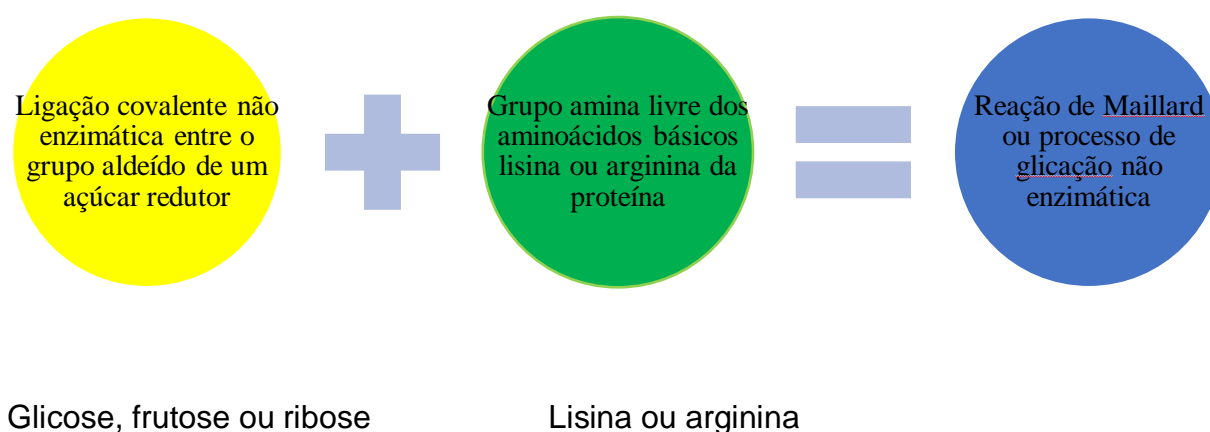
3.4 Reação Maillard

3.4.1 Bioquímica da Reação de Maillard

A reação inicial de Maillard é a condensação do livre grupo aldeído de carboidratos com o f-amino grupo de resíduos de lisina ou hidroxilisina ou o a-amino grupo do aminoácido N-terminal de proteínas. Somente formas abertas de açúcares reagem com proteínas. O grupo carbonilo de um monossacárido acíclico, ligado a um grupo amino da proteína formam a base Schiff. Este produto pode hidrolisar de volta para glicose e proteína ou resultarem em um produto de Amadori formando uma frutosamina, derivada por uma cetoamina estável. Este produto pode ciclizar para uma estrutura em forma de anel (SING; BARDEN; BEILIN, 2001).

3.4.2 - Reação de Maillard

A reação de Maillard também chamada de processo de glicação e de glicolisação não enzimática é resultado de uma ligação covalente não enzimática de uma proteína com uma molécula de um açúcar redutor, como ribose, glicose e frutose. Esta reação pode ocorrer tanto no interior do corpo, sendo chamada de glicação endógena como no ambiente externo chamada de glicação exógena ou pré-formada ou diabética. É uma reação lenta, onde uma pequena parte da glicose de um grupo carbonilo livre sob a forma de cadeia aberta está disponível para a reação com os aminoácidos da cadeia lateral de proteínas (BROWNLEE; CERAMI; VLASSARA, 1988).



A reação ocorre em três etapas. A primeira etapa é a formação da base de Schiff (composto instável formado quando um grupo carbonilo de um açúcar redutor in vivo, reage com o grupo amino livre nas cadeias laterais ou cadeia terminal dos aminoácidos). A segunda etapa se dar quando a base de Schiff sofre rearranjos espontâneos e se transforma em produtos de Amadori (composto mais estável que corresponde a cetoamina). Em seguida os produtos de Amadori, apresentam grupo carbonila reativos que se unem ao grupo amino primários, e depois formar os AGEs (compostos irreversíveis que são proteínas quimicamente modificáveis) (RIBEIRO, SERAVALLI 2003; BOBBIO & BOBBIO, 1995; FENNEMA, DAMODARAN e PARKIN, 2010).

Em outras palavras, a reação de Maillard inicia-se com a formação de base de Schiff instável, gerada pela condensação de grupamento carbonila de açúcar redutor, como a glicose, com um grupamento amina, oriundo, do aminoácido lisina. Em seguida, a base de Schiff sofre rearranjos, tornando essa estrutura mais estável, o produto de

Amadori (produtos iniciais da reação de Maillard). Alguns exemplos de produtos de Amadori são a hemoglobina glicosilada e a frutossamina. Os produtos de Amadori possuem grupos carbonilas reativos, que se condensam com grupos aminas primárias acessíveis, originando os produtos avançados da reação de Maillard – AGEs (MONNIER, 2003).

Reforçando Kishabongo et al., (2015) relatam que no diabetes mellitus, a hiperglicemia provoca uma glicação não enzimática de grupos amino livres de proteínas. Isso é chamado de reação Maillard, que pode ser subdividida em três etapas. O estágio inicial consiste na formação das bases de Schiff, que são intermediários enzimáticos onde o grupo amino, tal como o grupo terminal de uma molécula de lisina reage reversivelmente com o aldeído grupo de glicose (ligação dupla entre o átomo de carbono da glicose e o nitrogênio átomo da molécula de lisina). O próximo passo inclui um rearranjo do Schiff's base, levando à formação de produtos Amadori (o átomo de hidrogênio do hidroxilo o grupo adjacente à ligação dupla carbono-nitrogênio se move para se unir ao nitrogênio, deixando uma cetona). Na última fase, a oxidação dos produtos Amadori leva à formação irreversível de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que são amplamente reconhecidos como a principal causa de complicações diabéticas secundárias. A reatividade do grupo ϵ -amino de uma lisina, o resíduo ou o grupo α -amino de um resíduo N-terminal é o alvo preferencial para a glicação em muitos tecidos humanos. A glicação das proteínas afeta proteínas celulares e extracelulares, como: colágeno, cristalina, albumina e hemoglobina.

Dessa forma Sihota et al., (2019) confirmam que a manutenção de hiperglicemia por longo período de tempo, podem levar a um aumento das reações de Maillard e a conseqüente na formação dos produtos finais de glicação avançada. Os AGEs quando acumulados nos tecidos, reagem de maneira irreversível com resíduos de aminoácidos de peptídeos ou proteínas e formam adutos de proteína ou proteína de ligações cruzadas. Podendo assim, alterar o funcionamento de diversos órgãos, como: coração, rins, nervos, artérias, lentes, tendões, pele, ossos e articulações.

3.4.3 Formação e mecanismo de ação dos AGEs

A formação de AGEs ocorre lenta sob condições fisiológicas, e afeta as moléculas de meia-vida longa, e um exemplo é o colágeno, que exerce função no processo de

envelhecimento. No entanto, sob condições de hiperglicemia ou estresse oxidativo, a geração de AGEs aumenta (FORBES; SOLDATOS; THOMAS, 2005).

Acreditava-se que os AGEs se formavam, a partir de reações não enzimáticas entre glicose e proteínas extracelulares. Porém, por causa da maior reatividade dos precursores dicarbonílicos derivados da glicose gerados intracelularmente (glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona), a alta concentração de glicose intracelular é considerada atualmente o evento iniciador primário da formação de AGEs intra e extracelulares (BROWNLEE, 2005).

Existem os mecanismos alternativos de formação de AGEs chamada “estresse carbonílico”, na qual a oxidação de lipídeos ou de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos. A glicólise e a autooxidação de glicose produzem metilglioxal e glioxal, que interagem com aminoácidos para formar AGEs. A carboximetilisina (CML), a pirralina e a pentosidina são exemplos de AGEs, que em virtude da complexidade e da heterogeneidade das reações que podem ocorrer, apenas poucos AGEs foram claramente identificados e podem ser quantificados em estudos laboratoriais (AHMED, 2005).

A formação de AGEs é predominantemente endógena, mas esses produtos podem ser introduzidos no organismo por fontes exógenas, como o fumo e a dieta (LESLIE et al., 2003).

São três mecanismos básicos que os AGEs podem danificar as células. O primeiro mecanismo é a modificação de estruturas intracelulares, incluindo aquelas envolvidas com a transcrição gênica; o segundo mecanismo é a interação de AGEs com proteínas da matriz extracelular modificando a sinalização entre as moléculas da matriz e a célula, gerando disfunção; e terceiro mecanismo se refere à modificação de proteínas ou lipídeos sanguíneos (BROWNLEE, 2005).

Estas proteínas e os lipídeos modificados pelos AGEs podem, então, ligar-se a receptores específicos, causando a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, que irão contribuir para a patologia da diabetes (BROWNLEE, 2005).

Os AGEs formados intracelularmente podem alterar propriedades celulares importantes para a homeostase vascular. A modificação por AGEs do bFGF (basic fibroblast growth factor), por exemplo, reduz em 70% a atividade mitogênica do citosol das células endoteliais. As proteínas de meia-vida longa que constituem a matriz extracelular

e as membranas basais vasculares são também suscetíveis à formação e ao acúmulo de AGEs (GOLDIN et al., 2006).

A formação de AGEs além de reduzir a solubilidade e a digestibilidade enzimática, compromete também a conformação geométrica dessas proteínas, causando anormalidades estruturais e funcionais permanentes (VLASSARA; PALACE, 2002).

Os AGEs não interferem apenas nas interações entre os componentes da matriz extracelular, mas também nas interações entre as células e a matriz. Entre os mecanismos pelos quais os AGEs podem contribuir para o desenvolvimento e a progressão das complicações vasculares do diabetes, a interação desses compostos com receptores presentes na superfície de diversos tipos celulares merece papel de destaque. Desde as primeiras pesquisas sobre AGEs in vivo, especulou-se sobre a possível existência de sistema de receptores para AGEs, responsável pela remoção desses produtos nos tecidos, limitando seus efeitos deletérios. Demonstrou-se, originalmente, que as proteínas modificadas por AGEs eram reconhecidas por receptores específicos que foram associados aos sistemas de receptores scavenger. Sabe-se da existência de um complexo sistema de reconhecimento de AGEs, que exerce importante função na patologia associada ao diabetes (VLASSARA; PALACE, 2002).

O estudo de Martin et al., (2016) cujo objetivo era identificar os marcadores de AGEs na pele humana por espectroscopia Confocal Raman in vivo, constatou a presença dos AGEs pentosidina e glucosepan através da espectroscopia Raman da hidroxiprolina e prolina, atribuível aos modos da amida III alfa-helicoidal e na região Amida I. Os espectros vibracionais calculados de pentosidina e glucosepan foram realizados por meio da Teoria do Funcional da Densidade usando o funcional B3LYP com conjunto de base 3-21G. O estudo observou ainda a presença de alterações na derme de pessoa idosa, decorrentes tanto do envelhecimento cronológico como do envelhecimento causado pela glicação.

Na análise realizada por Guevara et al., (2018) da correlação dos espectros Raman em vários locais da pele, identificou-se que os AGEs glioxal-lisina e Hidroimidazolona derivada de metilglioxal se acumulam no tecido de pacientes diabéticos, isso ocorre devido a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, e ainda a detecção da pentosidina foi observada nesses pacientes. Destacando-se dessa maneira a relação entre os espectros identificados no estudo e as moléculas relacionadas a complicações diabéticas, como os AGEs.

3.5 Análise das unhas por espectroscopia óptica

O estudo de Coopman et al., (2016) mostra a aplicação bem sucedida de espectroscopia ATR-FTIR para medir a concentração de glicose nas proteínas de unhas humanas. O processo de glicação, no espectro infravermelho entre 970 e 1140 cm^{-1} utilizada numa área caracterizada por uma boa absorção de carboidratos. Usando uma conversão Fator de 388, o valor AUC 970-1140 cm^{-1} pode ser convertido em uma concentração calculada de frutossamina. O presente método tem como vantagem a não implicação de condições pré-analíticas, pois mesmo armazenamento prolongado (até 2 semanas) a 37 °C não afetou os resultados do teste. É uma alternativa interessante para avaliação do controle metabólico de diabéticos nos países do terceiro mundo devido ao seu limiar psicológico muito menor para a amostragem, sem a necessidade de pessoal treinado, medicamentos e ainda o baixo custo de reagentes.

No estudo de Guevara et al., (2018) realizado em diferentes locais do corpo humano, como: da orelha, braço lóbulo interno, unha do dedão e veia cubital mediana de indivíduos diabéticos tipo II e indivíduos saudáveis, observou-se que a espectroscopia Raman associada a análise de componentes principais (PCA), combinadas com a máquina de vetores de suporte (SVM) podem classificar os níveis de hemoglobina glicada in vivo. E ainda, a quantificação in vitro de albumina glicada em amostras de soro.

Destaca-se assim, a glicação de ATR-FTIR e os pós de unha não glicosilados foram confirmados in vivo pela significância de maiores concentrações calculada de frutossamina nas unhas de diabéticos em comparação com os de indivíduos saudáveis. O crescimento de uma unha é de aproximadamente 2 a 3 mm por mês. Isso resulta em uma substituição completa em 6 para 9 meses. Uma taxa de difusão mais lenta das moléculas é encontrada nas unhas em comparação com soro. Resultado de um menor grau de glicação nas unhas, embora a vida útil de um segmento de unha seja mais longa (COOPMAN et al., 2016).

Contudo, além da técnica ATR-FTIR, a espectroscopia Raman tem sido amplamente aplicada para a avaliação de tecidos humanos, cabelos e unhas, a fim de se caracterizar bioquimicamente tais materiais, bem como evidenciar o efeito de produtos nos mesmos (SHIN et al., 2016; OLAYA-JUSTICE et al., 2013; PUDNEY et al., 2013; LANDEMANN, 2009).

