



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

GABRIEL CIRONE LOPES

**EFEITOS DA DOSAGEM SÉRICA DE ZINCO NA FORÇA
MUSCULAR E DURABILIDADE DOS EFEITOS DE TOXINA
BOTULÍNICA: Uma análise quantitativa**

2024

GABRIEL CIRONE LOPES

**EFEITOS DA DOSAGEM SÉRICA DE ZINCO NA FORÇA MUSCULAR E NA
DURABILIDADE DOS EFEITOS DA TOXINA BOTULÍNICA: Uma análise
quantitativa**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Biomateriais. Linha de pesquisa: Estudos sobre bioatividade dos materiais, novas tecnologias aplicadas à odontologia, harmonização orofacial.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Máximo de Araújo

São José dos Campos

2024

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O presente estudo tem impacto importante na sociedade, visto que realiza uma pesquisa clínica, com produto vastamente utilizado no mercado mundial, na área da saúde, com finalidade estética e funcional. Relaciona o uso desse produto com protocolos empregados por alguns profissionais na prática clínica, mesmo que estes protocolos não tenham ainda evidências com fundamentação científica satisfatória. Deste modo o trabalho procurou esclarecer inter-relação do tratamento proposto com condição clínica do paciente para corroborar ou arrefecer as hipóteses sustentadas por alguns profissionais da área.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The present study has an important impact on society, since it carries out clinical research, with a product widely used in the world market, in the area of health, with an aesthetic and functional purpose. It relates the use of this product with protocols used by some professionals in clinical practice, even if these protocols do not yet have evidence with satisfactory scientific foundation. In this way, the work sought to clarify the interrelationship of the proposed treatment with the patient's clinical condition to corroborate or reverse the hypotheses supported by some professionals in the area.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Assist. Dr. Rodrigo Máximo de Araújo (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Tit. Dr. Sigmar de Mello Rode

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof^a. Dra. Karen Cristina Kazue Yui

Mestrado, Doutorado e Pós Doutorado

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 06 de fevereiro de 2024.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente ao meu orientador o Prof. Dr. Rodrigo Máximo de Araújo e a minha amiga e parceira Marcelle Simões Coelho, afinal se não tivéssemos tal parceria e entusiasmo, eu não teria chego até aqui.

Dedico também a minha mãe, Maura Cecília Cirone, minha irmã, Isadora Cirone Lopes, minha avó, Luana Fernandes Nicoleti e toda família, que sempre me apoiaram e deram todo suporte para que eu seguisse estudando e me aperfeiçoando.

Dedico também aos professores presentes nesta banca, Prof. Tit. Dr. Sigmar de Mello Rode e Prof^a. Dra. Karen Cristina Kazue Yui, por serem exemplos da dedicação a vida acadêmica.

AGRADECIMENTO

Começo este agradecimento, lembrando primeiramente de Deus, sem Ele nada seria possível.

Minha mãe, irmã, avó e toda família, agradeço por todo suporte que me foi dado ao longo de toda a jornada, estes 2 anos e meio desde que iniciei como aluno especial da pós graduação logo após me formar, com certeza foram muito mais tranquilos do que os 4 vividos durante a graduação. Eu agora um pouquinho mais velho e consequentemente mais independente e maduro, curto cada dia mais viver com vocês momentos leves e alegres, mesmo que em sua maioria sejam breves, faz parte que abdicamos de algumas coisas para perseguir um objetivo maior e tentar alcançar nossos sonhos. Entendo que isso é parte do jogo e o jogo da vida não é moleza, já passamos por tantas juntos e é uma honra e satisfação ter vocês comigo nesse dia tão importante.

Agradeço muito a minha parceira do graduação e parte do mestrado, Beatriz V. Simões, uma irmã que a faculdade me trouxe e se não fosse pelo incentivo e grande empurrão para me direcionar para vida acadêmica, provavelmente não teria chego até aqui.

Agradeço também a minha parceira do mestrado, Marcelle S. Coelho, que se tornou além de colega da pós, uma amiga da vida, sempre disposta a me ajudar, sempre me lembrando de como somos capazes quando, por vezes, fraquejei nesse caminho.

Agradeço aos amigos que tenho desde a graduação e se tornaram companheiros de pós graduação, aqueles que conheci depois de ingressar na pós graduação, todos com certeza serão sempre lembrados e obrigado por terem feito parte do caminho até aqui.

Agradeço aqui também meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Máximo de Araújo, ainda no final da graduação, durante a clínica de PPR, passamos a falar sobre a pós graduação, começou a surgir uma pulga atrás da orelha com algo que eu tinha certeza que nunca faria, tinha em minha cabeça cursos que queria fazer após a faculdade,

estava decidindo qual especialização iria ocupar meu tempo fora do consultório e me via assim, dentro do consultório atendendo mais e mais pacientes.

Eu sempre tive certo pavor de apresentações em público, nunca gostei de ser o centro das atenções e com esse chamado do professor para o mestrado acadêmico, no início tudo era muito frio, difícil e decorado para cada apresentação que precisava fazer, mas hoje em alguns momentos me pego dando uma aula e por vezes falando mais e mais sobre um assunto que me interessa em um só slide, que por vezes não tem nada além de uma ou duas figuras. Sou grato pelas oportunidades que tive ao longo desses 2 anos, com certeza estou fechando este ciclo muito mais preparado e capacitado do que entrei e muito disso devo a você, obrigado por todo apoio, incentivo e dedicação ao longo dessa jornada.

Deixo aqui um agradecimento também a todos os professores que cruzei ao longo desse caminho, aqueles que eram responsáveis por créditos do mestrado, aqueles que tive conversas pelo campus, todos que de alguma maneira se fizeram presentes e marcaram a memória que guardo com carinho desse ciclo que se fecha agora.

Agradeço aqui os professores que compõe hoje minha banca, o Prof. Tit. Dr. Sigmar de Mello Rode, que além de ter aceitado participar desta banca, viabilizou este projeto ao permitir que utilizássemos o eletromiógrafo, e aqui aproveito para estender os agradecimentos a FAPESP por ter dado condição para que a aquisição do equipamento fosse realizada através do Professor. E por fim, agradeço a Prof^a. Dra. Karen Cristina Kazue Yui, por também ter aceitado participar desta banca, tive o prazer de conhecê-la recentemente, através da HOF e sempre se mostrou aberta e muito interessada pelo assunto, um prazer tê-la em minha banca.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Lopes GC. Efeitos da dosagem sérica de zinco na força muscular e na durabilidade dos efeitos da toxina botulínica: uma análise quantitativa [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, 2024.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do nível sérico de zinco dos indivíduos em relação a força muscular e a na efetividade e durabilidade do tratamento com toxina botulínica (TB). Dezoito (18) pacientes foram selecionados, sendo que estes foram divididos posteriormente em 2 grupos: grupo 1 (G1) composto por pacientes que apresentavam Zn acima de 65 µg/dL e menor ou igual que 90 µg/dL e o grupo 2 (G2) com pacientes que apresentavam Zn acima 90 µg/dL e menor ou igual a 125 µg/dL. Todos os participantes tiveram a força de contração muscular mensurada por um eletromiógrafo de superfície (sEMG) (EMG System do Brasil Ltda, São José dos Campos, Brasil), em cada momento do acompanhamento (A1 – inicial; A2 – pós imediato; A3 – 2 semanas; A4 – 5 semanas; e A5 – 12 semanas). Além da eletromiografia, as fotografias dos pacientes foram capturadas, nas quais foram avaliadas a área com presença de rugas da fronte por meio do *software ImageJ* (*National Institutes of Health*). Os dados de RMS fornecidos pelo eletromiógrafo de superfície passaram por teste de normalidade *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov test* ($\alpha=0,05$) e posteriormente, por seguirem distribuição normal, foram submetidos a análise pelo teste Tukey de comparações múltiplas ($\alpha=0,05$) utilizando-se o programa *Prism 10* (*GraphPad Software*, Boston, EUA), sendo considerado nível de significância de 5%. Pela análise das fotografias através do *ImageJ*, todos os pacientes, apresentaram diminuição significativa da área de rugas com 2 semanas após aplicação da TB e mesmo após 12 semanas de acompanhamento, a área de rugas na fronte era menor do que a área prévia à aplicação. Sendo assim, tanto através da eletromiografia e da análise fotográfica foi possível constatar que as diferentes dosagens séricas de zinco não demonstraram nenhuma influência sobre a efetividade e durabilidade da TB.

Palavras-chave: toxina botulínica; eletromiografia; força muscular; zinco; rugas; autoestima.

ABSTRACT

Lopes GC. *Effects of serum zinc dosage on muscle strength and durability of botulinum toxin effects: a quantitative analysis [dissertation]*. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.

The objective of this study was to evaluate the influence of the serum zinc level of individuals in relation to muscle strength and on the effectiveness and durability of treatment with botulinum toxin (TB). Eighteen (18) patients were selected, and these were later divided into 2 groups: group 1 (G1) composed of patients who had Zn above 65 µg/dL and less than or equal to 90 µg/dL and group 2 (G2) with patients who had Zn above 90 µg/dL and less than or equal to 125 µg/dL. All participants had the strength of muscle contraction measured by a surface electromyograph (sEMG) (EMG System do Brasil Ltda, São José dos Campos, Brazil), at each moment of the follow-up (A1 - initial; A2 - immediate post; A3 - 2 weeks; A4 - 5 weeks; and A5 - 12 weeks). In addition to electromyography, photographs of the patients were captured, in which the area with the presence of forehead wrinkles was evaluated using the **ImageJ (National Institutes of Health) software**. The RMS data provided by the surface electromyograph underwent the **Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov** normality test ($\alpha=0.05$) and later, because they followed normal distribution, were subjected to analysis by the Tukey test of multiple comparisons ($\alpha=0.05$) using the **Prism 10** program (**GraphPad Software**, Boston, USA), being considered a significance level of 5%. By the analysis of the photographs through **ImageJ**, all patients showed a significant decrease in the area of wrinkles at 2 weeks after application of TB and even after 12 weeks of follow-up, the area of wrinkles on the forehead was smaller than the area prior to the application. Thus, both through electromyography and photographic analysis it was possible to verify that the different serum dosages of zinc did not show any influence on the effectiveness and durability of TB.