3.6. Espectroscopia Raman Confocal

3.6.1 Breve Histórico

A Espectroscopia Raman foi citada teoricamente em 1923 por Smekal mas em 1930 o Prêmio Nobel de Física foi concedido à C. V. Raman, o cientista responsável pela descoberta do efeito sobre a dispersão de luz que recebe seu nome, em um trabalho publicado em 1928. Nesse estudo, tem-se a primeira descrição da dispersão inelástica da luz. Há aproximadamente 10 anos foi iniciada a sua utilização em análises biológicas devido ao advento de detectores que possibilitam alta sensibilidade e a novas técnicas de laser com radiação monocromática e espectrógrafos com boa dispersão. Na pele humana pode ser feita uma caracterização espectral detalhada das diferentes camadas e de seus principais constituintes bioquímicos e assim buscar novas alternativas para prevenção e tratamento de afecções dermatológicas e do processo de senescência cutânea (TFAYLI et al., 2007; GLENN, 2001; HANLON et al., 2000; BALL, 2001).

Dessa maneira, a técnica de espectroscopia Raman in vivo permite identificar e caracterizar, em tempo real, as alterações bioquímicas de tecidos vivos. Ressalta-se ainda a alta sensibilidade e especificidade, a praticidade por ser uma técnica não invasiva, podendo ser utilizada para estudo dos principais constituintes da pele, como lipídeos, proteínas e água. Através da espectroscopia Raman ocorre o espalhamento da luz após interação com o material, alterando suas vibrações moleculares. Assim, o espectro vibracional fornece a impressão digital da amostra, refletindo seus grupos funcionais (CARTAXO, 2008).

3.6.2 Mecanismos de Funcionamento da Espectroscopia

De acordo com Dos Santos et al., (2017) o efeito Raman consiste na análise das frequências de oscilação das moléculas contidas em uma determinada amostra. Sendo que o modo de vibração ou oscilação da molécula está intimamente relacionado com a característica da geometria e as ligações químicas dessas moléculas (DAS, R. S., AGRAWAL, 2011). Desse modo, a espectroscopia Raman mede o espalhamento inelástico do laser, quando a radiação monocromática irradiada pela luz do laser incide sobre a molécula e caracteriza-se pela conservação de energia.

É importante ressaltar que são descritos 3 mecanismos da dispersão luminosa refletida de uma dada molécula: espalhamento Rayleigh, espalhamento Stokes e

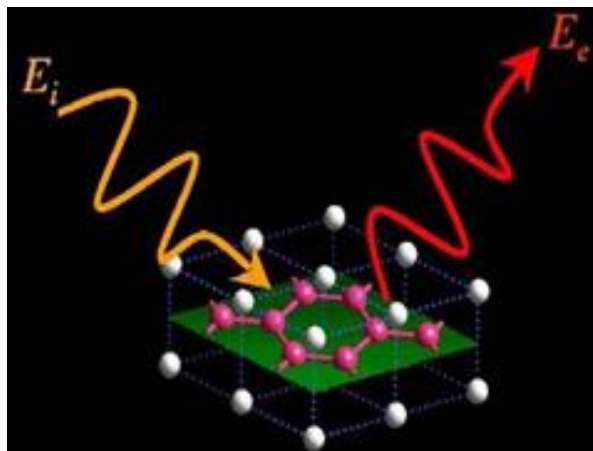
espalhamento anti-Stokes. Enquanto o primeiro versa sobre uma dispersão elástica da luz, os seguintes versam sobre a dispersão inelástica de uma fonte luminosa monocromática. O espalhamento anti-Stokes e o Stokes, juntos constituem a espectroscopia analisada por Raman em ambos os casos, a frequência de energia espalhada é equivalente a diferença de energia entre dois estados vibracionais e essa diferença de energia é um efeito da interação entre o fóton e as vibrações da molécula (SALA, 1995; MOVASAGHI et al., 2007; ALI, 2011).

A dispersão elástica da luz é aquela onde o fóton é absorvido e emitido sem haver modificação na frequência (dispersão de Rayleigh). Esse processo é considerado inelástico quando há modificação na energia do fóton, e conseqüentemente na sua frequência (dispersão anti-Stokes e Stokes).

Essa modificação da energia do fóton ocorre devido ao estado de excitação e do decaimento ao estado pré-excitatório dos elétrons da molécula (LINDON, 2000). Esse processo, ao alterar a frequência do fóton, produz uma espécie de “fingerprint” molecular, ou seja, determina a espectroscopia específica da amostra, com um detalhamento da constituição química e estrutural da amostra analisada. (RALBOVSKY, 2020).

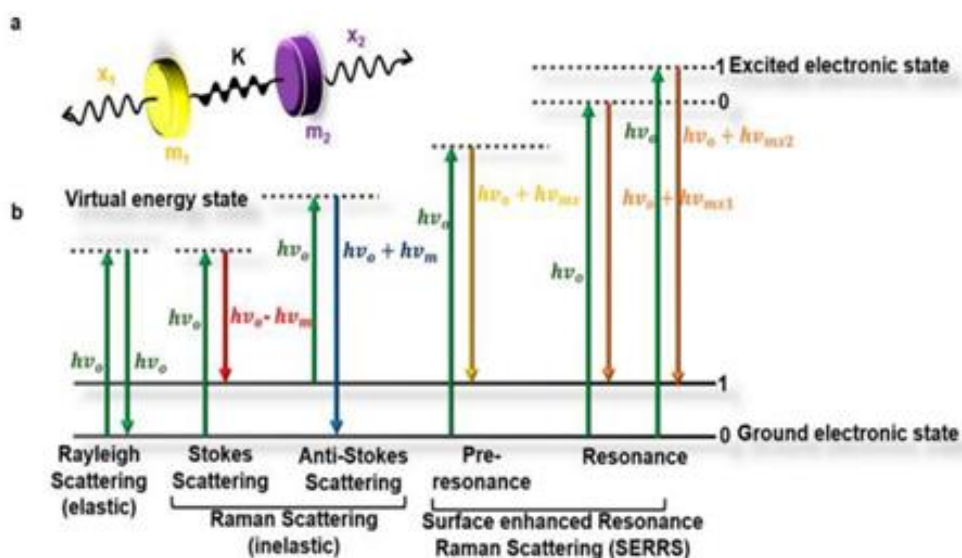
Deste modo, com a espectroscopia vibracional apresentada por Raman, é possível analisar a composição, os grupos funcionais que compõem a matéria e até mesmo as interações interatômicas da molécula (RALBOVSKY, 2020). Por tal razão, a Espectroscopia Raman (ER) passou a ser empregada no estudo da física da matéria, aplicações em química, bioquímica, farmacologia, ciências biológicas e da saúde, como um método analítico de substâncias e demonstrando grande potencial para a área de testes diagnósticos.

Figura 1 - Esquema representando a interação da molécula com a energia de um fóton incidente e energia de um fóton espalhado



Fonte: Ferraro (2013)

Figura 2 - Processo de dispersão luminosa de um fóton excitado



Fonte: CHAICHI et al., 2018

A espectroscopia vibracional se baseia no estudo do espalhamento inelástico da luz incidente (RAMAN, 1928). Desta forma, grupos funcionais que constituem as moléculas do cabelo, pele, unhas ou cosméticos interagem com a luz, passam para estados excitados de vibração e, ao decaírem para estados diferentes do inicial, reemitem luz outros comprimentos de onda (LINDON, 2000). Cada grupo funcional constituinte das biomoléculas vibra em uma frequência característica e espalha a luz em frequências

específicas. Assim, a coleção de espalhamentos provenientes das interações com as diferentes moléculas traz uma assinatura sobre a constituição química e estrutural do tecido (CHRIT et al., 2005).

Cada grupo funcional constituinte das biomoléculas vibra em uma frequência característica e espalha a luz em frequências específicas (ou seja, possui seu “fingerprint”), assim percebe-se o potencial da ER para identificação dos grupos funcionais que constituem as moléculas do cabelo, pele, unhas e componentes sanguíneos, permitindo diferenciar as amostras, e até mesmo o comprometimento das mesmas, caso existente.

De acordo com Guevara et al., (2018) a espectroscopia Raman é uma ferramenta promissora para detecção de condições metabólicas de modo não invasivo. Essa técnica totalmente ótica eliminaria a dor e a invasividade tanto das medições clínicas quanto do monitoramento da glicemia em pacientes diabéticos.

3.6.3 Classificação da Espectroscopia Raman

A Espectroscopia Raman pode ser classificada de acordo com sua fonte de luz, podendo ser na luz visível, no infravermelho e na luz ultravioleta. Os lasers utilizados são Neodímio (Nd: YAG), Argônio e Titânio-Safira (Ti: Safira), porém mais recentemente, os lasers de LED são empregados em várias aplicações (SALA, 1995). Também pode ser classificada de acordo com a tecnologia empregada que pode ser por Transformada de Fourier, conhecida como FT-Raman, de Sistemas Dispersivos e Raman confocal (FENDEL; SCHRADER, 1998). O FT-Raman e o Raman Dispersivo, não permite a avaliação separadamente das diferentes camadas da pele humana, sendo sua detecção possível através do sistema Raman confocal. Com este sistema, poderemos examinar as camadas da pele por profundidade com resolução espacial de até 1 μm e em uma profundidade de até aproximadamente 180 μm . Maior especificidade molecular tem sido obtida quando comparadas as técnicas de espectroscopia de fluorescência com a espectroscopia de absorção no infravermelho e espalhamento Raman.

Análise do espectro de luz absorvida (IR) ou espalhada no caso do Raman fornece informações moleculares sobre a composição estrutural e bioquímica do material em análise possibilitando assim a detecção de ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos e proteínas como o colágeno, fornecendo espectros característicos que podem ser

utilizados para fins diagnósticos (TEH et al., 2008; MARTINHO et al., 2008). Assim, o espectro vibracional é considerado a impressão digital exclusiva de cada molécula e pode ser utilizada para identificar todas as moléculas presentes em uma amostra complexa como a pele (EGAWA; TETSUJI; MOTOJI, 2007; TEH et al., 2008; DARVIN et al., 2007; LIEBER et al., 2008; PENTEADO et al., 2008).

3.6.4 Funcionamento e usos atuais da Espectrografia Raman

Um estudo comparativo da composição bioquímica e estrutural de pele, cabelos e unhas foi realizado por Gniadecka et al., (1998) mostrando as particularidades de cada região. Pelo posicionamento dos picos de amida I e III, eles observaram que a maioria das proteínas possuem uma estrutura alfa hélice, tanto em pele como em cabelos e unhas. Já o posicionamento das bandas de S-S mostra uma estabilidade maior das ligações dissulfeto em cabelos e unhas. De fato, estas bandas são assinaturas de manutenção estrutural de proteínas como queratina (WILLIAMS, 1994)

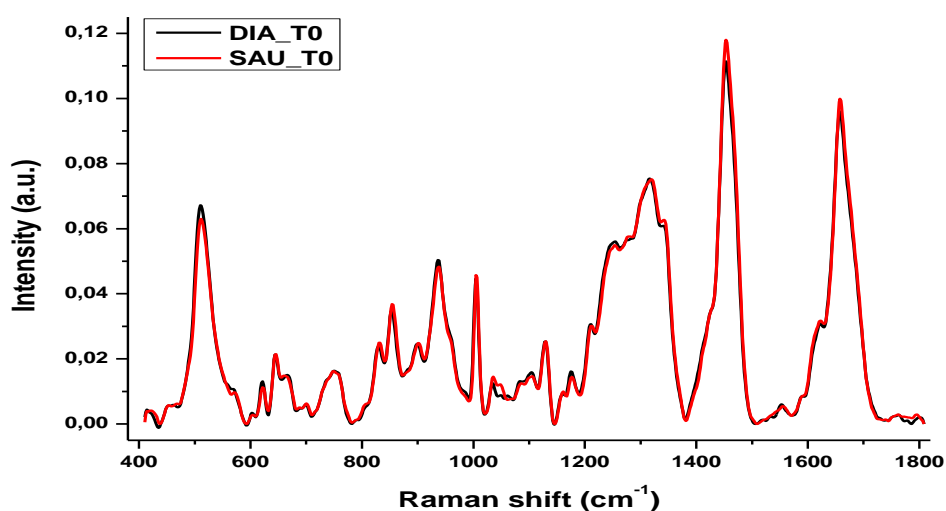
Neste contexto torna-se possível estabelecer biomarcadores e sua assinatura espectroscópica, e utilizar a ER para diferenciar amostras comprometidas das saudáveis. Além dessa diferenciação, há a possibilidade de detectar múltiplos biomarcadores em uma mesma leitura, que torna plausível a realização de uma gama de testes diagnósticos a partir de uma mesma leitura, resultando em um mapeamento bioquímico e espacial dos constituintes do tecido, podendo ser aplicado para investigação de permeação de ativos ou modulação bioquímica (CHRIT et al., 2005).

Recentemente a espectroscopia Raman está sendo aplicada para auxiliar a caracterização da eficácia de produtos cosméticos em pele (CASPER, 1999; KNUDSEN, 2002; LANDEMANN, 2009), cabelos (PUDNEY, 2013; KALASINSKI, 1996; KUZUHARA, 2005; KUZUHARA, 2006; PANDE, JACHOWICZ 1993, SCHLUCKER, 2006) e unhas (SHIN, 2016; WILLIAMS, 1994; CUMMINS, 2010; ALI,2008; OLAYA-JUSTICE,2013). Neste sentido, o Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica já realizou vários estudos e publicou dezenas de artigos indexados internacionais desde 2012 (DOS SANTOS, 2016; MENDES, 2016; PEREIRA, 2015; TOSATO, 2015; TÉLLEZ, 2015; TEIXEIRA, 2014; TOSATO, 2012).

A composição dos dedos e das unhas são influenciadas por diversos fatores fisiológicos e processos patológicos. A espectroscopia Raman em amostras de unhas já

se mostrou efetiva na investigação forense para detecção de resíduos nas unhas humanas (ALI,2008; OLAYA-JUSTICE,2013). Utilizada para investigar a recuperação de unhas após tratamentos anti-micóticos (SHIN,2016), associações entre sinal Raman da unha e qualidade dos ossos (CUMMINS, 2010). O espectro típico de unha é visto na Figura 3.

Figura 3 - Espectro Raman de unha humana.



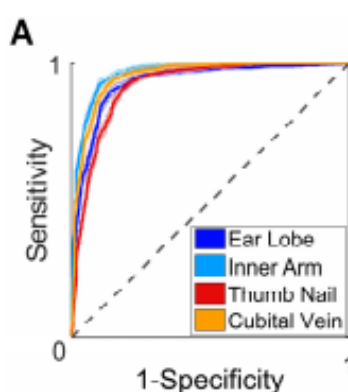
Fonte: A AUTORA, 2021.

Martin et al, (2016) conseguiu identificar a diferença no espectro Raman da derme, de idosas diabéticas e mulheres jovens saudáveis, e entre idosas saudáveis e mulheres jovens saudáveis. Esse processo foi capaz de identificar através da espectroscopia Raman confocal as alterações específicas na conformação da prolina e da hidroxiprolina e do colágeno tipo I na derme reticular da pele de pessoas idosas resultante da glicação não enzimática do colágeno tipo I. Ressaltam ainda, que na pele de mulheres idosas com diabetes mellitus a síntese de colágeno tipo I diminui rapidamente tem em vista a presença marcante de AGEs.

Guevara et al., (2018) utilizou um espectrômetro Raman portátil para investigar a diabetes tipo 2. Na pesquisa, foi utilizado a espectroscopia Raman associada a outras técnicas, usando redes neurais artificiais (RNA). Para comparar o desempenho da RNA aos métodos mais tradicionais usados em espectroscopia, foi realizada a análise de

componentes principais (PCA) gerando assim um modelo de máquina de vetores de suporte (SVM) em indivíduos diabéticos e saudáveis de quatro sítios diferentes (lobo da orelha, parte interna do braço, unha do dedão e veia média cubital). Com o sucesso do algoritmo, o mecanismo se mostrou uma ferramenta promissora e não invasiva para detecção de diabetes tipo 2. Uma análise da especificidade e sensibilidade dos tecidos analisados é mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Sensibilidade x Especificidade para diagnósticos de Diabetes tipo 2 por tipo de amostra.



Fonte: GUEVARA, 2018.

Em um estudo no qual foi feita a ER em amostras sanguíneas, em pacientes com diabetes (utilizando a Espectroscopia Raman Espontânea), foi observado 96% de sensibilidade e 99% de especificidade, demonstrando o potencial desse tipo de teste para pacientes com diabetes (RALBOVSKY, 2020).

Dentre os sistemas de espectroscopia Raman disponíveis atualmente, a ER confocal in vivo se apresenta como um método não invasivo, utilizando um microscópio confocal, realiza a análise dos constituintes biomoleculares sem que haja a necessidade de dissecação tecidual. Esse sistema é composto por uma fonte de luz monocromática (LASER), um espectrômetro e um detector. Ao ocorrer a dispersão luminosa, parte dessa é capturada pelo espectrômetro que separa as frequências do fóton produzindo o espectro Raman, como pode ser observado na Figura 5.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo clínico multicêntrico (Universidade Brasil-SP e Fundação Municipal de Saúde de Teresina/PI), comparativo, randomizado e instrumental, com abordagem quantitativa e qualitativa envolvendo seres humanos.

4.2 Aspectos éticos e legais

A presente pesquisa, por se tratar de uma pesquisa que envolve seres humanos, os seus aspectos éticos e legais atenderam a resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012, considerando que todo o progresso e seu avanço devem sempre respeitar a dignidade, a liberdade e a autonomia do ser humano.

Foi explicado a todos os participantes o teor da pesquisa podendo os mesmos manifestar-se de forma autônoma, consciente, livre e esclarecida.

A pesquisa foi autorizada pela comissão de ética e pesquisa da instituição de saúde coparticipante (Fundação Municipal de Saúde), logo após foi realizada a submissão na Plataforma Brasil sob o CAAE: 01968718.6.0000.5494, seguida da aprovação pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Brasil sob o número: 3.066.001.

4.3 Local da Pesquisa

O local de coleta de amostras foi o Centro Integrado Lineu Araújo de Teresina após autorização da Fundação Municipal de Saúde de Teresina e do CEP da Universidade Brasil. A análise por Espectroscopia Raman Confocal foi conduzida no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da Universidade Brasil.

O trabalho foi realizado de acordo com o cronograma estabelecido e obedecendo as etapas a seguir: construção da biblioteca espectral, análise das amostras, tratamento dos dados e análise estatística.

4.4 Seleção de Participantes da Pesquisa

Para a pesquisa foram selecionados uma amostra total de 60 participantes, sendo 30 saudáveis e 30 diabéticos tipo II.

Como critérios de inclusão da pesquisa foram selecionados adultos entre 45 e 65 anos, sexo masculino e feminino, diabéticos tipo II (comprovado através de exames de sangue de glicemia e hemoglobina glicada), que apresentavam as unhas íntegras na região a ser testada, que concordaram em participar de todo o procedimento, em comparecer no centro de pesquisa nos dias e horários determinados e em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os critérios de exclusão da pesquisa foram: estarem gestantes/lactentes ou com intenção de engravidar no período do estudo, possuírem patologias ou lesões ativas no local da área de avaliação, serem portadores de imunodeficiência congênita ou adquirida conhecida, possuírem histórico clínico relevante ou atual do uso de álcool ou outras drogas, tratamento estético ou dermatológico na área da avaliação até 2 semanas antes da seleção, e outras condições consideradas pelo avaliador como razoáveis para desqualificação da participação da pesquisa.

Os selecionados foram informados sobre todo o procedimento da pesquisa e convidados a participarem. Aos que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Em seguida foi realizada a anamnese (questionário em anexo) e orientados quanto aos dias e horários da realização do corte da unha e da solicitação dos exames laboratoriais (glicemia de jejum e hemoglobina glicada), antes do corte do fragmento da unha.

Com o intuito de validar o diagnóstico por espectroscopia Raman, os resultados precisaram ser validados pelo padrão-ouro, ou seja, pela coleta de sangue e análise bioquímica.

4.5 Desenho do estudo

Os participantes que aceitaram participar da pesquisa foram distribuídos em 2 grupos: saudáveis e diabéticos. Grupo 1: Grupo controle (n=30) e Grupo 2: Grupo Diabético (n=30).

4.6 Coleta dos Dados da Pesquisa

A coleta de dados da pesquisa foi realizada no Centro Integrado Lineu Araújo da Fundação Municipal de Saúde de Teresina no período de setembro de 2019, e conduzido para o Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da Universidade Brasil /SP.

Os dados da pesquisa deram-se pela coleta dos fragmentos de unhas, as amostras das unhas ocorreram pelo corte da unha íntegra na região a ser testada, utilizando a mão direita e a unha do dedo mínimo e pelos resultados dos exames laboratoriais de glicemia de jejum e hemoglobina glicada dos participantes da pesquisa.

Primeiramente, solicitou-se aos participantes da pesquisa a coleta dos exames laboratoriais de glicemia de jejum e hemoglobina glicada, após resultados iniciou-se a coleta do fragmento da unha. Como critério para haver os cortes das unhas, os participantes foram orientados de que não poderiam usar esmaltes e qualquer outro produto nas unhas, não cortarem e manterem as unhas limpas e íntegras. Antes do corte da unha, foi realizado uma escovação das mesmas com água e sabão neutro para reduzir possíveis interferências devido a contaminações.

4.7 Análise das Amostras da Pesquisa

A análise das amostras foi realizada Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da Universidade Brasil /SP, que possui infraestrutura adequada para análise dos dados, sob adequada paramentação conforme as precauções universais e normas de biossegurança do Ministério da Saúde e de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (com o consentimento livre e esclarecido do responsável).

Este trabalho foi realizado de acordo com o cronograma estabelecido e obedecendo as etapas: construção da biblioteca espectral, análise das amostras, tratamento dos dados e análise estatística.

Figura 6 - Infraestrutura do laboratório onde os experimentos foram conduzidos.



Fonte: Bello, 2020.

4.8 Medidas por Espectroscopia Raman Confocal

As medidas dos fragmentos de unha foram feitas na região distal, por meio da espectroscopia Raman confocal, com o Sistema Raman Confocal (Modelo Xplorer - Horiba) acoplado a um laser de energia de excitação de 785nm e potência de aproximadamente 15 mW. A luz do laser foi centrada na superfície da unha com uma objetiva de microscópio (100x). O sinal Raman foi coletado por uma câmera Charge Coupled Device (CCD) e registrado por um computador. A aquisição espectral ocorreu na região com o número de onda de 400-1800 cm^{-1} .

O pré-processamento dos dados incluiu a correção de linha de base, todos realizados pelo software Labspec (Horiba JobinYvon, França). Alguns ruídos específicos oriundos de raios cósmicos foram eliminados usando o recurso de remoção de pico deste software. As definições de parâmetros de suavização para reduzir os efeitos de ruído foram aplicadas utilizando o filtro Savitzky-Golay (tamanho 9, grau 5). A fluorescência presente nos dados foi eliminada subtraindo uma linha de base usando o ajuste polinomial (grau 7). Seguindo essa subtração, os espectros foram normalizados vetorialmente para eliminar as diferenças sistemáticas entre as medições.

4.9 Análise estatística

Antes de se iniciar a análise estatística, todos os dados foram avaliados por análise hierárquica de cluster, a fim de se verificar a disposição das amostras em clusters do dendrograma e para a visualização de possíveis *outliers*. Após este processo de eliminação de *outliers* e conhecimento do perfil das amostras, foram realizadas as avaliações a partir das médias espectrais de cada grupo, fato que permitiu evidenciar as principais características bioquímicas entre os grupos, realizando, portanto, a caracterização bioquímica das unhas.

A análise estatística escolhida para a observação dos principais picos marcadores e que poderiam ser utilizados para o diagnóstico dos participantes diabéticos do estudo foi feita por meio dos testes de análise de componentes principais (PCA) e a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). A técnica de PCA, método não supervisionado, uma vez que os grupos são avaliados sem nenhum tipo de classificação, teve como finalidade identificar as componentes principais (PCs) que melhor explicavam a

variabilidade entre os grupos, permitindo assim, a classificação da mesma por meio de comparações (MARTIN et al., 2007). Já a técnica de PLS-DA, método supervisionado, pois é desenvolvido mediante o conhecimento prévio das classes do conjunto de calibração. Neste tipo de análise são construídos modelos de regressão que realizam a calibração do modelo, posteriormente os dados são colocados no modelo para a validação, que pode separá-los ou não em seus respectivos grupos.

Para se avaliar as diferenças na conformação secundárias das proteínas, foi realizada a análise de deconvolução, envolvendo a região de 1580 a 1720 cm^{-1} , atribuída a amida I.

5 RESULTADOS

Nesta seção, são mostrados os resultados obtidos no estudo.

5.1 Caracterização dos participantes

Na avaliação dos aspectos relacionados a idade e gênero dos participantes de estudo, notou-se que em relação ao gênero, no grupo de não diabéticos, 09 pertenciam ao gênero masculino e 21 ao gênero feminino, correspondendo a 30% e 70%, respectivamente. Quanto aos pacientes diabéticos tipo 2, 08 foram do gênero masculino e 22 do gênero feminino correspondendo a 26,7% e 73,3% respectivamente. A média de idade dos pacientes foi de 48,4 (\pm 5) anos para os não diabéticos e de 55,7 (\pm 8) anos para os diabéticos. Todos os dados podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de voluntários diabéticos e não-diabéticos quanto ao gênero e média de idade.

Não diabéticos n: 30			Diabéticos n: 30		
Masculino	Feminino	Média de idade	Masculino	Feminino	Média de idade
09 (30%)	21 (70%)	48,4 (\pm 5)	08 (26,7%)	22 (73,3%)	55,7 (\pm 8)

Fonte: o autor.

5.2 Exames bioquímicos

Os valores laboratoriais para diagnóstico de normoglicemia e diabetes mellitus (DM) adotados pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) e recomendados pela Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association*, ADA) considera o valor de glicemia de jejum (mg/dL) < 100 como normal e \geq 126 como indicador de diabetes mellitus. Para hemoglobina glicada % (HbA1c), os valores são: < 5,7% - normal e \geq 6,5% - diabetes mellitus (SBD, 2017/2018).

A tabela 2 se refere a média no valor da glicemia de jejum e hemoglobina glicada (HbA1c) dos pacientes não diabéticos e Diabéticos tipo 2. O grupo referido como não diabético, apresentou um valor médio de 89,56 mg/dL (\pm 5,6) de glicemia de jejum e 5,14% (\pm 0,23) de HbA1c. O segundo grupo referido como grupo diabético, mostrou um nível médio de glicemia de jejum 184,96 (\pm 88,1) e 8,38% (\pm 2,1) de HbA1c.

Tabela 2 - Média dos valores de glicemia em jejum e hemoglobina glicada (HbA1c) de voluntários diabéticos e não-diabéticos.