Keywords: botulinum toxin; eletromyography; muscle strength; zinc; wrinkles; self-esteem.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Toxina Botulínica	14
2.1.1 Histórico.....	14
2.1.2 Mecanismo de ação da TB	15
2.2 Eletromiografia de Superfície	17
2.3 Zinco.....	18
3 PROPOSIÇÃO	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Critérios de inclusão.....	22
4.2 Critérios de não inclusão	23
4.3 Critérios de exclusão.....	23
4.4 Eletromiografia de Superfície	24
4.4.1 Especificações do eletromiógrafo.....	24
4.4.2 Detalhamento dos eletrodos e do posicionamento	24
4.5 Reconstituição e aplicação TB	26
4.6 Análise do Zinco	27
4.7 Análise da área de rugas da fronte	28
4.8 Análise estatística.....	29
5 RESULTADO	31
5.1 Eletromiografia de Superfície – Efetividade e durabilidade TB.....	31
5.2 Influência dosagem Zn na força muscular	35
5.3 Análise fotográfica através do ImageJ	37
6 DISCUSSÃO	38
6.1 Toxina botulínica.....	38
6.1.1 Durabilidade e dosagem de TB.....	39
6.1.2 Recomendações após tratamento com TB	39
6.1.3 Efeitos adversos ou indesejados pós aplicação de TB	40
6.1.4 Pesquisa e avanços sobre TB	41
6.2 Eletromiografia de Superfície (sEMG).....	41

6.3 Zinco.....	43
6.4 Avaliação fotográfica pelo ImageJ	45
7 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO	51

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população, vemos o aumento da população idosa, desta forma com o passar do tempo os padrões de beleza também mudaram e desde os tempos antigos as pessoas querem manter sua jovialidade e boa aparência, mesmo que o envelhecimento seja uma regra e um fato na vida de todos. Esses fatores também vêm atrelados a manutenção da qualidade de vida da população, já que o significado de saúde vai muito além da ausência de doença (Kattimani et al., 2019; Konda et al., 2013; Beylot, 2019).

Os procedimentos estéticos minimamente invasivos, estão ficando cada dia mais populares e a Sociedade Americana de Cirurgia Plástica Estética nas estatísticas de 2020-2021 demonstrou com seus dados que a toxina botulínica (TB) é o procedimento estético não cirúrgico mais popular seja entre homens e mulheres, atingindo neste período um total de mais de 3,6 milhões de pacientes que se submeteram ao uso da TB. Já os procedimentos preenchedores, por exemplo, ficam por volta de 1,8 milhões de pacientes, próximo a 50% da TB. Outro dado interessante levantado por eles é que 41% dos pacientes têm entre 36-50 anos de idade e 37% possuem entre 51-70 anos (Attenello, Maas, 2015; Aesthetic Plastic Surgery National Databank STATISTICS, 2020-2021). Segundo a Sociedade Americana para Cirurgia Dermatológica, o índice de satisfação envolvendo esses procedimentos é de 95% ou mais (ASDS Consumer Survey on Cosmetic Dermatologic Procedures, 2021).

A TB possui sete sorotipos diferentes dessa neurotoxina relacionadas a paralisia. O botulismo humano está frequentemente associado aos sorotipos A, B, E e ocasionalmente pode estar relacionado a F e G. A TBA é muito utilizada porque apresenta rápido crescimento em cultura, a cristalização é estável e permite uma purificação efetiva e assim uma melhor duração dos efeitos terapêuticos da toxina (Nascimento et al., 2021; Sethi et al., 2021).

As marcas comerciais comercializam TBA, composta por uma cadeia peptídica simples de 150kDa, onde a proteína ativa é uma cadeia leve (50kDa) e uma cadeia pesada (100kDa) unidas por uma ponte de dissulfeto associada a um átomo de zinco. A ação ocorre no sistema nervoso periférico e impede a liberação da acetilcolina no terminal pré-sináptico na junção neuromuscular e assim diminui ou

impede a contração muscular, além de inibir o aparecimento das rugas dinâmicas, as quais aparecem durante o movimento, e pode melhorar as rugas estáticas, aquelas que mesmo com o rosto relaxado permanecem marcadas. Visualmente é possível constatar a eficiência no desaparecimento das rugas dinâmicas pós aplicação da TBA e com o passar do tempo formam-se novas fendas sinápticas e a contração muscular vai retornando gradativamente (Nascimento et al., 2021; Small, 2014; Sposito, 2009).

Os efeitos clínicos podem acontecer entre 1 e 7 dias após a injeção da TBA, sendo mais frequente entre 1 e 3 dias, e o período de pico de ação é em torno de 1 a 2 semanas e a recuperação completa do nervo ocorre entre 3 e 6 meses, a própria bula do BOTOX® traz que os resultados duram até 24 semanas na região de frente e 16 semanas nas linhas de expressão periorbital (Bula Botulim® Blau Farmacêutica S/A; Allergan Produtos Farmacêuticos LTDA, 2022).

Alguns estudos relacionam o zinco (Zn) com força muscular e massa muscular nos indivíduos, no organismo humano o Zn é o segundo micronutriente mais abundante perdendo apenas para o ferro, mas se analisarmos a concentração intracelular, ele se torna o mais abundante, estando presente principalmente na musculatura esquelética e nos ossos (Krotkieeski et al., 1982; Livingstone, 2015; Waters et al., 2014). A toxina botulínica é uma metaloprotease de zinco (Schiavo et al., 1992). Sabendo-se desta informação um estudo com camundongos constatou que na presença de zinco quelado, a clivagem da SNAP-25 não ocorre e isso retarda significativamente o início da paralisia pela TBA (Fu et al., 1998; Simpson et al., 1993). Desta maneira constatou-se que para que a TBA efetivamente clive a SNAP-25, é necessário que a molécula sofra endocitose pela célula alvo, que ocorra a translocação dependente de pH e a presença de Zn é de suma importância (Kalandakanond, Coffield, 2001).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o nível sérico adequado de Zn no sangue para um adulto varia entre 70-120 µg/dL (10,7-18,3 µmol/L) (WHO - Trace Elements in Human Nutrition and Health, 1996). No presente estudo iremos avaliar através da eletromiografia de superfície e exames laboratoriais com nível sérico de Zn no sangue dos pacientes se essas informações encontradas anteriormente, podem de fato possuir relação e influência sobre a ação da TBA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Toxina Botulínica

2.1.1 Histórico

A TB tem sua história iniciada em 1895, após surto de botulismo na vila de Ellezelles, na Bélgica, um microbiologista belga isolou pela primeira vez o *Clostridium botulinum*, por ele chamado então de *Bacillus botulinus*, este foi Dr. Emile Pierre van Ermengem (1851-1922), que foi treinado por Robert Koch (1843-1910), sendo que este foi o primeiro pesquisador que conseguiu comprovar que certos microrganismos podiam gerar doenças em animais (Gunn, 1979; van Ermengem, 1979). Durante a Primeira e Segunda Guerras Mundiais, a toxina botulínica foi muito pesquisada para ser uma arma biológica, mas não obtiveram sucesso para essa finalidade (Sotos, 2001). Por volta de 1920 a TB do tipo A (TBA) foi isolada e purificada por Dr. Herman Sommer e seus colegas da Universidade da Califórnia. Já em 1946 pesquisadores de Fort Detrick, laboratório da Academia de Ciências dos EUA, obtiveram a forma cristalina da TBA e consequentemente após isso Dr. Edward Schantz produziu o primeiro lote para utilização em seres humanos (Klein, 1996; Schantz et al., 1997; Ting et al., 2004).

Durante muito tempo a TB foi usada para tratar o estrabismo na oftalmologia, a partir da década de 60 estudos em macacos passaram a ser realizados e em 1978, Dr. Allan Scott recebeu autorização da FDA (Food and Drugs Administration) para realizar o tratamento em voluntários humanos. E dessa maneira tornou-se uma alternativa para o tratamento cirúrgico convencional do estrabismo, além de tratar blefaroespasmos e outras condições de hiperatividade dos músculos extraoculares (Scott et al., 1973; Klein, 1996; Ting et al., 2004). Na década de 80, neurologistas que vinham pesquisando outras aplicações para TB utilizaram para tratar tremores e espasmos na face, pálpebras, tronco e membros. Diversas aplicações “*off-label*” são utilizadas na neurologia para melhorar a qualidade de vida e conforto dos pacientes

(Jankovic, 1997; Mahant et al., 2000; Verheyden, 2001).

E finalmente por voltar dos anos 90, a dermatologia passou a utilizar a TB. A oftalmologista Jean Carruthers observou que as rugas desapareciam quando utilizava a TBA para tratar blefaroespasma. Ela compartilhou tal achado com seu esposo dermatologista Alastair Carruthers e assim descobriram a aplicação estética da TB que revolucionou os tratamentos estéticos minimamente invasivos (Ting et al., 2004; Serrera-Figallo et al., 2020).