Exames	Não Diabéticos n: 30	Diabéticos n: 30
Glicemia de jejum (mg/dL)	89,56	184,96
Hemoglobina glicada (%)	5,14 (\pm 0,23)	8,38 (\pm 2,1)

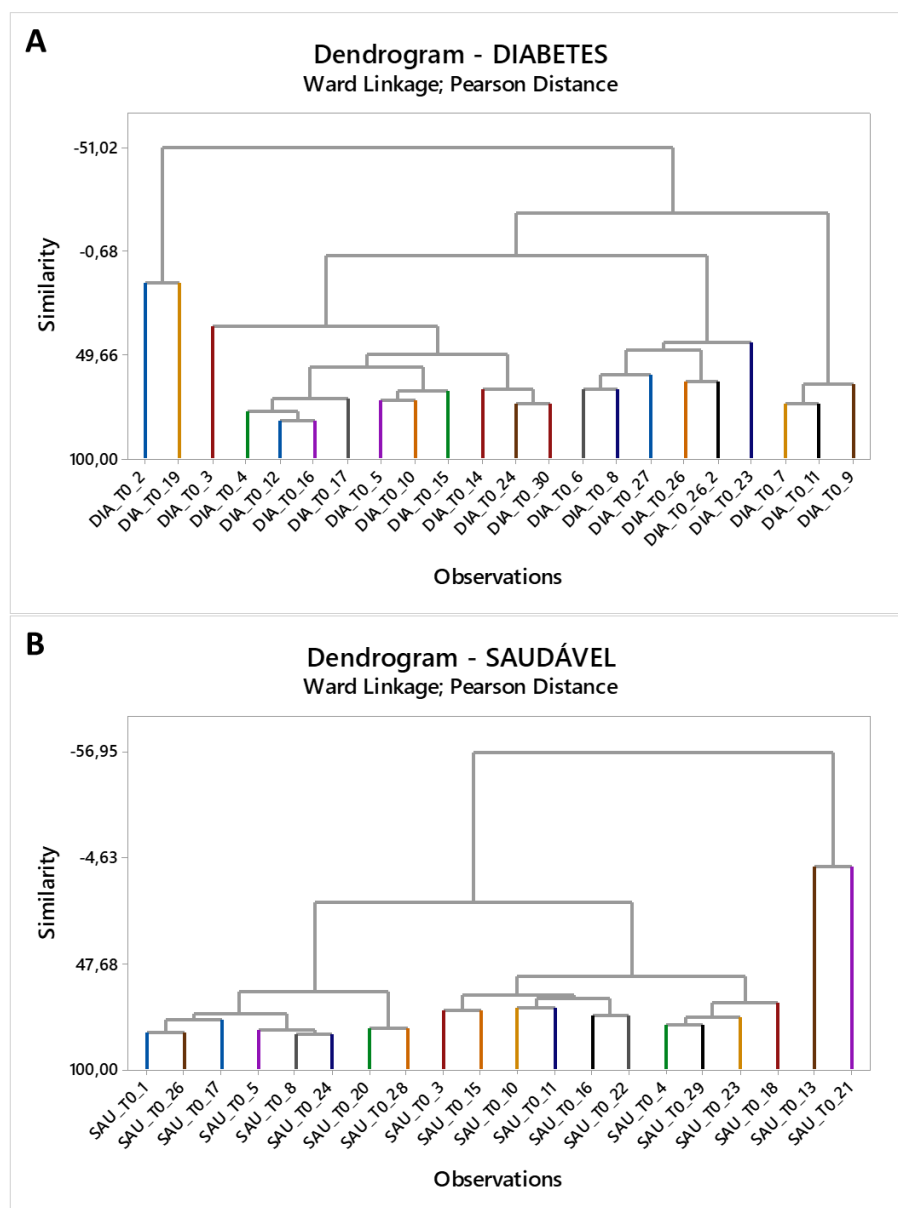
Fonte: o autor.

5.3 Análise dos espectros Raman

No presente estudo, o qual teve o objetivo de avaliar a unha de participantes com diabetes em relação a unha de pacientes não diabéticos, foram avaliadas 60 amostras de unha de participantes de estudo, sendo 30 diabéticos e 30 não diabéticos.

Após as primeiras avaliações, as quais envolveram a análise do perfil espectral e a análise pela técnica de análise hierárquica de cluster, foram removidas 3 amostras do grupo diabéticos (DIA) por serem *outliers*, ou seja, amostras que não apresentaram uma boa qualidade espectral para análise, representando 12%; para o grupo não diabético, classificado em nosso estudo como saudável (SAU), tiveram de ser removidas 2 amostras (8%), também classificadas como *outliers* (Figura 7 A-B). Tal procedimento é padrão, uma vez que amostras de baixa qualidade espectral, podem interferir nos resultados finais do estudo.

Figura 7 (A-B) - Dendrogramas realizados para verificação da homogeneidade dos espectros Raman e verificação da presença de outliers. A: Grupo diabetes; B: Grupo saudável.



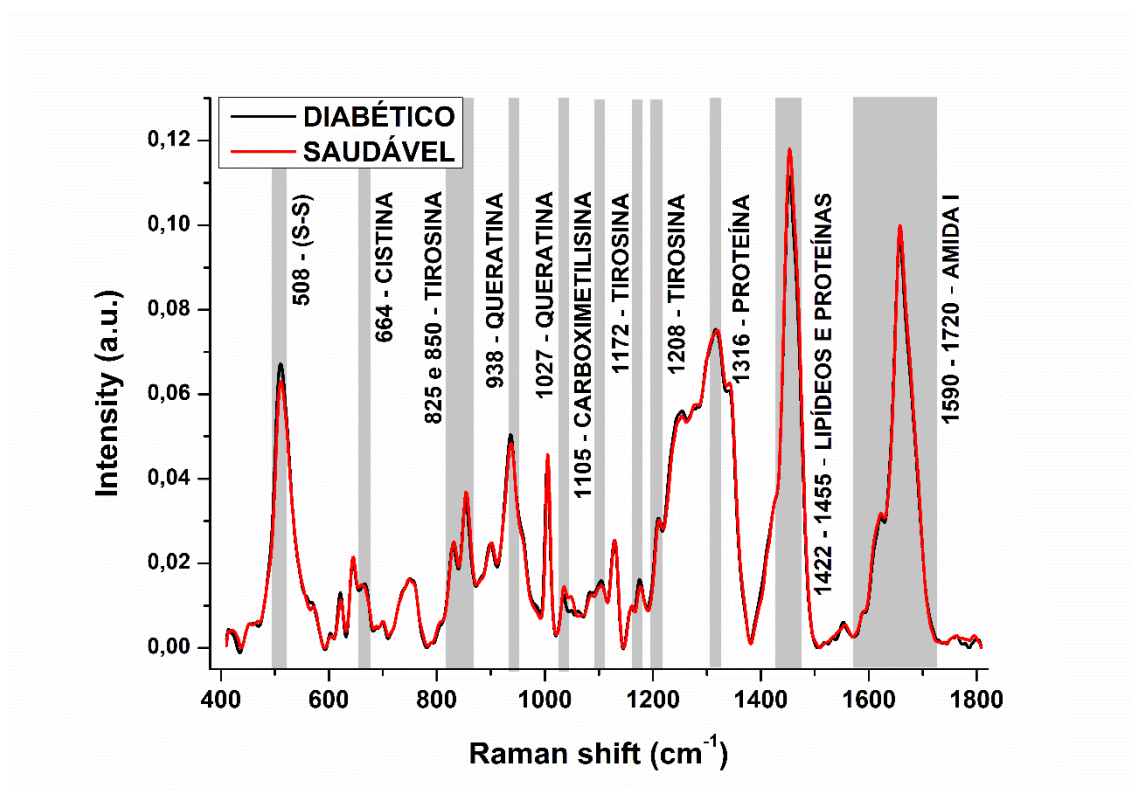
Fonte: o autor.

Após todos os procedimentos de tratamento dos dados, foram geradas as médias para os dois grupos avaliados: não diabéticos, renomeados como saudáveis, e diabéticos.

Pela observação dos espectros, foi possível notar uma grande semelhança entre os espectros médios provenientes de unhas diabéticas e de unhas saudáveis, diferindo apenas, para alguns picos, em relação a intensidade dos mesmos. Os picos evidenciados nas unhas e que poderiam ser importantes marcadores para o diagnóstico de pacientes

diabéticos foram marcados na Figura 8 e correspondem em sua maioria às ligações de enxofre (S-S), queratina, aos aminoácidos tirosina e cistina, a carboximetilisina e a região de Amida I, característica de proteínas e lipídeos. Todos os principais picos evidenciados pelas médias espectrais podem ser observados na Tabela 3 com suas respectivas atribuições.

Figura 8 - Espectros Raman médios para os grupos avaliados no intervalo espectral de 400 a 1800 cm^{-1} .



Fonte: o autor.

Tabela 3 - Principais picos identificados e suas respectivas atribuições.

Picos (cm^{-1})	Atribuição
508	Ligações dissulfídicas (S-S)
664	C-S estiramento de cistina
825	$\delta(\text{CCH})$ alifáticos, tirosina
850	$\delta(\text{CCH})$ aromáticos, tirosina
938	$\nu(\text{C-C})$, estrutura α -hélice, queratina
1027	$\nu(\text{C-C})$ fenilalanina, queratina

1105	Carboximetilisina
1172	$\nu(\text{C-C})$ tirosina
1208	Tirosina e fenilalanina
1316	$\delta(\text{CH}_2)$ deformação em proteínas
1422-1455	Região de $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ - lipídeos e proteínas
1590-1720	Amida I

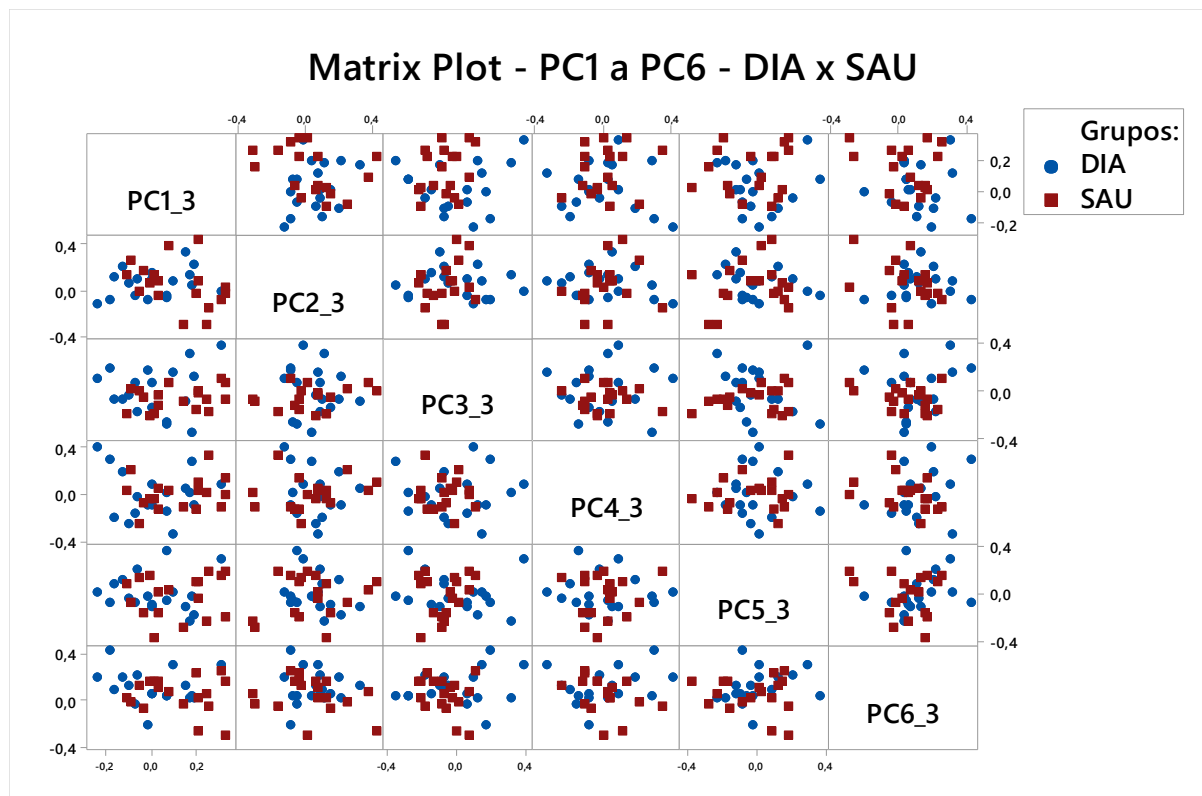
Fonte: Sihota et al., 2019; Kourkoumelis et al., 2017; Movasaghi; Rehman; Rehman, 2007; Gniadecka et al., 1998.

5.4 Análise de Componentes Principais (PCA)

Ao avaliarmos os dados pela técnica de PCA, conforme pode ser observado na Figura 8, foi verificada a ausência de separação entre os grupos avaliados, independentemente de quais PCs fossem usadas para tal. Cada ponto observado nos gráficos da matriz é referente a uma amostra de unha avaliada no estudo. Desta forma, esperava-se que as amostras em azul (DIABÉTICOS) estivessem agrupadas mais próximas umas das outras e as amostras em vermelho (SAUDÁVEL), agrupassem entre si, não se misturando com as do outro grupo (Figura 9).

Considerando a impossibilidade de se observar a separação entre os grupos por meio da técnica de PCA, foi realizado, portanto, a técnica de PLS-DA, cuja finalidade foi identificar os principais picos que poderiam contribuir para a separação dos grupos e, consequentemente, serem classificados como marcadores para o diagnóstico do diabetes em amostras de unha.

Figura 9 - Gráfico da matriz obtida pela associação entre as diferentes componentes principais (PCs) obtidas. DIA: diabético; SAU: saudável.



Fonte: o autor.