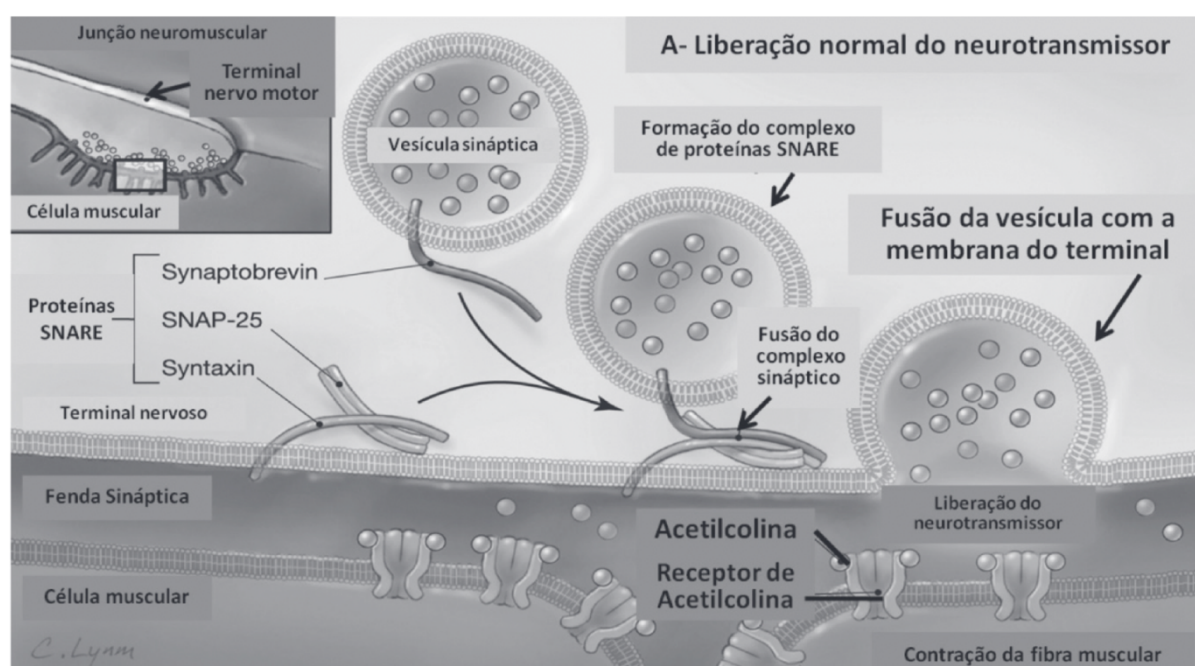
2.1.2 Mecanismo de ação da TB

A TB é um conjunto de proteínas, sendo as neurotoxinas botulínicas junto a proteínas não tóxicas. A síntese da TB acontece formando uma única cadeia polipeptídica de aproximadamente 150 kDa de massa molecular. Quando ativada a cadeia sofre proteólise e forma uma cadeia leve de aproximadamente 50 kDa e uma cadeia pesada de aproximadamente 100 kDa unidas por uma única ligação de dissulfeto (Dressler et al., 2005). A TB é uma neurotoxina que pode se apresentar em 7 diferentes sorotipos, sendo eles A, B, C, D, E, F e G (Lacy et al., 1998; Montecucco, Schiavo, 1995). Qualquer um dos 7 sorotipos atuam através da inibição da liberação de acetilcolina, mas possuem variáveis como proteínas-alvo, características de ação e potência (Dressler et al., 2005).

A contração muscular ocorre, em condições típicas, quando o neurônio motor despolariza o terminal axônico e isso promove a liberação de acetilcolina na fenda sináptica pelas vesículas pré-sinápticas por exocitose, isso acontece através de proteínas transportadoras do complexo de proteínas SNARE (Wenzel et al., 2004). A cadeia pesada da TB possui alta seletividade às estruturas dos terminais nervosos colinérgicos, após essa ligação existe a internalização da cadeia leve de TB que se liga ao complexo SNARE (Rizo, Südhof, 1998). A TBA, objeto de estudo deste trabalho, atua clivando a proteína sinaptossomal de 25 kDa (SNAP-25) e assim impede com que a acetilcolina se ligue as vesículas internas da membrana plasmática e resulta no bloqueio da fusão com a vesícula e assim impede a liberação na fenda sináptica (Blasi et al., 1993; Dressler et al., 2005). Consequentemente gera a

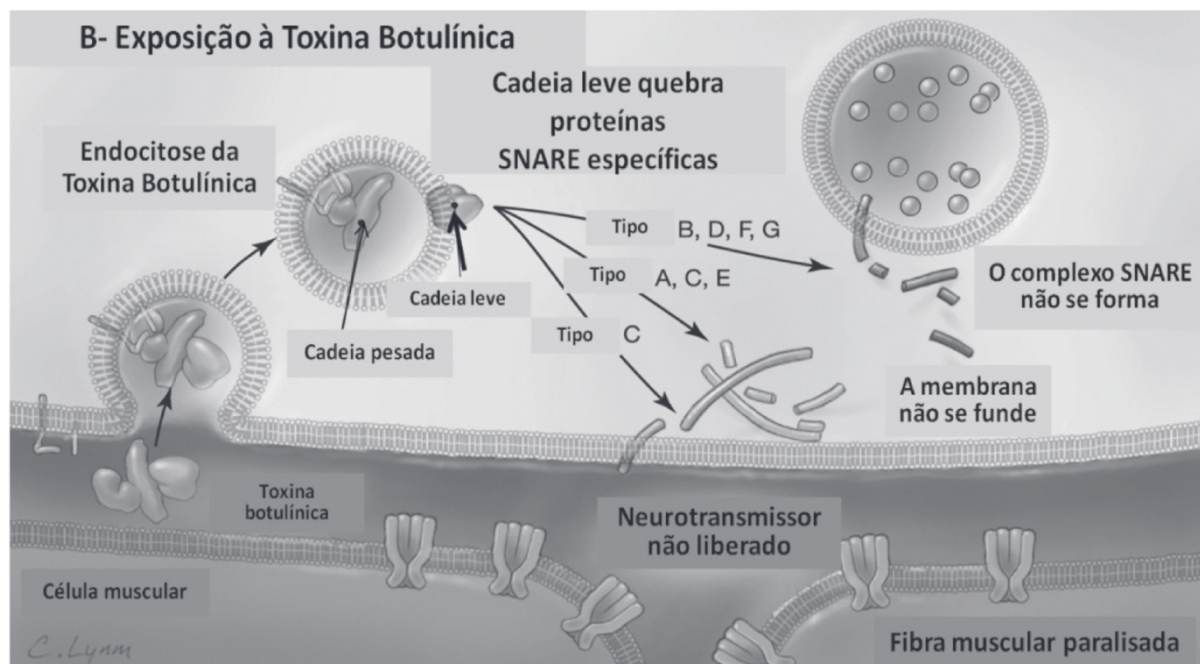
denervação química do músculo e assim gera a fraqueza ou paralisia clássica. Embora a ligação entre cadeia leve de TB e a proteína-alvo seja permanente, o efeito paralítico dura em torno de 2 a 6 meses. O motivo do restabelecimento da força muscular e/ou reversão da paralisia se deve ao neobrotamento axonal e alongamento da placa terminal, essa neurogênese recupera a via de sinalização neural e reestabelece a função muscular (Kattimani et al., 2019; Pamphlett, 1989).

Figura 1 - Esquema da dinâmica na placa motora durante contração muscular.



Fonte: Sposito, 2009.

Figura 2 - Esquema da dinâmica na placa motora durante contração muscular após aplicação de TB.



Fonte: Sposito, 2009.

2.2 Eletromiografia de Superfície

O uso da eletromiografia de superfície (sEMG) foi descrito em humanos pela primeira vez por Edmund Jacobson em torno de 1925-1930, num trabalho inovador, pioneiro relacionando a atividade neural com ação motora do indivíduo. Já em relação aos músculos faciais, os primeiros trabalhos surgem por volta da década de 50 e 60 (Tassinari, Cacioppo, 1992).

Os sinais gerados através da realização da sEMG, são sinais considerados bioelétricos e podem ser detectados por via intramuscular ou sobre a superfície da pele, esses demonstram características da função muscular e informações sobre atividade muscular, durante contração ou relaxamento da musculatura. A sEMG ainda apresenta uma vantagem em relação a eletromiografia intramuscular, pois é um procedimento que não necessita nenhuma intervenção anestésica no paciente e é um procedimento completamente indolor e uma técnica simples (Alkan, Günay, 2012; Chowdhury et al., 2013; Papagiannis et al., 2019).

Através desses sinais gerados pelo exame, no campo de diagnósticos clínicos e da biomedicina, a eletromiografia de superfície se apresenta como uma importante ferramenta e pode também auxiliar na definição de planos de tratamento para os pacientes ainda mais adequados (Chowdhury et al., 2013; Papagiannis et al., 2019; Wang et al., 2005). A sEMG apresenta algumas vantagens sobre a avaliação visual das expressões faciais, pois proporciona uma análise precisa e imparcial da atividade muscular, detectando estímulos elétricos nas musculaturas que podem ser visualmente imperceptíveis (Dimberg, 1990).

2.3 Zinco

Os nutrientes do organismo podem ser divididos em 2 diferentes grupos: o tipo 1, como ferro e a vitamina A, que são aqueles importantes para uma ou mais funções específicas, e o tipo 2, que são nutrientes considerados fundamentais para o metabolismo em geral, como o magnésio, as proteínas e o Zn (King, 2011).

Em 1982, Krotkiewski et al., relataram em um estudo duplo cego com 16 participantes que os indivíduos tratados por 14 dias com suplementação de Zn apresentaram um aumento significativo na força dinâmica. Outro estudo de Waters et al., de 2014, trouxe dados em que sugerem uma associação do ritmo de caminhada mais lento em idosos com ingestão de Zn diária de <1mg, sendo o recomendado de 8mg/dia para mulheres e 11mg/dia para homens, segundo "Dietary Reference Intakes" (DRIs) da Academia de Ciências Nacional dos EUA. Alguns exemplos de alimentos apresentam diferentes concentrações de Zn, a clara do ovo possui cerca de 0,002mg/100g, o frango 1mg/100g, enquanto a ostra possui 75mg/100g. Uma dieta baseada em marisco, ostras e carnes vermelhas apresentam uma maior concentração de Zn quando comparado à dieta a base de ovos e carnes brancas.

Mesmo com tudo que tem sido estudado sobre o Zn tanto para metabolismo celular e corporal, ainda não se identificou um biomarcador sensível e específico sobre ele, devido à sua inespecificidade e sua atuação em diversas funções metabólicas em todo organismo. A distribuição plasmática de Zn pode ser sensível à dieta/ingestão de zinco do indivíduo, pela redistribuição metabólica do Zn, no entanto até o presente

momento a utilização da concentração plasmática de zinco tem sido o método mais apropriado para diagnosticar, por exemplo, a prevalência de deficiência de Zn no organismo (Gupta et al., 2020; King, 2011).

A deficiência de Zn teve seu primeiro relato por volta da década de 60, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 2 bilhões de pessoas sofram de deficiência de Zn em todo o mundo, devido à alta ingestão de dietas ricas em fitato, provindo de proteínas de cereais, o que prejudica a absorção de Zn no organismo e leva a deficiência deste importante nutriente. Alguns efeitos podem ser ocasionados por sua deficiência, como hipogonadismo, atraso no crescimento e desenvolvimento do indivíduo, prejuízo imunológico, aumento de citocinas inflamatórias e do estresse oxidativo celular (Prasad, 2014).

Com intuito de tratamento do envenenamento pela toxina, estudo relacionado ao Zn e a ação da TB de Simpson et al., de 1993, traz um relatório expressando relação de agentes quelantes do Zn e início de ação da TB de diversos sorotipos, demonstrando que através de quelantes de Zn é possível retardar o início de ação da TB, no entanto demonstra que a indisponibilidade de Zn para se ligar à molécula de TB impossibilita seu mecanismo de ação demonstrando a relação entre ambos.

Trabalho publicado de Koshy et al., 2012, trouxe dados de que 92% dos indivíduos que suplementaram 50mg de Zn relataram um índice de 30% de aumento na duração dos efeitos da TBA e 84% relataram que perceberam aumento na efetividade da TBA, demonstrando, segundo os autores, que a TBA pode apresentar maiores efeitos na presença de suplementação com Zn. Além deste estudo, em 2013 Prasad publicou um trabalho, não relacionando o uso de toxina botulínica com Zn, mas o qual elucidou que a suplementação de zinco em idosos pode levar a menores concentrações de marcadores oxidativos plasmáticos, citocinas inflamatórias e aumento do nível plasmático de Zn, além de ter observado no grupo suplementado diminuição de incidência de infecções, trazendo a suplementação como uma possibilidade benéfica em idosos.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo primário deste trabalho foi avaliar a influência da dosagem sérica de Zn na efetividade e durabilidade da toxina botulínica, através da mensuração da contração muscular por sEMG, em diferentes tempos. Sendo a hipótese nula de que não há diferença na efetividade e durabilidade dos efeitos da toxina botulínica entre pacientes com diferentes dosagens séricas de Zn.

Como objetivo secundário, avaliar através do *software ImageJ* se a área das rugas da região da fronte, onde foi aplicada a toxina botulínica antes do procedimento é maior do que após os efeitos da TB, verificando sua efetividade e acompanhar a área das rugas ao longo do tratamento até à 12^a semana de acompanhamento para verificar a durabilidade dos efeitos da TB.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

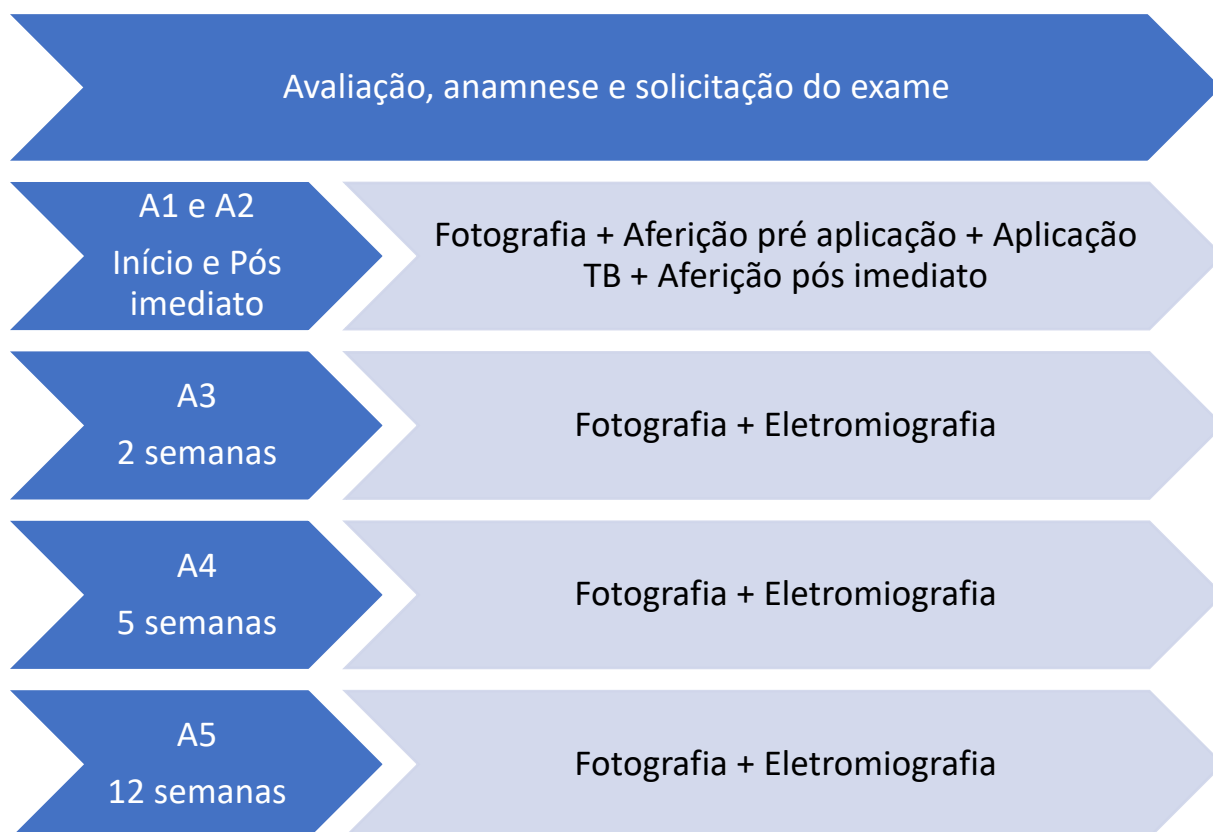
Os pacientes foram submetidos a uma anamnese detalhada. O preenchimento da anamnese foi a primeira conduta realizada junto ao paciente, pois através dela que conhecemos o paciente que foi ou não submetido ao tratamento, pois foi avaliado o estado de saúde geral, uso de medicações de uso contínuo, hábitos e expectativas acerca do resultado.

O estudo basicamente passou por 3 fases: avaliação das respostas neuromusculares durante movimentos expressivos antes e após a aplicação da TB (Botulim 100U, Hugel, Inc. Chuncheon - Coreia do Sul) através da sEMG; análise da dosagem de Zn por meio do hemograma; análise das imagens pelo software Image J.

De acordo com cálculo amostral realizado através do site <http://estatistica.bauru.usp.br/calculoamostral>, foram selecionados dezoito (18) pacientes, gerando poder de 80%, desses foram avaliados o nível sérico de Zn, considerando 2 grupos de pacientes de acordo com os exames realizados por eles. Todos os pacientes elegíveis para o estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Além disso, importante ressaltar que este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa local, CAAE 58828122.0.0000.0077, do qual sou parte integrante da equipe.

Figura 3 - Fluxograma das etapas de desenvolvimento do estudo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

No fluxograma acima, Figura 3, demonstra o fluxo de atendimento e acompanhamento clínico dos pacientes, em D1 paciente é submetido a aferição eletromiográfica antes e após a aplicação da TB, que acontece neste momento. D2, D3 e D4 possuem mesmo escopo de execução, nestes 3 momentos de acompanhamento paciente era fotografado e a aferição eletromiográfica era realizada.

4.1 Critérios de inclusão

- a) Presença de rugas dinâmicas no terço superior da face;
- b) Idade entre 20 e 70 anos;

- c) Índice de massa corporal entre 18 e 35;
- d) Não tenham se submetido a aplicação de toxina botulínica a menos de 6 meses;
- e) Não tenham se submetido a suplementação de Zn a menos de 6 meses;

4.2 Critérios de não inclusão

- a) Pacientes que recusaram a responder uma ou mais perguntas da anamnese;
- b) Pacientes os quais se recusaram a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido;
- c) Pacientes que não poderiam comparecer no momento correto para as aferições com o eletromiógrafo;
- d) Ausência de rugas dinâmicas no terço superior da face;
- e) Tenham se submetido a aplicação de toxina botulínica a menos de 6 meses;
- f) Tenham se submetido a suplementação com Zn a menos de 6 meses;
- g) Pacientes que apresentassem alguma disfunção de atividade motora em repouso.

4.3 Critérios de exclusão

- a) Pacientes que se recusaram a comparecer as aferições com eletromiógrafo após terem recebido toxina botulínica;
- b) Pacientes que não respeitaram o intervalo necessário entre aplicações de toxina botulínica. Que se submetam a uma nova aplicação de toxina botulínica no intervalo entre aferições, indo contra, inclusive, das recomendações do próprio fabricante da toxina;
- c) Pacientes que mesmo após as recomendações, iniciassem suplementação com Zn durante o período de acompanhamento.
- d) Pacientes que apresentassem alguma disfunção de atividade motora em repouso.

4.4 Eletromiografia de Superfície

4.4.1 Especificações do eletromiógrafo

Para o registro eletromiográfico, foi utilizado o eletromiógrafo EMG-800C-832 de oito canais (EMG System do Brasil Ltda, São José dos Campos, Brasil), previamente calibrado, com ganho de amplificação total de 2000 vezes, rejeição de modo comum $>100\text{dB}$, placa conversora analógico-digital (A/D) de 16 bits com resolução de faixa dinâmica, comunicação ao microcomputador utilizando adaptador de rede Ethernet 10Mbits com conector RJ45 (10BASE T) utilizando o protocolo TCP/IP; filtro analógico do tipo Butterworth de dois polos, de passa- baixa (FPB) de 500Hz e passa-alta (FPA) de 20 Hz; software de aquisição e análise de sinais eletromiográficos plataforma Windows Vista/XP para apresentação simultânea dos sinais de vários canais e tratamento do sinal (valor de RMS, média, mínimo, máximo e desvio padrão, FFT (online) com taxa de aquisição (amostragem) de até 2000 amostras / segundo por canal programável por software.

Foram utilizados quatro canais de entrada com eletrodos ativos com ganho de amplificação de 20 vezes para a coleta do sinal eletromiográfico.