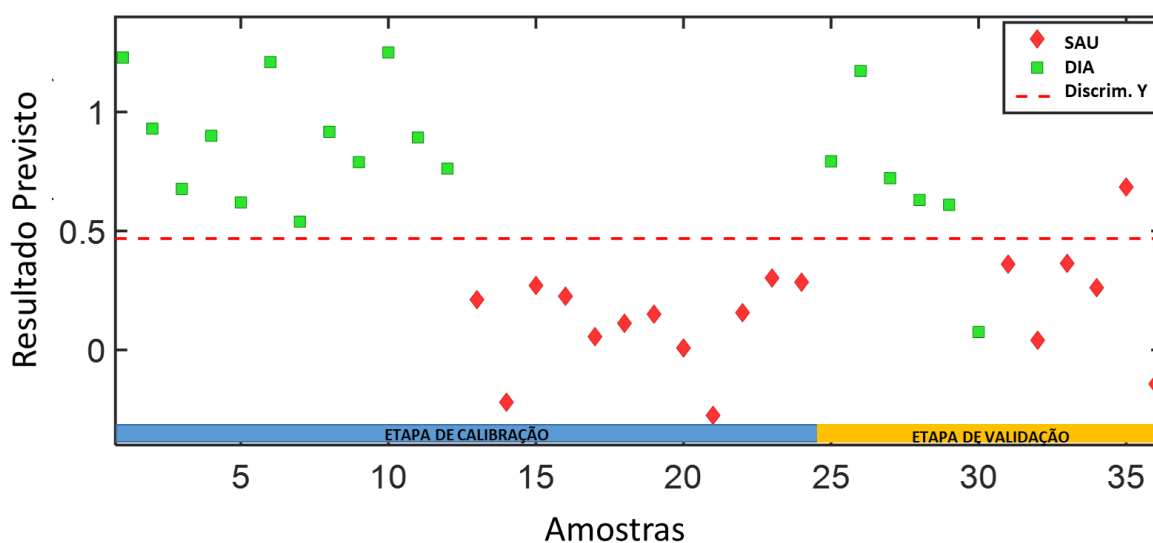
5.5 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

Tendo em vista que não foi verificado a separação de grupos na análise de PCA, foram construídos modelos de classificação supervisionada (PLS-DA). Esse processo foi realizado em duas etapas, sempre considerando os grupos DIA e SAU. A primeira etapa foi a fase de calibração do teste com um conjunto de 24 espectros provenientes de 12 amostras de unhas diabéticas (DIA) e 12 amostras de unhas de participantes considerados não diabéticos, classificados como saudáveis (SAU). A segunda etapa, classificada como validação, utilizou um conjunto de 10 espectros derivados de 5 unhas diabéticas (DIA) e 5 unhas saudáveis (SAU), onde foi observado a real classificação das amostras e os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia do teste. Estas duas etapas são importantes e executadas no teste, de forma a se evitar a colinearidade, ou seja, que mais de um pico no espectro esteja relacionada a propriedade de interesse, que são as classes estudadas (DIA e SAU). Além disso, as etapas de calibração e validação evitam que o modelo seja sobreajustado, verificando se o raciocínio (associação com a propriedade de

interesse) inserida na etapa de calibração se reproduz na etapa de validação. Com isso, pode-se verificar se a presença de reprodutibilidade do modelo, bem como se as informações extraídas foram corretas.

Verifica-se na Figura 10, as duas etapas do modelo PLS-DA, referentes as etapas de calibração e de validação. Na etapa de calibração, os dados foram colocados em seus respectivos grupos para a etapa de treino do modelo, a qual gerou como resultado uma linha tracejada vermelha (linha discriminante) que representa o limiar de separação, sendo os dados acima da linha pertencentes a um grupo e dados abaixo da linha pertencentes a outro. Na etapa de validação, percebeu-se que a maioria das amostras DIA (verde) ficaram acima da linha discriminante e as amostras SAU (vermelho) ficaram abaixo da linha discriminante, representando a separação dos grupos.

Figura 10 - PLS-DA entre os grupos DIA e SAU, apresentando a separação entre a maioria das amostras DIA (acima da linha vermelha) e as amostras SAU (abaixo da linha vermelha). DIA: diabético; SAU: saudável.



Fonte: o autor.

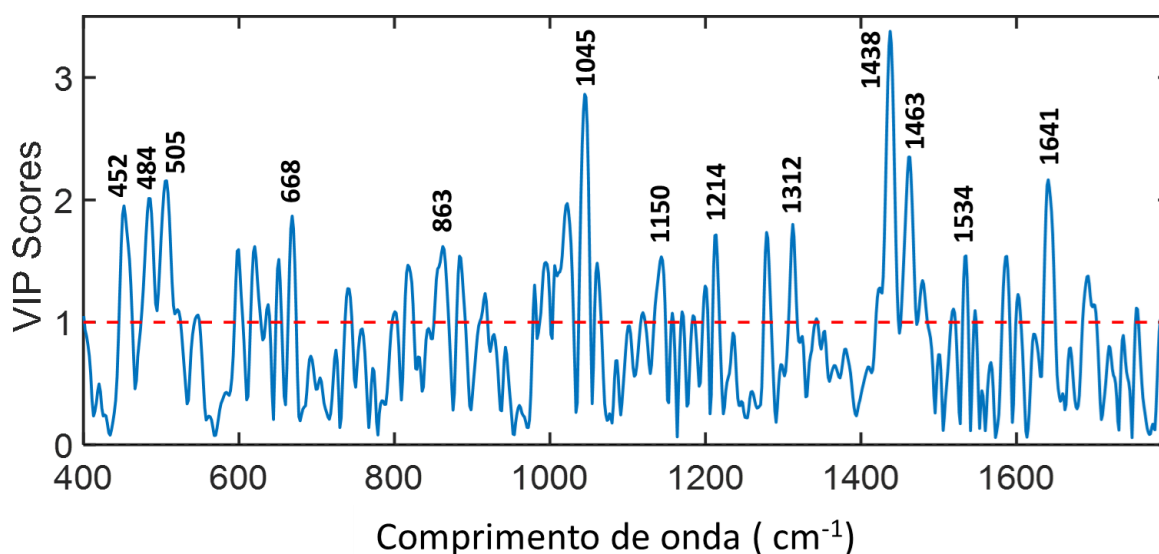
Outras informações a serem consideradas ao analisarmos o modelo de PLS-DA são a sensibilidade, a especificidade e a acurácia do teste. Ao verificarmos a fase de calibração do modelo, podemos perceber que todas as amostras do grupo DIA se mantiveram em um mesmo grupo, fato também verificado para as amostras SAU. Estas informações podem ser melhor observadas ao analisarmos a disposição dos dados em

relação a linha tracejada em vermelho, onde todas as amostras acima da linha são provenientes do grupo DIA e as amostras abaixo desta linha, específicas do grupo SAU. Esta linha, portanto, nos mostra a ótima condição calculada pelo teste para prever os diferentes grupos. Assim, tanto a sensibilidade do teste, quanto a especificidade e acurácia foram equivalentes a 100%, indicando a separação total das amostras em diferentes grupos. Contudo, ao avaliarmos a etapa de validação, podemos perceber que apenas uma amostra do grupo DIA e uma do grupo SAU foram classificadas em lados opostos em relação ao diagnóstico médico. Portanto, percebemos que a sensibilidade, a especificidade e acurácia do teste foram de 83,3%.

Afim de se evidenciar quais foram os principais picos que contribuíram para a discriminação entre os grupos, foi gerado o gráfico da projeção de variáveis importantes (*Variables Important in Projection - VIP*). As variáveis importantes são percebidas com scores acima de 1 (linha tracejada em vermelho), uma vez que os dados foram normalizados. Assim, na Figura 11, observa-se as variáveis que mais contribuíram para a separação de grupos, que são os picos correspondentes as principais diferenças.

Os picos evidenciados como marcadores para a discriminação entre os grupos avaliados e suas atribuições podem ser observados na Tabela 4.

Figura 11 - Variáveis que mais contribuíram para a separação dos grupos DIA x SAU. Os picos registrados são os que mais contribuíram para a separação.



Fonte: o autor.

Tabela 4 - Principais picos observados na análise VIP e que contribuíram para a discriminação entre os grupos DIA x SAU.

Picos (cm ⁻¹)	Atribuição
452	*
484	*
505	Ligações dissulfídicas (S-S)
668	C-S estiramento de cistina
863	*
1045	Ligações (S-O) do ácido cisteico
1150	Carboximetilisina
1214	Estiramento (C-N)
1312	$\delta(\text{CH}_2)$ deformação em proteínas
1438	Deformação em (CH ₂), $\delta(\text{CH}_2)$ – lipídeos
1463	$\delta(\text{CH}_2)$, dissacarídeos
1534	Amida II
1641	Amida I – banda de proteínas

*Atribuição não realizada.

Fonte: Sihota et al., 2019; Kourkoumelis et al., 2017; Movasaghi; Rehman; Rehman, 2007; Gniadecka et al., 1998.

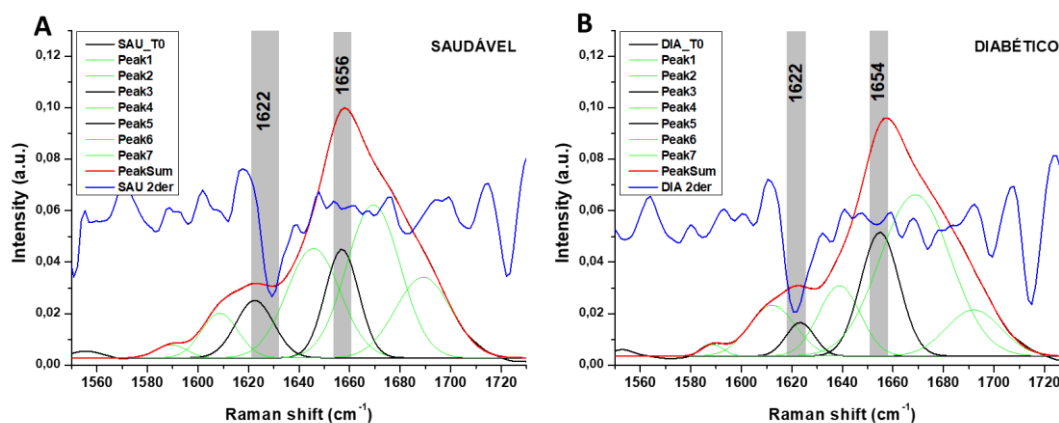
5.6 Análise de Deconvolução – Amida I

A fim de se avaliar a conformação proteica entre as unhas de participantes diabéticos e não diabéticos, foi realizada a análise de deconvolução dos espectros Raman na região de 1580 a 1720 cm⁻¹, referente a região de amida I, característica de proteínas. Alterações nas ligações dissulfídicas e nos resíduos de cisteína presentes nas proteínas que compõem as unhas, tendem a promover um processo de desestruturação na mesma, ocasionando, conseqüentemente, seu enfraquecimento. Pode-se verificar na Figura 12(A-B), um gráfico de deconvolução na região atribuída a presença das conformações β -sheet e α -helix de proteínas. Para ambos os grupos (DIA e SAU), pode-se notar nesta região a presença de 7 picos representados pelas gaussianas (verde) abaixo do espectro Raman (vermelho). Contudo, as gaussianas de interesse, nas quais foi possível evidenciar alterações entre os grupos estavam centradas nos picos de 1622 e 1654-1656 cm⁻¹

(preto). No mesmo gráfico, os espectros de segunda derivada (azul), confirmam a presença de todos os picos identificados na análise de deconvolução na região entre 1580 a 1720 cm^{-1} .

As informações obtidas desta análise, mostram que a intensidade dos picos centrados na região de 1622 cm^{-1} , atribuídos a conformação β -sheet, foi superior para o grupo SAU em relação ao grupo DIA e o pico de 1654 a 1656 cm^{-1} , atribuído a conformação proteica α -helix, esteve aumentada para o grupo DIA quando comparado ao grupo SAU.

Figura 12 (A-B) - Gráficos de deconvolução da região de amida I no intervalo de 1580 a 1720 cm^{-1} . A: grupo saudável; B: grupo diabético. Linhas pretas são referentes aos picos de interesse (1622 e 1654-1656 cm^{-1}), linhas azuis são referentes ao espectro.



Fonte: o autor.

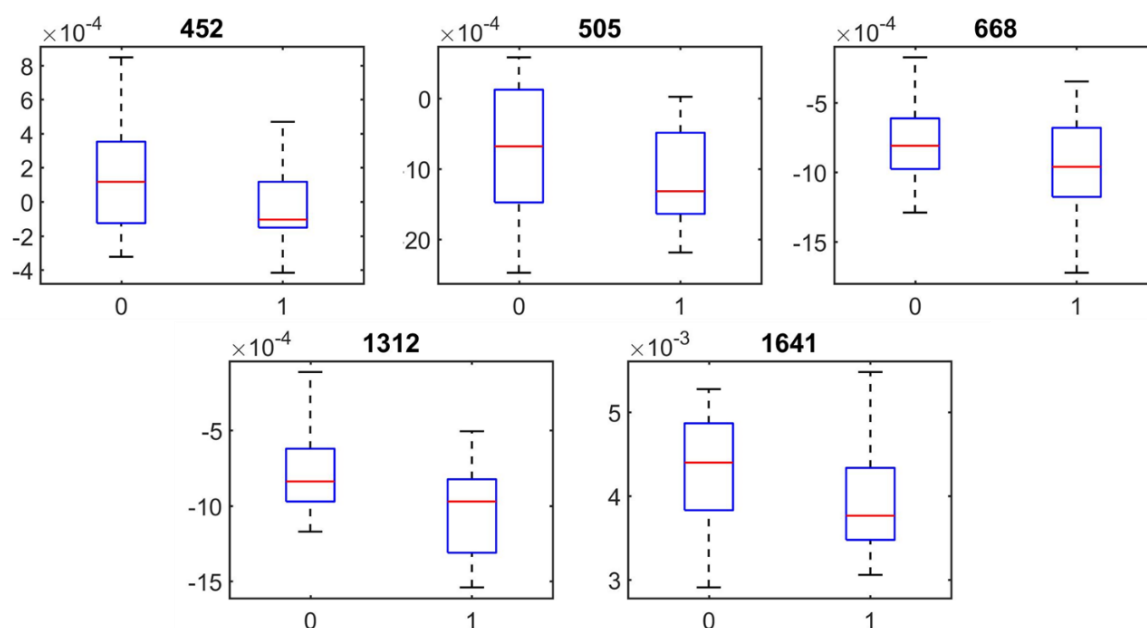
5.7 Análise Estatística

A fim de se verificar as diferentes concentrações de cada elemento representado pelos picos citados na Tabela 4 para os grupos DIA e SAU, foram gerados os gráficos *boxplot* para cada comparação. Tais *boxplots* partiram dos valores de intensidade obtidos dos espectros de primeira e segunda derivada.

Nos espectros de primeira derivada, foram analisados os picos 452, 505, 668, 1312 e 1641 cm^{-1} , uma vez que foram classificados como importantes para a separação entre

os grupos na análise do gráfico VIP, sendo notado para todos os picos um valor de mediana superior para o grupo SAU em relação ao grupo DIA (Figura 13).