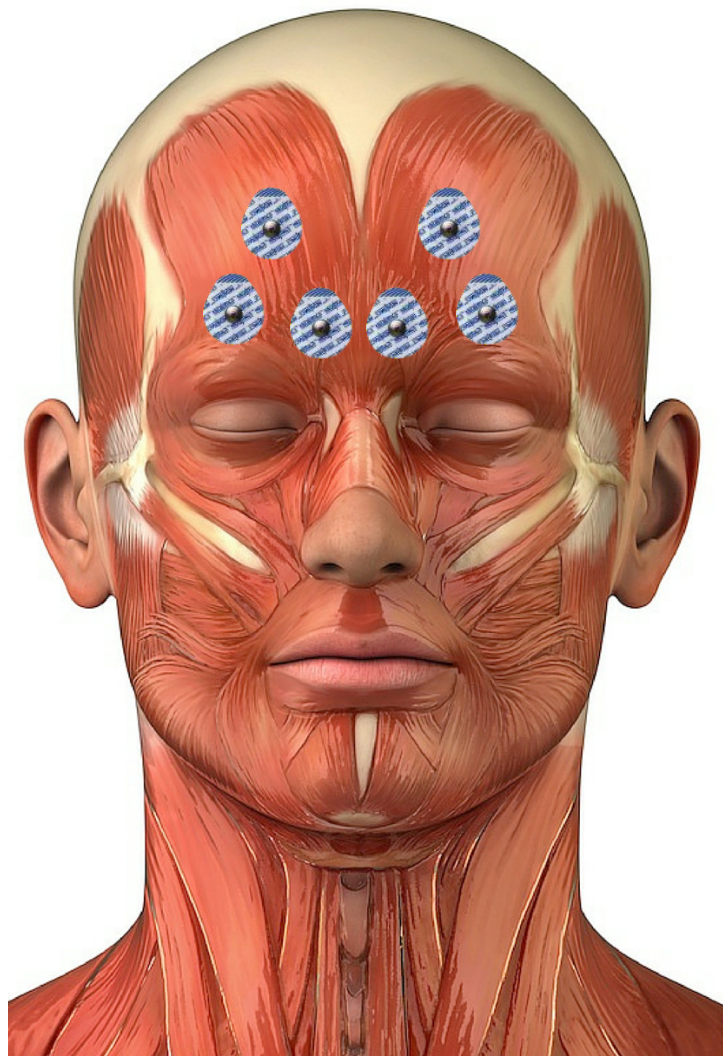
4.4.2 Detalhamento dos eletrodos e do posicionamento

Foram utilizados 7 eletrodos de superfície bipolares de Ag/AgCl a cada momento de acompanhamento do estudo, estes apresentavam formato circular e são descartáveis (Chicopee MA01, Meditrace® Kendall-LTP, Dublin, Irlanda), com eles foram captados os sinais da atividade elétrica dos músculos subjacentes, alvos do estudo, e forneceram assim a abordagem geral da dinâmica muscular. Além dos eletrodos posicionados no terço superior da face dos pacientes detalhado na Figura 4, um eletrodo de referência (terra) foi posicionado no dorso da mão direita dos pacientes.

Os voluntários permaneceram acomodados na cadeira odontológica para a coleta dos dados, que iniciou pela limpeza da pele com lenço demaquilante, em caso de maquiagem, seguido por algodão embebido em álcool 70% para reduzir a impedância da mesma e para a adequada colocação dos eletrodos de superfície orientados pela direção das fibras musculares.

A posição dos eletrodos foi determinada pela palpação muscular de acordo com ilustração esquemática da Figura 4 a seguir:

Figura 4 – Esquema do posicionamento dos eletrodos nos pacientes



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a realização da aferição eletromiográfica, o paciente recebeu instruções prévias e treinamento do movimento de contração a ser realizado durante o tempo de aferição do aparelho, cada um dos músculos de interesse tiveram seus dados coletados em triplicata para cada um dos lados da face. Resultando em 6 valores de RMS para cada grupo de músculo, sendo eles 3 valores de RMS para o frontal esquerdo, 3 para frontal direito, 3 para corrugador esquerdo e 3 para o corrugador direito, gerando dessa maneira uma maior confiabilidade dos dados. Foram realizadas aferições em 5 momentos distintos a cada paciente utilizando o eletromiógrafo de superfície:

- A1: aferição pré aplicação da TB;
- A2: aferição imediatamente após a aplicação da TB;
- A3: aferição 2 semanas após a aplicação da TB;
- A4: aferição 5 semanas após a aplicação da TB;
- A5: aferição 12 semanas após aplicação da TB.

4.5 Reconstituição e aplicação TB

A restituição ou também chamada diluição utilizada neste estudo seguiu o padrão de 2ml de soro fisiológico estéril para injeção para cada 100 unidades de TB (Botulim 100U, Blau Farmacêutica S/A, Cotia/SP, Brasil).

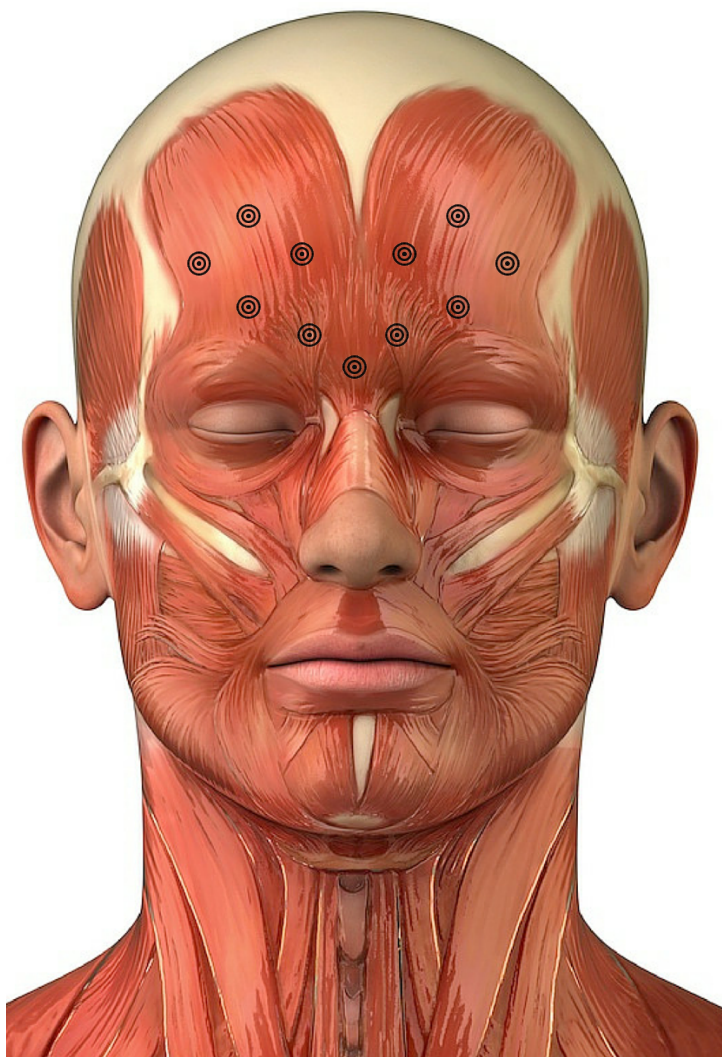
A aplicação dessa solução em cada ponto foi realizada por via intramuscular com auxílio de seringa de 1 mL e agulha 30G fixa.

Os riscos para esse protocolo de pesquisa são considerados médios devido à aplicação da TB, que pode gerar alguns efeitos adversos ou secundários após a aplicação, como pequenas marcas transitórias no local da aplicação, hematomas, inflamação ou reações não desejadas descritas na bula, esses efeitos são comumente transitórios e totalmente reversíveis.

Na Figura 5, está descrito o esquema dos pontos de aplicação para referenciar a região de interesse de estudo, no entanto as aplicações ocorreram de modo que o planejamento levou em consideração avaliação clínica da força de

contração e entedimento da necessidade dos pacientes, não sendo possível tratar todos os pacientes com uma única dosagem padronizada.

Figura 5 - Localização de referência dos pontos de aplicação



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Análise do Zinco

Na primeira avaliação, foi solicitado o exame de sangue ao paciente para dosagem de Zn, recomendado que fosse realizado pela manhã com jejum

designado pelo laboratório de escolha do paciente para padronização da análise por cada um dos laboratórios pertinentes.

No segundo atendimento, dia da aplicação de TB, o paciente trazia os resultados do exame, mas neste momento estes resultados eram armazenados e desconsiderados para prosseguimento do estudo.

Somente ao final dos acompanhamentos os pacientes foram agrupados nos 2 diferentes grupos do estudo, sendo grupo 1 (G1) composto por pacientes que apresentavam Zn acima de 65 $\mu\text{g/dL}$ e menor ou igual que 90 $\mu\text{g/dL}$ e o grupo 2 (G2) com pacientes que apresentavam Zn acima 90 $\mu\text{g/dL}$ e menor ou igual a 125 $\mu\text{g/dL}$.

Dessa forma foi possível avaliar quantitativamente através das aferições pela sEMG e das análises fotográficas pelo ImageJ se houve ou não influência do Zn, dosado no início do tratamento, na efetividade e durabilidade dos efeitos da TB nos pacientes participantes do estudo.

4.7 Análise da área de rugas da fronte

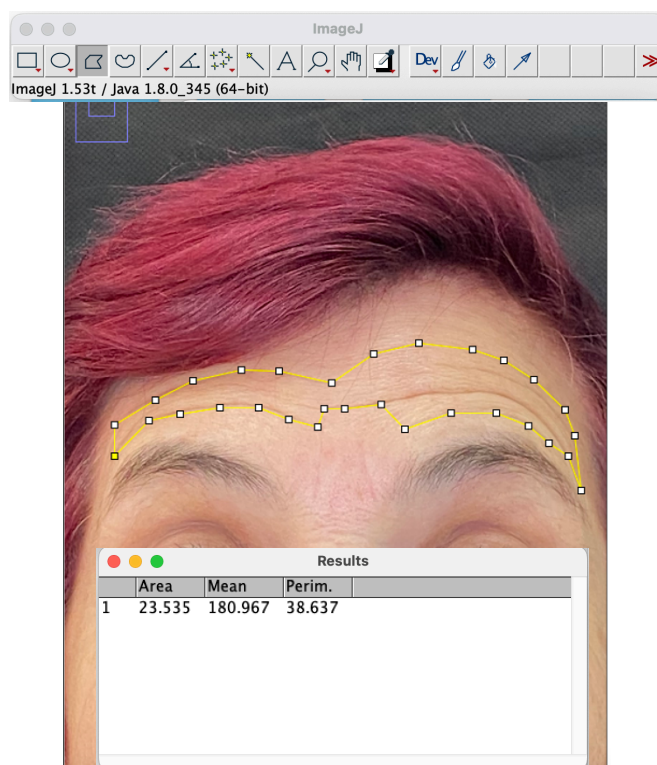
Para a análise da área de rugas na fronte dos pacientes, foram obtidas fotografias dos pacientes em 4 momentos, sendo eles antes da aplicação da TB, após 2, 5 e 12 semanas da aplicação. Todas as fotografias foram obtidas com auxílio de um *smartphone* iPhone 11 pro, calibrado em todas as tomadas zoom de 2.3x com o paciente sentado em uma cadeira de posição fixa a uma distância padrão de 1,3m, com marcações no chão onde o profissional permanecia localizado no momento da tomada fotográfica.

Ao lado do paciente, compondo a imagem sempre havia uma régua milimetrada, para calibrar as análises posteriores, na mensuração das estruturas no software Image J (*National Institutes of Health*).

Através desse software foi mensurada a área em cm quadrados das rugas da região da fronte em que foi aplicada a TB. As medidas foram realizadas em triplicatas, pelo mesmo operador, calibrado para tal, em dias distintos, para assim aumentar a confiabilidade nos dados, e para análise a média desses valores foi

considerada. Dessa forma foi possível observar se houve melhora na qualidade da pele e quantificar a área após o tratamento e ao longo do acompanhamento de 5 e 12 semanas dos participantes.

Figura 6 – Imagem ilustrativa da forma de medição no software



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.8 Análise estatística

Os dados eletromiográficos de contração muscular, gerados pelo software do aparelho em RMS (*Root Mean Square* – Raiz média quadrática), considerado valor eficaz, foram analisados segundo a média das 6 aferições realizadas em cada músculo, sendo 3 do lado direito e 3 do lado esquerdo. E ainda foram avaliados de acordo com cada período de aferição, sendo eles antes da aplicação da TB (A1), imediatamente após a aplicação da TB (A2), 2 semanas da aplicação da TB (A3), 5 a 6 semanas da aplicação da TB (A4) e por fim 12 a 13 semanas da aplicação da TB

(A5). Posteriormente a avaliação geral dos dados, para verificação da efetividade do tratamento com TB sem distinção entre os pacientes, foi realizado uma segunda análise com os pacientes separados em grupos de acordo com suas dosagens de Zn e novos resultados foram encontrados.

As médias passaram pela análise estatística em software apropriado *Prism 10* (*GraphPad Software*, Boston, EUA), onde foi analisado o pressuposto de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov test ($\alpha=0,05$) e baseado em seus resultados, optou-se pelo teste paramétrico, o teste Tukey de comparações múltiplas ($\alpha=0,05$).

Para analisar a questão da influência do Zn, foi realizado a avaliação da força muscular ao longo do tempo, inicial (A1), imediato (A2), 2 semanas (A3), 5 semanas (A4) e 12 semanas (A5) entre os indivíduos dos grupos G1 e G2. Para essa comparação dados passaram novamente pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov test ($\alpha=0,05$) e baseado em seus resultados, optou-se pelo teste paramétrico, o teste t não pareado ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADO

5.1 Eletromiografia de Superfície – Efetividade e durabilidade TB

A primeira análise realizada no estudo foi para constatar, antes de fazer qualquer divisão dos participantes, que a TB apresentou efetividade esperada de seu tratamento reduzindo a força de contração muscular e consequentemente diminuindo o aparecimento de linhas de expressão, as rugas/rítides na região tratada.

A análise descritiva dos valores eletromiográficos de RMS de cada músculo avaliado em todos os participantes do estudo e durante todos os períodos (A1; A2; A3; A4; A5) em contração podem ser visualizados na Tabela 1 em relação ao grupo muscular do frontal e na Tabela 2 em relação ao grupo muscular do corrugador e nas Figuras 6 e 7. Juntamente a eles podem ser observados a mediana, o desvio-padrão, valores mínimos e máximos de RMS.

Tabela 1 - Estatística Descritiva - Força Muscular (RMS) – Músculo Frontal

FRONTAL	Pré aplicação - A1	Pós imediato - A2	2 semanas - A3	5 semanas - A4	12 semanas - A5
Número de valores	18	18	18	18	18
Mínimo	35,71	35,05	14,39	22,99	25,83
Máximo	167,2	179,5	88,54	82,89	102,5
Diferença	131,5	144,4	74,15	59,90	76,62
Média	80,94	96,40	43,83	47,44	62,27
Desvio Padrão	30,56	42,81	21,78	17,76	20,68
Coeficiente de variação	37.76%	44.41%	49.68%	37.44%	33.22%

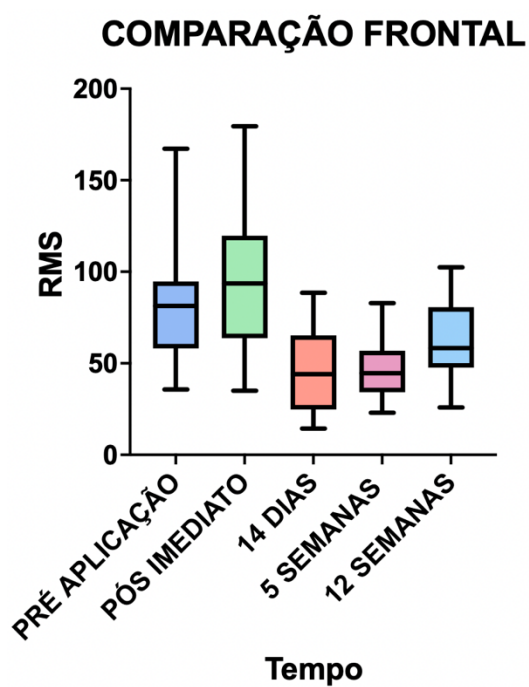
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 - Estatística Descritiva - Força Muscular (RMS) – Músculo Corrugador

CORRUGADOR	Pré aplicação - A1	Pós imediato - A2	2 semanas - A3	5 semanas - A4	12 semanas - A5
Número de valores	18	18	18	18	18
Mínimo	30,02	32,86	11,74	13,43	22,01
Máximo	150,1	140,9	69,41	111,4	78,13
Diferença	120,1	108,0	57,67	97,99	56,12
Média	70,24	68,82	39,80	46,71	39,46
Desvio Padrão	30,48	24,98	16,67	27,98	15,02
Coefficiente de variação	43.39%	36.30%	41.90%	59.91%	38.06%

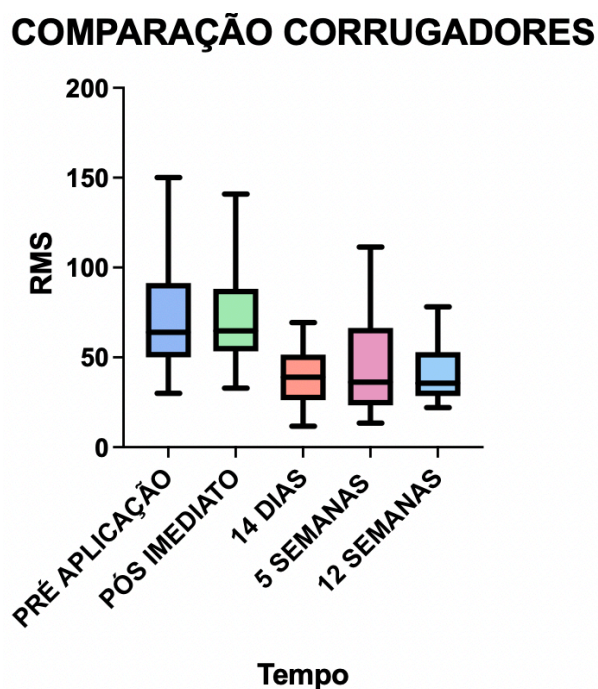
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7 - Gráfico da Estatística Descritiva no Músculo Frontal



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8 - Gráfico da Estatística Descritiva no Músculo Corrugador



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após realização da estatística descritiva, realizou-se os testes de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov test ($\alpha=0,05$) e baseado em seus resultados, optou-se pelo teste paramétrico, pois os dados seguiram normalidade, dessa maneira aplicou-se o teste Tukey de comparações múltiplas ($\alpha=0,05$) e os resultados para o músculo frontal e corrugadores podem ser observados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Teste Tukey de comparações múltiplas – Músculo Frontal

Tukey's multiple comparisons test Frontal	Apresentou diferença estatística?	P valor
Pré aplicação vs. Pós imediato	Não	0,4744
Pré aplicação vs. 2 semanas	Sim	0,0015
Pré aplicação vs. 5 semanas	Sim	0,0054
Pré aplicação vs. 12 semanas	Não	0,2827
Pós imediato vs. 2 semanas	Sim	<0.0001

Pós imediato vs. 5 semanas	Sim	<0.0001
Pós imediato vs. 12 semanas	Sim	0,0043
2 semanas vs. 5 semanas	Não	0,9954
2 semanas vs. 12 semanas	Não	0,2948
5 semanas vs. 12 semanas	Não	0,5164

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 – Teste Tukey de comparações múltiplas – Músculo Corrugador

Tukey's multiple comparisons test Corrugador	Apresentou diferença estatística?	P valor
Pré aplicação vs. Pós imediato	Não	0,9998
Pré aplicação vs. 2 semanas	Sim	0,0022
Pré aplicação vs. 5 semanas	Sim	0,0315
Pré aplicação vs. 12 semanas	Sim	0,0019
Pós imediato vs. 2 semanas	Sim	0,0040
Pós imediato vs. 5 semanas	Não	0,0505
Pós imediato vs. 12 semanas	Sim	0,0035
2 semanas vs. 5 semanas	Não	0,9071
2 semanas vs. 12 semanas	Não	>0.9999
5 semanas vs. 12 semanas	Não	0,8912

Fonte: Elaborada pelo autor.