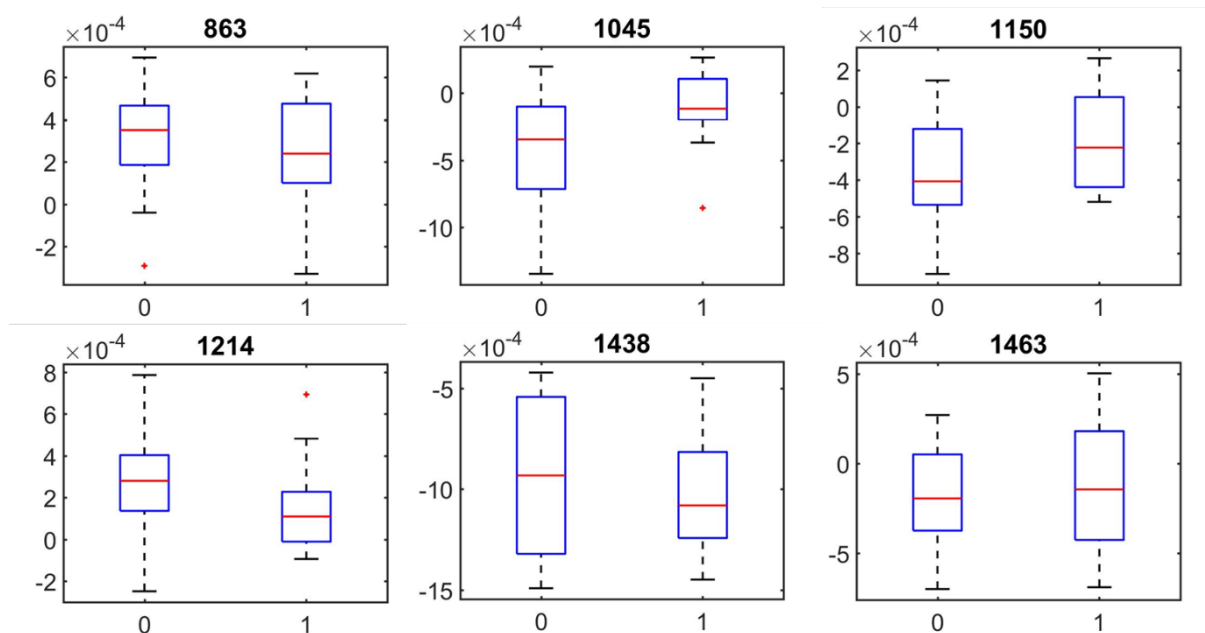
Figura 13 - Gráficos *boxplot* para marcadores bioquímicos evidenciados nos espectros da primeira derivada. Grupo 0: SAU e Grupo 1: DIA.



Fonte: o autor.

Nos espectros de segunda derivada, os picos avaliados e que apresentaram um valor de mediana superior para o DIA em relação ao grupo SAU foram 1045 e 1150 cm^{-1} . No entanto, para os picos 863, 1214, 1438 e 1463 cm^{-1} , as concentrações apresentaram-se diminuídas para o grupo DIA em relação ao grupo SAU (Figura 14).

Figura 13 - Gráficos *boxplots* para marcadores bioquímicos evidenciados nos espectros da segunda derivada. Grupo 0: SAU e Grupo 1: DIA.



Fonte: o autor.

Desta forma, pela análise dos gráficos *boxplot* pudemos verificar uma tendência na diminuição para o grupo DIA da concentração de proteínas e lipídeos, alterações na concentração de alguns aminoácidos como a tirosina e a cistina e nas ligações dissulfídicas, principalmente quando relacionadas a estrutura da queratina. Porém, em duas outras situações (picos de 1045 e 1150 cm^{-1}), foi verificado um aumento da concentração das ligações (S-O) do ácido cistéico e na concentração da carboximetilisina, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

Avaliando as características dos participantes foi percebido que houve uma pequena diferença na média de idade entre os participantes, sendo a população de saudáveis mais jovens do que a população de diabéticos. No que diz respeito ao gênero de prevalência, no estudo foram avaliadas 71,6% de mulheres, sendo 70% no grupo SAU e 73,3% no grupo DIA e apenas 28,3% de homens, sendo 26,7% no grupo DIA e 30% no grupo SAU. Esta diferença entre homens e mulheres reflete a situação de prevalência observada no Brasil entre os anos de 2010 a 2018, onde a maior incidência foi verificada em mulheres (PIMENTA et al., 2019).

Os principais parâmetros para que se determine a presença do diabetes no organismo, é por meio da verificação de quadros de hiperglicemia no corpo, cujos principais elementos avaliados, são, a hemoglobina glicada (HbA1c) e glicemia em jejum (GJ) e o Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG) (GUANG et al., 2020). Neste estudo, os valores de tais exames, exceto TOTG, demonstraram a grande diferença entre pacientes diabéticos e não diabéticos. O percentual médio da concentração de hemoglobina glicada no grupo DIA foi de 8,38% e o valor para a glicemia em jejum foi de 184,96 mg/dL, confirmando a correlação entre HbA1C e GJ existente na literatura, a qual correlaciona um valor de HbA1c de 8% com um valor de GJ de 183 mg/dL (NATHAN et al., 2008). Os valores encontrados para o grupo não diabético ou saudável, apresentou os valores de HbA1c de 5,14% e de GJ de 89,5 mg/dL, também seguindo as mesmas expectativas de correlação previamente citada. Contudo, deve-se considerar que os valores médios de HbA1c evidenciados para o grupo DIA, indicam uma situação de diabetes não controlado, possibilitando, desta forma, uma maior chance de desenvolver complicações relacionadas ao diabetes, como retinopatias, nefropatias neuropatias e alterações microvasculares (ISMAIL-BEIGI, et al., 2011; SBD, 2017/2018).

Tais fatos observados em relação aos aspectos relacionados as características de cada grupo, também se refletem nas características bioquímicas presentes. Desta forma, ao analisarmos os espectros Raman, os quais nos fornecem uma ampla informação bioquímica, foi possível evidenciar alterações em componentes que nos possibilitam explicar vários efeitos da hiperglicemia no corpo. Os principais elementos avaliados por sofrerem grandes influências com o aumento da glicemia no organismo foram os picos

característicos das regiões com prevalência das ligações dissulfídicas (S-S), as quais tem como premissa, manter a estrutura correta de determinadas proteínas, especificamente a queratina, principal proteína evidenciada nas unhas e que garante a firmeza e resistência da mesma (COSTA; NOGUEIRA; GARCIA, 2007; van de KERKHOFF, et al., 2005).

Outros importantes elementos bioquímicos, também alterados na avaliação das unhas do grupo DIA foram as proteínas, incluindo a queratina, as quais são fundamentais para a viabilidade estrutural das mesmas, e alguns aminoácidos como a tirosina e a cistina, sendo o último, formado por dois peptídeos de cisteína, as quais também apresentam ligações dissulfídicas entre si e tem propriedades de garantir a organização da estrutura ungueal (GARSON et al, 2000). Além disso, os lipídeos também tem importante papel nas unhas, uma vez que, embora em pequenas quantidades, também tem o papel de promover a hidratação das unhas por meio do controle da permeação, evitando a fragilidade das mesmas (LUBACH; BECKERS, 1992; GNIADKA et al., 1998; GARSON et al., 2000; HELMDACH et al., 2000; MURDAN, 2002) e a carboximetilisina, um agente final da glicação avançada que sabidamente está aumentado em diabéticos, devido a maior exposição do corpo a glicose (SBDC, 2017/2018).

Embora tenha sido possível evidenciar a presença de alterações em diversas regiões do espectro Raman quando comparado o grupo DIA e SAU, a identificação dos componentes bioquímicos que melhor contribuíram para a discriminação entre os dois grupos só foi obtida pela técnica de PLS-DA (Figura 9). Ao verificarmos os principais elementos que possibilitaram caracterizar e diferenciar as amostras avaliadas em diferentes grupos (DIA e SAU) percebemos, todos os componentes bioquímicos observados previamente na análise das médias de cada grupo. Os principais elementos, foram, portanto, as ligações dissulfídicas, a presença do aminoácido cistina e do ácido cistéico, carboximetilisina, proteínas, lipídeos, banda de dissacarídeos e componentes envolvidos com a região de Amida I (proteínas e lipídeos). Assim, todos estes elementos, podem ser classificados como potenciais marcadores para o diagnóstico e acompanhamento da evolução da doença em unhas diabéticas.

Ao verificarmos cada elemento, separadamente, podemos perceber que para o grupo DIA, houve diminuições na intensidade do pico de 505 cm^{-1} , o qual é referente as ligações dissulfeto (S-S), extremamente importante para a estabilização das proteínas nas unhas e que também está associada a presença da cistina (668 cm^{-1}), que é formada pela

junção de duas cisteínas, e que necessita da presença do enxofre (S) entre os dois aminoácidos fazendo a ligação. Diminuições nestes elementos, assim como relatado anteriormente, podem contribuir para um enfraquecimento das unhas. Desta forma, a presença da queratina, proteína amplamente presente nas unhas e produzidas pelos queratinócitos, tem na sua formação uma grande quantidade de aminoácidos, entre eles, a cisteína, e que é dependente das ligações dissulfídicas (S-S) para contribuir com as suas propriedades físicas e mecânicas (WEN, et al., 2013; BERKER et al., 2000), pode ter sua quantidade diminuída ou, mesmo que em quantidades adequadas, poderão apresentar mudanças estruturais devido a diminuição dos elementos essenciais para a sua composição. Além disso, não podemos deixar de salientar que a presença de algumas patologias, entre elas o diabetes, possuem a característica de promover um desenvolvimento ungueal comprometido (COSTA; NOGUEIRA; GARCIA, 2007).

Outra importante alteração evidenciada neste estudo e que nos indica alterações nas ligações dissulfídicas é o aumento observado em relação ao pico de 1045 cm^{-1} , o qual, de acordo com a literatura está relacionado às ligações (S-O) do ácido cisteico, indicando a presença de alterações nas ligações (S-S) devido ao processo de oxidação (COROABA et al., 2015). De acordo com Cavagnino et al. (2019), o processo de carbonilação das proteínas pode ser visto como um biomarcador para a presença dos danos oxidativos nas proteínas das unhas. Esta carbonilação das proteínas, pode ocorrer por vários processos, tais como a presença de espécies de oxigênio reativo (ROS), pela presença de produtos secundários do estresse oxidativo, pela reação da arginina e lisina com açúcares redutores e pelos processos de peroxidação lipídica, podendo ocasionar a desestruturação das proteínas nas unhas e funções celulares alteradas (BARAIBAR; LADOUCE; FRIGUET, 2013; SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010; THORNALLEY et al., 2003).

Ao considerarmos que os agentes finais de glicação avançada (AGEs), resultantes da reação de Maillard, podem promover o processo de carbonilação proteica, pode-se perceber que o pico de 1150 cm^{-1} , referente a carboximetilisina (CML), esteve com uma intensidade aumentada para o grupo DIA em relação ao grupo SAU, corroborando com os achados da literatura que indicam que aumentos na concentração de CML são comuns em pacientes diabéticos, devido ao processo de hiperglicemia (SIHOTA et al., 2019). O problema ocasionado pelos AGEs em relação as unhas é que estes, na maioria das vezes

se ligam as proteínas formando adutos protéicos (proteínas-AGEs) e *crosslinks* (AGEs-proteínas-AGEs), todos interferindo na estrutura ungueal (CAVAGNINO et al., 2019).

Outro componente bioquímico bastante importante nas unhas e que tem um papel fundamental na manutenção da resistência e na hidratação são os lipídeos. No entanto, este componente representa uma pequena parcela na composição das unhas, e por isso, a capacidade das unhas reterem água para promoção da hidratação é pequena. Contudo, devemos considerar que além do conteúdo de lipídeos, a queratina e as proteínas associadas a queratina também podem interferir na resistência das unhas (van de KERKHOFF, et al., 2005; COSTA; NOGUEIRA; GARCIA, 2007). Ao considerarmos que normalmente as unhas de pacientes diabéticos apresentam-se degradadas devido a hiperglicemia, uma maior diminuição no conteúdo de lipídeos, notada neste estudo com base no pico de 1438 cm^{-1} , poderia proporcionar uma maior desidratação das mesmas.

Considerando todas as alterações evidenciadas até o momento nas unhas de participantes diabéticos em relação as unhas de participantes não diabéticos, as proteínas presentes na estrutura ungueal automaticamente foram alteradas e apresentaram intensidades diminuídas no grupo DIA. De acordo com Cavagnino et al., (2019) as unhas são formadas por células queratinizadas, cuja resistência é proporcionada através das proteínas de matriz e, uma vez alteradas, seja por processos endógenos ou exógenos, podem ocasionar uma unha fraca e quebradiça. As intensidades diminuídas para os picos relacionados a proteínas neste estudo (1214 , 1312 e 1641 cm^{-1}) corroboram com os resultados evidenciados na literatura, os quais ressaltam a presença de proteínas alteradas nas unhas de diabéticos quando associada a unhas de pessoas não diabéticas (SIHOTA et al., 2019; FARHAN; SASTRY; MANDAL, 2010).

Ainda evidenciando as alterações presentes nas unhas de diabéticos, ao avaliarmos a conformação protéica por meio da deconvolução [Figura 12(A-B)], notamos uma diminuição da conformação β -sheet e um aumento na conformação α -helix. De acordo com o estudo de Farhan, Sastry e Mandal (2010), os quais compararam unhas de pacientes diabéticos e não diabéticos em relação a estrutura secundária das proteínas, é comum verificar aumentos na conformação α -helix em diabéticos e conseqüentemente diminuição na conformação β -sheet. Tal fato, pode ser compreendido como uma desestruturação das proteínas na presença da doença, o que reflete em proteínas mais moles ou flexíveis, quando comparada a proteína rígida e compacta.

Desta forma, por meio da avaliação das unhas de pacientes diabéticos e não diabéticos pela técnica de espectroscopia Raman confocal, foi possível verificar os diferentes componentes bioquímicos que apresentaram alterações devido a patologia avaliada. Embora não tenha sido evidenciada significância estatística, as técnicas utilizadas apontam para uma tendência de diminuição destes elementos, indicando uma desestruturação na unha de diabéticos em relação a pacientes não diabéticos, permitindo que os mesmos possam ser utilizados como marcadores para avaliação do diabetes.