Através dos resultados obtidos com o teste em relação ao músculo frontal, apresentados na Tabela 3, observa-se que houve diferença estatística significativa entre o momento inicial em relação a 2 semanas e 5 semanas. Entretanto quando observa-se a comparação entre inicial com 12 semanas não apresentou diferença estatística significativa entre as forças dos pacientes entre estes momentos. Mesmo que se avaliado a média isoladamente, apresentada na Tabela 1 ou Figura 6, no momento de avaliação após 12 semanas apresenta forças musculares menores do que no momento inicial.

Em relação a análise dos dados do músculo corrugador temos na Tabela 4, os resultados do teste Tukey de comparações múltiplas e observa-se que neste caso, o momento inicial apresenta diferença estatística significativa em relação a todos os momentos de acompanhamento, 2 semanas, 5 semanas e 12 semanas.

5.2 Influência dosagem Zn na força muscular

Para realizar a análise do zinco os pacientes foram divididos em 2 grupos distintos, G1 com zinco $> 65 \mu\text{g/dL}$ e $\leq 90 \mu\text{g/dL}$ e G2 com zinco >90 e $\leq 125 \mu\text{g/dL}$. E como os exames não eram avaliados para aceitação do paciente, para evitar esse viés no estudo, dessa maneira no momento da divisão dos pacientes o G1 apresentou um $n=12$ e G2 $n=6$. A análise descritiva dos dados relacionando dosagem de zinco para músculo frontal e corrugador estão demonstrados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Estatística Descritiva – Músculo Frontal versus dosagem Zinco

FRONTAL	Frontal A1 >65 <=90	Frontal A1 >90 <125	Frontal A2 >65 <=90	Frontal A2 >90 <125	Frontal A3 >65 <=90	Frontal A3 >90 <125	Frontal A4 >65 <=90	Frontal A4 >90 <125	Frontal A5 >65 <=90	Frontal A5 >90 <125
Número de valores	12	6	12	6	12	6	12	6	12	6
Mínimo	46,77	35,71	35,05	43,13	14,39	25,36	32,70	14,73	33,55	25,83
Máximo	115,1	167,2	179,5	175,0	88,54	66,40	57,66	114,2	88,44	102,5
Diferença	68,35	131,5	144,4	131,9	74,15	41,04	24,96	99,45	54,89	76,62
Média	74,97	92,88	94,08	101,0	39,12	53,26	44,28	57,59	64,39	58,04
Desvio Padrão	22,16	42,89	42,45	47,22	23,36	15,86	7,605	37,12	18,93	25,17

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6 – Estatística Descritiva – Músculo Corrugador versus dosagem Zinco

CORRUGADOR	Corrugador A1 >65 <=90	Corrugador A1 >90 <125	Corrugador A2 >65 <=90	Corrugador A2 >90 <125	Corrugador A3 >65 <=90	Corrugador A3 >90 <125	Corrugador A4 >65 <=90	Corrugador A4 >90 <125	Corrugador A5 >65 <=90	Corrugador A5 >90 <125
Número de valores	12	6	12	6	12	6	12	6	12	6
Mínimo	30,02	35,93	32,86	35,63	11,74	32,52	13,43	23,23	22,01	17,97
Máximo	112,6	150,1	89,64	158,4	69,41	48,99	111,4	84,05	78,13	80,49
Diferença	82,59	114,2	56,78	122,7	57,67	16,47	97,99	60,82	56,12	62,52
Média	65,82	79,09	62,39	95,55	37,66	40,68	46,22	47,68	39,17	42,18
Desvio Padrão	21,39	44,84	16,78	49,45	18,10	7,341	29,50	27,31	15,92	23,62

Fonte: Elaborada pelo autor.

Posteriormente a análise descritiva dos dados eletromiográficos dos pacientes em seus respectivos grupos, foram realizados os testes de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov test ($\alpha=0,05$), que resultaram em uma distribuição normal dos dados e prosseguiu-se então ao teste Tukey de comparações múltiplas para análise

dos dados. Nas tabelas 7 e 8, é possível observar os resultados para músculo frontal e corrugador, respectivamente.

Tabela 7 – Teste Tukey de comparações múltiplas – Músculo Corrugador versus dosagem Zinco

Tukey's multiple comparisons test Frontal	Apresentou diferença estatística?	P valor
Frontal A1 >65 ≤90 vs. Frontal A1 >90 <125	Não	0,9647
Frontal A2 >65 ≤90 vs. Frontal A2 >90 <125	Não	>0.9999
Frontal A3 >65 ≤90 vs. Frontal A3 >90 <125	Não	0,9930
Frontal A4 >65 ≤90 vs. Frontal A4 >90 <125	Não	0,9955
Frontal A5 >65 ≤90 vs. Frontal A5 >90 <125	Não	>0.9999

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 8 – Teste Tukey de comparações múltiplas – Músculo Corrugador versus dosagem Zinco

Tukey's multiple comparisons test Corrugador	Apresentou diferença estatística?	P valor
Corrugador A1 >65 ≤90 vs. Corrugador A1 >90 <125	Não	0,9895
Corrugador A2 >65 ≤90 vs. Corrugador A2 >90 <125	Não	0,2481
Corrugador A3 >65 ≤90 vs. Corrugador A3 >90 <125	Não	>0.9999
Corrugador A4 >65 ≤90 vs. Corrugador A4 >90 <125	Não	>0.9999
Corrugador A5 >65 ≤90 vs. Corrugador A5 >90 <125	Não	>0.9999

Fonte: Elaborada pelo autor.

As análises dos dados tanto para os grupos do músculo frontal ou corrugadores em relação a dosagem sérica de zinco, não apresentaram diferença estatística significativa para nenhum dos grupos estudados, nenhum dos momentos de avaliação eletromiográfica, e mesmo observando a análise descritiva, através das médias de G1 e G2 ao longo dos momentos de avaliação, observa-se uma média de força de contração maior nos pacientes com dosagens de zinco mais elevadas, e depois da aplicação tanto para A3 (2 semanas), A4 (5 semanas) e A5 (12 semanas), as médias dos grupos são bem semelhantes entre si.

5.3 Análise fotográfica através do ImageJ

Os dados obtidos das análises realizadas no software estão demonstrados abaixo na Tabela 9, e podemos observar que para ambos os grupos tivemos melhora na pele, diminuição da área de rugas e que mesmo com 12 semanas de acompanhamento, tivemos manutenção da diminuição da área de rugas dinâmicas.

É possível ver que existe um retorno de rugas de dinâmicas ao longo do acompanhamento, mas mesmo após o período de 12 semanas ainda existe efeito da TB, na manutenção da qualidade de pele.

Além dos percentis apresentados na Tabela 9, foram realizados teste de normalidade *Shapiro-Wilk* nos dados obtidos através das medições no *ImageJ* e estes não apresentaram distribuição normal para nenhum dos grupos, em nenhum dos momentos, assim o teste não paramétrico *Friedman-test*, que constatou então a inexistência de diferença estatística entre os grupos nos diferentes momentos do estudo.

Tabela 9 – Dados análise software ImageJ

	A1	A3	A4	A5
Média área de ríides dinâmicas - G1 (cm²)	24,92	3,56	5,57	12,22
Percentual de melhora - G1 (%)		85,70	77,67	50,96
Média área de ríides dinâmicas - G2 (cm²)	38,52	9,39	14,72	22,69
Percentual de melhora - G2 (%)		75,63	61,79	41,09

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

6.1 Toxina botulínica

A toxina botulínica, neurotoxina responsável por diminuir a força de contração muscular ou por impedir completamente essa função, passou a ser utilizada a partir de meados de 1946, quando o primeiro lote de TB foi produzido para utilização em humanos. No princípio os tratamentos se apresentavam principalmente como finalidade terapêutica, de espasmos muscular, algumas disfunções de atividades musculares e somente a partir da década de 90 que os tratamentos com finalidade estética passaram a serem realizados (Klein AW, 1996; Schantz EJ et al., 1997; Ting PT et al., 2004).

A TB é comercializada principalmente em frascos com quantidades variáveis de neurotoxina em forma de pó liofilizado; os frascos habitualmente se apresentam em 50, 100 ou 200 unidades (ui). O preparo/reconstituição da TB para aplicação nos pacientes pode acontecer em volumes distintos, mas sempre utilizando solução fisiológica – cloreto de sódio 0,9% estéril e apirogênica para injeção. De acordo com a finalidade e expectativa de cada tratamento a reconstituição pode variar de 1 mL a 10 mL para cada 100 ui de TB. A bula do fabricante da toxina eleita para este estudo apresenta uma tabela com diversas formas e volumes possíveis de diluições para os profissionais (Bula Botulim® Blau Farmacêutica S/A, Cotia – SP, Brasil). Importante ressaltar também que essa reconstituição obrigatoriamente precisa ser realizada adequadamente, com um fluxo lento de solução fisiológica para dentro do frasco, pois o turbilhonamento exagerado da solução com o pó liofilizado dentro do frasco diminuem significativamente a efetividade do tratamento (Dover et al., 2018; Kandhari et al., 2022). Para o presente trabalho a reconstituição utilizada foi a de 2,0 mL de solução fisiológica para cada 100 ui de TB, os frascos utilizados ao longo de todo o estudo foram de 100ui.

6.1.1 Durabilidade e dosagem de TB

Os efeitos da TB, devem durar cerca de 3 meses, segundo bula do fabricante e na literatura encontram-se dados de duração de até 4 a 5 meses dos efeitos (Bula Botulim® Blau Farmacêutica S/A; Flynn, 2010). Neste trabalho o acompanhamento foi realizado até a 12ª após aplicação da TB, sendo assim avaliando os efeitos esperados pelo fabricante dentro de 3 meses.