Muitas das alterações bioquímicas observadas já são sabidas e ressaltadas na literatura, porém, na maioria das vezes, necessitam de procedimentos invasivos ou de técnicas avaliativas que demandam tempo e procedimentos complexos para serem identificadas. Portanto, a técnica de espectroscopia Raman se mostrou eficaz na caracterização das alterações bioquímicas de unhas diabéticas e, além disso, a avaliação realizada nas unhas, material de simples aquisição e livre de processos invasivos, ganha cada vez mais espaço, se tornando uma forma importante de se avaliar e diagnosticar processos orgânicos no corpo.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos afirmar que a presença da hiperglicemia no organismo ocasionada pelo diabetes traz inúmeras alterações a estrutura ungueal. Estas alterações envolvem diferentes componentes como proteínas, aminoácidos e lipídeos, importantes para a garantia da correta estruturação da unha. Porém, de forma bem específica, foi possível observar uma cascata de reações que explicaram as alterações nas unhas de pacientes diabéticos, cujo início se dá pelo excesso de glicose no organismo ocasionando a glicação proteica, além de estimular o processo de carbonilação de proteínas, bem como as alterações nas ligações dissulfídicas e nos resíduos de cisteína.

A metodologia utilizada neste estudo, permitiu a observação de potenciais marcadores para avaliação do diabetes nas unhas, além de fornecer informações importantes para o entendimento dos processos que levam a uma diminuição na resistência das unhas diabéticas.

Portanto, a utilização da espectroscopia Raman confocal na avaliação das unhas diabéticas se mostrou eficaz na determinação das alterações bioquímicas presentes, se tornando uma importante ferramenta para o diagnóstico e acompanhamento do diabetes no corpo, principalmente se associada a unhas, material de fácil aquisição e que nos fornece importantes informações sobre o funcionamento de diversos sistemas do nosso organismo.

REFERÊNCIAS

- AHMED, N. Advanced glycation end products - Role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 67, p. 3-21, 2005.
- ARAÚJO M.F., et al. Oral antidiabetic drug therapy compliance among Brazilian public health system users. **Texto & Contexto Enferm.**, v. 20, p. 135-143, 2011.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 36, p. 11-66, 2013.
- ALI, E.M.A. et al. Raman spectroscopic investigation of cocaine hydrochloride on human nail in a forensic context. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 4, p. 1159-1166, 2008.
- ARRELIAS C.C, et al. Adherence to diabetes mellitus treatment and sociodemographic, clinical and metabolic control variables. **Acta Paul. Enferm.**, v. 28, n. 4, p. 315-22, 2015.
- BARAIBAR, M.A.; LADOUCE, R.; FRIGUET, B. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. **J. Proteomics**, v. 92, p. 63-70, 2013.
- BARBOSA, J.H.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Rev. Nutr.**, v. 22, p.113-24, 2009.
- BERKER, D., et al. Keratin expression in the normal nail unit: markers of regional differentiation. **British Journal of Dermatology**, v. 142, p. 89-96, 2000.
- BERTOLDI, A.D. et al. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: a comprehensive literature review. **Global Health**, v. 9, p. 62, 2013.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à Química dos Alimentos**. Rio de Janeiro: Livraria Varela, 1995.
- BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-25, 2005.
- BROWNLEE M.; CERAMI A.; VLASSARA, H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. **N. Engl. J. Med.**, vol. 318, p. 1315-1321, 1988.
- CARTAXO, S.B. **Espectroscopia FT-Raman na diferenciação entre melanoma cutâneo e nevo pigmentado**. São Paulo, 2008. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo,2008.

CASPERS, P.J. In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin. **Bioespectroscopy**, v. 4, p. 31-39, 1999.

CAVAGNINO, A., et al. Keratin oxidation (carbonylation) as an early marker of nail plate damage. **IFSCC**, 2019.

CHRIT, L. et al. In vivo chemical investigation of human skin using a confocal Raman fiber optic microprobe. **J. Biomed. Opt.**, v. 10, n. 4, 2005.

COOPMAN, R. et al., Glycation in human nail clips using ATR-FTIR spectrometry, a new marker for diagnosing and monitoring diabetes mellitus. **Clinical Biochemistry**, v. 50, n.1-2, p. 62-67, 2016.

COROABA, A., et al. Mechanism Induced by Psoriasis in Human Fingernails - A Different Approach, **J Invest Dermatol.**, v. 136, p. 311-313, 2016.

COSTA, I.M.C.; NOGUEIRA, L.S.C; GARCIA, P.S. Síndrome das unhas frágeis. **An Bras Dermatol.**, v. 82, p. 263-267, 2007.

CUMMINS, N.M. Raman spectroscopy of fingernails: A novel tool for evaluation of bone quality? **Spectroscopy**, v. 24, 517-524, 2010.

DAS, R.S.; AGRAWAL, Y.K. Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications. **Vibrational Spectroscopy**, v. 57. ed. 2, p. 163-176, 2011.

dos SANTOS, L., et al., In vivo confocal Raman spectroscopy and molecular dynamics analysis of penetration of retinyl acetate into stratum corneum. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 174, p. 279-285, 2017.

EBA, M., et al. Onychomycosis in diabetic patients in Fako Division of Cameroon: prevalence, causative agents, associated factors and antifungal sensitivity patterns. **BMC Res. Notes**, v. 9, p. 494, 2016.

FARHAN, K.M.; SASTRY, T.P.; MANDAL, A.B. Comparative study on secondary structural changes in diabetic and non-diabetic human finger nail specimen by using FTIR spectra. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 386-389, 2011.

FENNEMA, R.O.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed, 2010, 85-86 p.

FERRARO, N.G. **Os fundamentos da física**. 2013. Disponível em: <http://osfundamentosdafisica.blogspot.com.br/2013_01_01_archive.html>. Acesso em: 13 jan. 2021.

FORBES, J.M.; SOLDATOS, G.; THOMAS, M.C. Below the radar: advanced glycation end products that detour "around the side". Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? **Clin. Biochem. Rev.**, v. 26, p. 123-134, 2005.

- GARSON, J.C., et al. Histological structure of human nails as studied by synchrotron X-ray microdiffraction. **Cell Mol. Biol.**, v. 46, p. 25-34, 2000.
- GINTER, E.; SIMKO, V. Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 771, p. 42-50, 2012.
- GHASEMI, A.; ZAHEDIASL, S.; AZIZI, F. Reference values for fasting serum glucose levels in healthy Iranian adult subjects. **Clinical Laboratory**, v. 57, p. 343-349, 2011.
- GNIADACKA, M., et al. Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, p. 393-398, 1998.
- GOLDIN, A., et al., Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation-AHA Journals**. v. 114, p. 597-605, 2006.
- GUANG, P., et al. Blood-based FTIR-ATR spectroscopy coupled with extreme gradient boosting for the diagnosis of type 2 diabetes - A STARD compliant diagnosis research. **Medicine**, v. 99, p. 1-7, 2020.
- HELMDACH, M., et al. Age and Sex Variation in Lipid Composition of Human Fingernail Plates. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 13, p. 111-119, 2000.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Atlas**. 9th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2019.
- ISMAIL-BEIGI, F., et al. Individualizing glycemic targets in type 2 diabetes mellitus: implications of recent clinical trials. **Annals of Internal Medicine**, v. 154, p. 554-559, 2011.
- KALASINSKI, V.F. Biomedical applications of infrared and Raman microscopy. **Rev. Appl. Spectrosc.**, v. 31, p. 193-249, 1996.
- KATCHUNGA, P.B., et al. Glycated keratins and diabetes. Glycated nail proteins as a new biomarker in management of the South Kivu Congolese diabetics **Biochemia Medica**, v. 25, p. 469-73, 2015.
- KISHABONGO, A.S., et al., Glycation of Nail Proteins: From Basic Biochemical Findings to a Representative Marker for Diabetic Glycation-Associated Target Organ Damage. **PLoS One**, v. 10, n. 3, 2015.
- KISHABONGO, A.S, et al. Tropical Medicine and International Health. **Glycated nails and diabetes**. v. 19, p. 58-64, 2014.
- KLONOFF, D.C. What Do Your Fingernails Say About You? Can They Indicate That You Have Diabetes? **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 9, p. 1167-1169, 2015.

KNUDSEN, L. Natural variations and reproducibility of in vivo near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy of normal human skin. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 33, p. 574-579, 2002.

KOURKOUMELIS, N., et al. Nail Raman spectroscopy: A promising method for the diagnosis of onychomycosis. An ex vivo pilot study. **Medical Mycology**, v. 56, p. 551-558, 2018.

KUZUHARA, A. Analysis of structural change in keratin fibers resulting from chemical treatments using Raman spectroscopy. **Biopolymers**, v. 77, p. 335-344, 2005.

KUZUHARA, A. Analysis of structural changes in permanent waved human hair using Raman spectroscopy. **Biopolymers**, v. 85, p. 274-283, 2006.

LANDEMANN, J. In vivo Raman spectroscopy detects increased epidermal antioxidative potential with topically applied carotenoids. **Laser Physics Letters**, v. 6, p. 76-79, 2009.

LESLIE, R.D., et al. Level of an advanced glycated end product is genetically determined. A study of normal twins. **Diabetes**, v. 52, p. 2441-2444, 2003.

LINDON, J.C., et al. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. Amsterdã, Elsevier, p. 1993, 2000.

LUBACH, B.; BECKERS, P. Wet working conditions increase brittleness of nails but do not cause it. **Dermatology**, v. 185, p. 120-122, 1992.

LUBRIZOL LIFE SCIENCE. **Skin and Nail: Barrier Function, Structure, and Anatomy Considerations for Drug Delivery**. Cleveland: The Lubrizol Corporation, 2019.

MAIFREDE, B.S. "**Fungos associados às onicomicoses: Prevalência e suscetibilidade a drogas antifúngicas**". Universidade federal do Espírito Santo-Vitória, 2009.

MARTIN, F.J., et al. Identifying variables responsible for clustering in discriminant analysis of data from infrared microspectroscopy of a biological sample. **J. Comput. Biol.**, v. 14, p. 1176-1184, 2007.

MENDES, T.O., et al. Statistical strategies to reveal potential vibrational markers for in vivo analysis by confocal Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 21, p. 075010, 2016.

MIN, J.Z., et al. Rapid and sensitive determination of the intermediates of advanced glycation end products in the human nail by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-offlight mass spectrometry. **Anal. Biochem.**, v. 424, p. 187-194, 2012.

MONNIER, V.M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 419, p. 1-15, 2003.

MORRIS, J.S.; SPATE, V.L.; NGWENYAMA, R.A. Determination of selenium in the toenail biomonitor. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 269, p. 283-290, 2006.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I.U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, p. 493-541, 2007.

MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, p. 1-26, 2000.

NATHAN, D.M., et al. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. **Diabetes Care**, v. 31, p. 1473-1478, 2008.

NAYAK, A.U. et al. Evidence for consistency of the glycation gap in diabetes. **Diabetes Care**, v. 34, p. 1712-1716, 2011.

OGURTSOVA, K., et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 128, p. 40-50, 2017.

OLAYA-JUSTICE, V., et al. Raman spectroscopic studies of human nails in health and forensic applications. **Journal of the Idaho Academy of Science**, v. 49, p. 33, 2013.

PANDE, C.M.; JACHOWICZ, J. Hair photodamage measurement and prevention. **Journal of the society of Cosmetic Chemists**, v. 44, p. 109-122, 1993.

PEREIRA, L., et al. Confocal Raman spectroscopy as an optical sensor to detect advanced glycation end products of the skin dermis. **Sensor Letters**, v. 13, p. 791-801, 2015.

PIMENTA, B.J., et al. **Análise da prevalência do número de adultos hospitalizados por diabetes de mellitus no Brasil**. In: III Jornada Acadêmica de Medicina - Centro de Cultura e Eventos Dom Benedito Domingos Cósia, Jataí-GO, 2019. Disponível em: <<https://www.doity.com.br/anais/iiiamed/trabalho/86689>>. Acesso em: 11 mai. 2021.

PUDNEY, P. DA., et al. Confocal Raman Spectroscopy of Whole Hairs. **Applied Spectroscopy**, v. 67, p. 1408-1416, 2013.

RAEE, M.R, et al. Cause and cardiovascular mortality following treatment with metformin or glyburide in patients with type 2 diabetes mellitus. **Arch. Iran. Med.**, v. 20, p. 141-146, 2017.

RAMAN, C.V; KRISHNAN, K.S. A new type of Secondary Radiation, **Nature**, v. 121, p. 501, 1928.

RESENDE, R.B. **Onicomicoses e a terapia fotodinâmica**. Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG, 2015.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de Alimentos**. 2 ed. revisada. Editora Blucher, p. 50-53, 2003.

SANCHES, T.P. **Estudo sobre determinação de elementos químicos em unhas humanas pelo método de análise por ativação com nêutrons** Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações). Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SANTOS, L. et al. In vivo intra- and inter-individual variability study of human stratum corneum by confocal Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 87, p. 199-206, 2016.

SCHLUCKER, S., et al. Conformational differences in protein disulfide linkages between normal hair and hair from subjects with trichothiodystrophy: a quantitative analysis by Raman microspectroscopy. **Biopolymers**, v. 82, p. 615-622, 2006.

SHIN, M.K., et al. Changes in nail keratin observed by Raman spectroscopy after Nd:YAG laser treatment. **Microsc. Res. Tech.**, v. 80, p.338-343, 2016.

SIHOTA, P., et al. Investigation of diabetic patient's fingernail quality to monitor type 2 diabetes induced tissue damage. **Scientific Reports**, v. 9, p.1-11, 2019.

SING, A.; BARDEN, A.M.T.; BEILIN, L. Advanced glycation end products: a review. **Diabetologia**, v. 44, p. 129-46, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**. São Paulo, 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Atualização sobre Hemoglobina Glicada (A1c) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: Aspectos clínicos e laboratoriais.** (2017/2018). Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/publico/images/banners/posicionamento-3-2.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2021.

SUZUKI, Y.J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D.A. Protein Carbonylation. **Antioxid. Redox Signal**, v. 12, p. 323-325, 2010.

TEIXEIRA, A.P., et al. Confocal Raman spectroscopy: determination of natural moisturizing factor profile related to skin hydration. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 30, p. 11-16, 2014.

TÉLLEZ-SOTO, C.A. RM1 semi empirical and DFT: B3LYP/3-21G theoretical insights on the confocal Raman experimental observations in qualitative water content of the skin dermis of healthy young, healthy elderly and diabetic elderly women. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 149, p. 1009-1019, 2015.

THORNALLEY, P.J., et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. **Biochem. J.**, v. 375, p. 581-592, 2003.

TOSATO, M.G., et al. Raman Spectroscopic Investigation of the Effects of Cosmetic Formulations on the Constituents and Properties of Human Skin. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, p. 85-91, 2012.

TOSATO, M.G., et al. Confocal Raman spectroscopy: In vivo biochemical changes in the human skin by topical formulations under UV radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 153, p. 51-58, 2015.

VAN de KERKHOFF, P.C.M., et al. Brittle nail syndrome: a pathogenesis base approach with proposed grading system. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 53, p. 644-652, 2005.

VLASSARA, H.; PALACE, M. Diabetes and advanced glycation endproducts. **J. Intern. Med.**, v.1, p. 87-101, 2002.

VOLTARELLI, J.C., et al. Terapia celular no diabetes mellitus. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, p. 149-156, 2009.

WEN, W., et al. Comparative study on keratin structural changes in onychomycosis and normal human finger nail specimens by Raman spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1038, p. 35-39, 2013.

WHITING, D.R., et al. IDF diabetes stlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 94, p.311-321, 2011.

WILLIAMS, A.C., et al. Raman spectra of human keratotic biopolymers: Skin, callus, hair and nail. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 25, p. 95-98, 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO

Nº _____ DATA: _____

1) Dados de identificação:

Informações Básicas:

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: Fem () Masc ()

Endereço: _____

Nº: _____ Bairro: _____ Cidade: _____

UF: _____

CEP: _____ E-mail: _____

Telefone Residencial: () _____ Telefone Celular: () _____

2) Dados clínicos

3.1 Há quanto tempo teve o diagnóstico de diabetes: até 5 anos () maior ou igual a 6 anos ()

3.2 Você foi esclarecido ou orientado sobre o que é a diabetes: sim() não()

3.3 Número de consultas por ano: uma consulta () duas/três consultas maior ou igual a quatro consultas ()

3.4 Tipo de tratamento: dieta somente() medicação oral() insulina e medicamento oral() insulina somente()

3.5 Realiza alguma atividade física: sim() não()

3.6 Atividade física regular: sim() não()

3.7 Fatores de risco: obesidade() hipertensão arterial() dislipidemia

() tabagismo() sedentarismo() história familiar de diabetes() outros()

3.8 Presença de complicações: oftalmológica() cardiovascular() neurológica() renal() alopecia() unhas quebradiças() outros()

3.9 Participa de algum grupo de educação em diabetes méltitus: ()sim ()não

4)Dados complementares

4.1 Já fez algum tratamento com laser: sim() não()

4.2 Tem história de unhas quebradiças: sim() não()

- Considera sua alimentação saudável? Sim () Não () mais ou menos ()
- Responda de 1 a 5 quanto ao seu nível de estresse diário, sendo que 1 é pouco e 5 é muito:

- Responda de 0 a 5 referente à frequência com que se alimenta dos seguintes, sendo que 0 é NUNCA e 5 é MUITO:

Carne branca: _____

Carne vermelha: _____

Doces: _____

Frituras: _____

Frutas: _____

Gorduras: _____

Legumes: _____

Massas: _____

Queijos: _____

Verduras: _____

Produtos industrializados: _____

Grelhados: _____

Assados: _____

Disponibilidade de horários:

Dias: Segunda () Terça () Quarta ()

Quinta () Sexta ()

Período: Manhã () Tarde ()

APÊNDICE B – CARTA DE APRESENTAÇÃO

A Fundação Municipal de Saúde Comissão de Ética em Pesquisa

Eu, Priscila Pereira Fávero, orientadora do projeto de pesquisa intitulado “Estudo da composição bioquímica de unhas para o diagnóstico de diabetes mellitus por espectroscopia Raman”, venho através desta carta, apresentar-lhe a aluna Juscélia Maria de Moura Feitosa Veras, que é minha orientanda e será responsável pela coleta de dados.

Para o desenvolvimento da pesquisa, a aluna deverá entrevistar portadores de diabetes mellitus no Centro Integrado Lineu Araújo de Teresina, desta forma é necessário à autorização dessa Comissão.

Confirmando que todos os pesquisadores envolvidos nesta pesquisa realizaram a leitura e estão cientes do conteúdo normativo da Resolução 466/2012 do CNS, e de que as normas ali constantes devem ser cumpridas incondicionalmente.

Confirmando também:

- 1- Que esta pesquisa ainda não foi iniciada;
- 2- Que não há participação estrangeira nesta pesquisa;
- 3- Que será comunicado a essa comissão os eventos adversos ocorridos com os sujeitos de pesquisa;
- 4- Que será apresentado relatório anual e final desta pesquisa a FMS.

Atenciosamente,

Priscila Pereira Fávero

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ (nome do sujeito da pesquisa), estou sendo convidado a participar do estudo Estudo da composição bioquímica de unhas para o diagnóstico de diabetes mellitus por espectroscopia Raman, com objetivo de constatar a potencialidade da técnica Raman confocal em unhas, para o diagnóstico de Diabetes Mellitus e assim identificar as assinaturas espectrais de indivíduos com diabetes mellitus tipo II e novos biomarcadores de diabetes mellitus tipo II em unhas através da espectroscopia Raman Confocal. A minha participação no referido estudo será no sentido de responder as questões com o intuito de validar o diagnóstico por espectroscopia Raman, os resultados precisam ser validados pelo padrão-ouro, ou seja, pela coleta de sangue e análise bioquímica. Por isso, será feito a coleta de 5 ml de sangue e 3 fragmentos de unha.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como: com o entendimento detalhado da fisiopatologia desse processo pode permitir no futuro, o controle deste fenômeno e a possível aplicação destes resultados na indústria farmacêutica e na engenharia biomédica, com o intuito de buscar alternativas para uma prevenção e tratamento, buscando uma melhor qualidade de vida para esses pacientes.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo como: desconforto durante procedimento da coleta de sangue, mas será explicado ao participante que será um procedimento padrão de coleta de exames. E com relação a unha, esta será cortada e não arrancada, evitando dores. Serão feitas medidas de 3 pedaços de unhas e 3 diferentes pontos a partir da superfície até uma profundidade de aproximadamente 60 μm , onde esta quantidade não alterará a estética do participante da pesquisa e serão conscientizados da importância da participação, sendo uma forma deles se sentirem valorizados, e riscos mínimos por mesmo estando ciente do procedimento poderá sentir receio ou constrangimento por ter fragmentos de unhas cortadas, que serão minimizados ao explicar que o corte da unha será o menor possível.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar e por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Juscélia Maria de Moura Feitosa Veras, Priscila Pereira Fávero, Lívia Assis Garcia e Airton Abrahão Martin e com eles poderei manter contato pelo telefone (086)99987-2185. É assegurada a assistência durante toda

pesquisa, bem

como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo.

Tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Brasil (11) 20700025 sediado a Rua Carolina Fonseca, 235, Jd Santana, SP- Capital ou mandar um email para comite.etica.sp@universidadebrasil.edu.br

Teresina, de de 2018

Nome e assinatura do sujeito da pesquisa

Nome(s) e assinatura(s) do(s) pesquisador(es) responsável(responsáveis)

APÊNDICE D – Carta de Anuência do Pesquisador Principal

Eu, Juscélia Maria de Moura Feitosa Veras, CPF nº 474.250.913-72, investigador principal pelo projeto intitulado “Estudo da composição bioquímica de unhas para o diagnóstico de diabetes mellitus por espectroscopia Raman” assumo a responsabilidade de comunicar imediatamente à Instituição toda e qualquer complicação ocorrida durante a realização do referido projeto que ponha em risco os participantes de pesquisa ou bens incluídos no trabalho.

Responsabilizo-me, outrossim, a acompanhar as diligências necessárias à imediata e integral assistência aos participantes de pesquisa.

Data: / /2018

Juscélia Maria de Moura Feitosa Veras

Investigador Principal

ANEXOS

ANEXO A- DECLARAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE

FMS
Fundação Municipal
de Saúde



DECLARAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE

Declaro estar ciente dos objetivos do Projeto de Pesquisa “**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DAS UNHAS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS**” e concordo em autorizar a execução da mesma nesta instituição. Esta Instituição está ciente de suas corresponsabilidades como instituição coparticipante do presente Protocolo de Pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos participantes da pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança.

Conforme Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, a pesquisa só terá início nesta instituição após apresentação do Parecer de Aprovação por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP). Autorizo os pesquisadores: **PRISCILA PEREIRA FÁVERO E JUSCÉLIA MARIA DE MOURA FEITOSA VERAS** acesso ao Lineu Araújo para realização da coleta dos dados.

Teresina, 23 de agosto de 2018.

Ayla Maria Calixto de Carvalho

Ayla Maria Calixto de Carvalho
Comissão de Ética em Pesquisa da
Fundação Municipal de Saúde

Ayla Maria Calixto de Carvalho
COREN-PI 048.758



Rua Governador Artur de Vasconcelos, Nº 3015
Bairro Aeroporto, Teresina - PI | CEP: 64002-530



86 3215 7700 | 86 3215 7701



UNIVERSIDADE BRASIL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DAS UNHAS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS

Pesquisador: Airton Abrahao Martin

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 01968718.6.0000.5494

Instituição Proponente: INSTITUTO DE CIENCIA E EDUCACAO DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.066.001

Apresentação do Projeto:

As novas tecnologias apresentam, como efeito secundário, a emissão de luz no comprimento de onda azul. Já se tem um amplo conhecimento sobre produtos que bloqueiam a luz ultravioleta. No entanto, ainda existe uma demanda de teste de eficácia de produtos que se propõem bloquear a luz azul. Este projeto tem como objetivo estudar a eficácia de produtos cosméticos no bloqueio da luz azul por Espectroscopia Raman Confocal. Esta técnica mede os constituintes bioquímicos da pele e é capaz de detectar se a radiação azul foi capaz de ultrapassar a barreira do produto e provocar alterações na pele. Serão selecionados 10 participantes de ambos os sexos com idade entre 19 a 55 anos. Realiza-se a medida dos espectros Raman antes da aplicação do produto e do LED azul. Esta medida é denominada T(0). Em seguida, aplica-se o produto sobre a pele massageando levemente. Após 15 min de descanso, aplica-se o LED azul, em seguida, realiza-se a medida dos espectros Raman. Esta medida é denominada T(15min). Após 2 horas da aplicação do produto, o LED é aplicado novamente. Em seguida, realiza-se a última medida dos espectros Raman T(2h). O mesmo procedimento será realizado na mão esquerda com um placebo para verificar se a atuação da formulação é devido aos excipientes ou aos ativos. A variável de análise é o pico de assinatura do betacaroteno, uma vez que, espera-se que a incidência da luz azul na pele produza diminuição deste pico devido à formação de espécies reativas de oxigênio que degradam o betacaroteno (VANDERSEE,2015). Para a comparação dos grupos será utilizado o método ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados serão considerados estatisticamente significativos para um

Endereço: RUA CAROLINA FONSECA, 584

Bairro: ITAQUERA

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2070-0167

CEP: 08.230-030

E-mail: comite.etica.sp@universidadebrasil.edu.br



UNIVERSIDADE BRASIL



Continuação do Parecer: 3.066.001

valor P 0,05, ou seja, com nível de significância de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Avaliar a eficácia de 1 (um) produto cosmético na proteção da pele humana contra a luz azul.

Objetivo Específico

Medir, por espectroscopia Raman confocal, a eficácia do produto após 15 minutos da aplicação e após 2 horas de aplicação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Em produtos cosméticos, o risco de reações adversas é baixo, pois todas as substâncias que compõem o produto são conhecidas e consideradas seguras para a finalidade que se destinam e na forma de aplicação orientada. Apesar disso, e embora raras, as reações locais podem ocorrer, tais como: eritema, edema, pápulas e vesículas que se resolvem à suspensão do uso do apórito ou do uso do produto e com anti-inflamatórios tópicos em alguns casos. Os tratamentos de eventos adversos serão de responsabilidade do pesquisador responsável.

Benefícios: Possível desenvolvimento de uma técnica que possa determinar a eficácia de um produto cosmético na proteção da pele contra a luz azul, de maneira não invasiva e em tempo real.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem delineado e embasado na contextualização. Os critérios de inclusão e de não inclusão, bem como a metodologia experimental estão bem definidos e seguindo os preceitos éticos.

As recomendações sugeridas foram cumpridas:

Inserção do local do estudo e origem da seleção da população amostral.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os requisitos do CEP e da Plataforma foram adequadamente preenchidos pelos pesquisadores.

Recomendações:

Considerações relatadas acima.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é viável e de interesse no campo da prevenção ou minimização dos danos na pele

Endereço: RUA CAROLINA FONSECA, 584

Bairro: ITAQUERA

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 08.230-030

Telefone: (11)2070-0167

E-mail: comite.etica.sp@universidadebrasil.edu.br



UNIVERSIDADE BRASIL



Continuação do Parecer: 3.066.001

Pesquisadores	termocompromisso.pdf	12:04:52	Moura Feitosa Veras	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTOASSINADA.docx	27/09/2018 11:59:32	Juscélia Maria de Moura Feitosa Veras	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 07 de Dezembro de 2018

Assinado por:
SILVIA CRISTINA NUNEZ
(Coordenador(a))

Endereço: RUA CAROLINA FONSECA, 584**Bairro:** ITAQUERA**CEP:** 08.230-030**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)2070-0167**E-mail:** comite.etica.sp@universidadebrasil.edu.br