A dosagem da TB em cada músculo e região é variável para cada paciente, de acordo com a prática e experiência clínica do profissional capacitado; neste nosso trabalho, os resultados da eletromiografia de superfície não foram considerados para realização do tratamento, afim de mimetizar a vivência clínica do profissional que atende seus pacientes no consultório sem acesso à um eletromiógrafo para realizar estudo da atividade muscular de cada um deles. Sătilă et al., em 2020, demonstraram que quanto maior a força muscular ou maior a extensão do músculo mais rítides estarão presentes, dessa maneira, mais quantidade de TB será necessária para tratar essa situação, além disso Abramo et al., em 2018, elencam que a morfologia de cada músculo, a localização destes e dos músculos ao redor deles e as características de expressividade dos pacientes são fatores importantes a serem considerados para um tratamento efetivo e satisfatório. Por estes motivos tornou-se inviável a realização de uma única dose padrão de neurotoxina para ser injetada em todos os pacientes do estudo, o planejamento foi individualizado dentro das áreas de interesse da pesquisa. Ao fim do estudo a média de TB utilizada em cada paciente foi de 39,8 ui.

6.1.2 Recomendações após tratamento com TB

Em relação às recomendações após a aplicação de TB, de acordo com a literatura, temos poucos cuidados a serem tomados frente ao tratamento descritos a seguir; durante as primeiras 4 horas recomenda-se permanecer com a cabeça em posição ereta, evitar abaixa-lá e instruir o paciente a não se dritar durante este período. Além disso paciente deve evitar massagear e manipular as regiões tratadas,

evitando assim migração da TB para regiões inadequadas. O trabalho de Colasante et al., em 2013, demonstrou que no período de 5 a 10 minutos a maioria das moléculas de TB injetadas já estão internalizadas nas células nervosas da junção neuromuscular, no entanto em nosso trabalho, por precaução todos os pacientes receberam recomendações de manter os cuidados durante as primeiras 4 horas. Deve-se também evitar o calor e atividades físicas após aplicação para minimizar a possibilidade de rubor na região tratada (Small, 2014).

6.1.3 Efeitos adversos ou indesejados pós aplicação de TB

A TB apresenta, mesmo que em sua maioria transitórios e de menor importância alguns efeitos adversos ou indesejados provenientes de sua aplicação. No dia da aplicação é comum a região tratada apresentar um pouco de eritema, um leve inchaço e um pouco de sensibilidade inerente de qualquer procedimento relacionado ao uso de injeções, que se resolvem espontaneamente normalmente em até 24 horas. Alguns vasos ou capilar sanguíneo pode ser rompido durante a aplicação de TB e com isso hematomas podem surgir, sendo normalmente solucionados sem necessidade de intervenção em até 2 semanas. Durante o período que o paciente apresenta o hematoma, este deve evitar exposição solar, prevenindo-se dessa forma de algum manchamento de pele na região. Ainda alguns pacientes podem apresentar dores de cabeça após tratamento, habitualmente sendo solucionada sem necessidade de nenhuma intervenção nos primeiros dias após injeção de TB; dependendo da severidade da dor, alguma droga pode ser prescrita para auxiliar no conforto do paciente (Small, 2014). Sobre alguns eventos menos comuns, temos a ptose palpebral temporária, que normalmente incomoda bastante o paciente por atrapalhar a visão e também a ptose da sobrancelha, que normalmente gera um incômodo pelo aspecto mais estético gerado por este efeito indesejado.

6.1.4 Pesquisa e avanços sobre TB

Do surgimento da TB para finalidades terapêuticas para a atualidade muitos processos se aprimoraram, os produtos comerciais melhoraram e estes avanços tornaram estes produtos cada vez mais seguros e com resultados com maior previsibilidade, diminuindo o índice de complicações e eventos adversos. Através de breve consulta do termo “botulinum toxin” na plataforma PubMed, entre o ano de 2000 até novembro de 2023, 20.725 trabalhos relacionados ao tema foram publicados, e quando buscamos “botulinum toxin type A”, no mesmo período temos 11.521 trabalhos publicados, segundo artigo de Dayan, de 2013, a TB é um dos agentes farmacêuticos mais estudados, com mais de 30 anos de experiência clínica e que no ano de 2012, mais de 10 milhões de procedimentos com TB foram realizados em todo o mundo. E com esta vasta utilização de TB a cada ano, a necessidade do entendimento da relação sistêmica do organismo dos pacientes com a efetividade, durabilidade e segurança no seu uso cresce constantemente.

6.2 Eletromiografia de Superfície (sEMG)

A sEMG é um método muito relevante, mensurável, na análise da atividade muscular, no entendimento da força de contração muscular da região estudada, através do entendimento da atividade elétrica que gera a contração da musculatura, alguns fatores podem ser avaliados e mais bem compreendidos. Neste trabalho a sEMG veio a contribuir com a análise quantitativa da atividade muscular antes e após a aplicação de TB nos pacientes, para assim evidenciar mais precisamente a efetividade e durabilidade da TB ao longo do acompanhamento do tratamento realizado, pois principalmente em relação a TB utilizada com finalidade estética, análises qualitativas de avaliações por fotografias e relatos, ou questionários aplicados aos pacientes são utilizadas e descritas vastamente na literatura, como no estudo de Koshy et al., de 2012, que utiliza respostas de pacientes a questionários para análise dos resultados da pesquisa.

Segundo Disselhorst-Klug et al., em 2009, os movimentos ou atividade que apresentam alta reprodutibilidade podem passar pela avaliação eletromiográfica, pois dessa forma é possível avaliar sempre a mesma característica da atividade muscular, tendo dados confiáveis. E por isso foi possível estudar a atividade neuromuscular dos músculos frontais e corrugadores, em que as expressões faciais foram diversas vezes repetidas pelos indivíduos quando solicitado, para assim armazenar os dados da contração muscular.

O sinal obtido pelo eletromiógrafo no momento de repouso da musculatura, deve ser baixo, considerado um silêncio da atividade eletromiográfica, demonstrando assim uma atividade regular e permitindo o prosseguimento da avaliação da força muscular durante contração. Pacientes que apresentassem alguma disfunção da atividade motora em repouso, não foram incluídos ou foram excluídos do estudo. As análises realizadas no estudo foram feitas através da utilização do RMS obtido na aferição da contração isométrica dos músculos corrugadores do supercílio e frontal. Durante cada momento de acompanhamento foram realizadas 3 leituras de cada musculatura em contração, para que assim fosse possível observar se as atividades apresentavam semelhança entre si, demonstrando uma reprodutibilidade da atividade motora e impedindo desta maneira que o paciente não realizasse de maneira adequada a contração o que poderia ocorrer em caso de aferição isolada.

Foi possível verificar através das análises dos resultados, tabelas 3 e 4, que após 2 semanas do procedimento, os pacientes apresentavam diferença estatisticamente significativa na força muscular, demonstrando a efetividade do tratamento, constatando a diminuição da força de contração nos indivíduos do estudo. Resultado esperado, pois neste momento segundo a própria bula do produto é o momento descrito como pico de efeito da TB (Bula Botulim® Blau Farmacêutica S/A).

É possível observar através das Figuras 7 e 8, um ligeiro aumento da força de contração muscular nas aferições realizadas imediatamente após a injeção de TB, provavelmente isso se explica por uma contração protetora dessa musculatura, segundo Souza et al., em 2020, explicam que este tipo de reação é a primeira resposta do organismo à uma lesão ou risco de lesão muscular, realizando uma contração do músculo antagonista ao lesionado para proteção deste, no caso corrugadores do supercílio e frontal, atuam como antagonistas, pois corrugador traciona pele da glabella e fronte para medial e para baixo, enquanto o frontal eleva toda a pele da

região de fronte e glabella.

Com isso, fica exemplificado a contribuição e relevância das análises eletromiográficas, no entendimento da atividade muscular dos pacientes, na capacidade de auxiliar no desenvolvimento e realização de tratamentos e terapias e principalmente nos permitindo através da análise da atividade muscular de cada um dos indivíduos verificar quando e se fatores sistêmicos possuem relação ou influência sobre tratamentos, como o uso estético da TB.

6.3 Zinco

O Zn é o segundo elemento mais abundante no organismo, ficando atrás apenas do ferro, e quando se trata de concentração intracelular ele é o mais abundante. A predileção de localização deste elemento no organismo são o tecido ósseo e a musculatura esquelética, e assim então pode-se imaginar alguma influência na função muscular relacionada a este elemento.

Alguns fatores importantes sobre o zinco, valem serem mostrados, a recomendação de ingestão diária desse micronutriente é de 8mg para mulheres e 11 mg para homens, segundo Academia Nacional de Ciências de Washington, em 2001. E uma dieta com boas fontes de proteína é essencial para essa meta ser alcançada, dietas baseadas em consumo de carnes vermelhas, miúdos, mariscos e ostras, ultrapassam com maior facilidade a necessidade de ingestão diária, enquanto um indivíduo com dieta baseada em carnes brancas e ovos terá maior dificuldade de atingir a meta diária, então precisamos estar atentos a dieta para uma boa manutenção dos níveis de zinco no organismo.

Segundo estudo de Richardson e Drake, de 1979, ratos que realizaram suplementação deste micronutriente apresentaram maior força ou resistência muscular, e os resultados de Krotkiewski et al., em 1982, mostraram aumento de força muscular após suplementação e que após 14 dias não existe aumento da força mas aumento da resistência muscular. Trabalho publicado em 2014, por Waters et al., demonstrou a diferença de uma ingestão adequada e outra inadequada de Zn em idosos, relacionando o ritmo de caminhada mais acelerado nos que apresentavam

maior ingestão de Zn.

De certa maneira, temos correlação do Zn com melhores desempenhos de atividade muscular. Entretanto na literatura é possível encontrar alguns trabalhos publicados, como de Koshy et al., de 2012, que relaciona a suplementação de Zn e Fitato com melhora da efetividade e durabilidade dos efeitos da TB, vale ressaltar que as análises foram realizadas pela percepção e relato de cada um dos pacientes envolvidos na pesquisa. Além do método de avaliação subjetivo, os pacientes ao saberem que estavam suplementando zinco, podem ter respondido as questões com certo viés em suas percepções de melhora do tratamento.

A suplementação neste estudo ocorreu com Zn e fitase, estudo de Mafra e Cozzolino de 2004, referencia informação de que o fitato associado ao Zn, pode influenciar negativamente a absorção de Zn pelo organismo, pois o fitato possui alta afinidade para ligar-se a cátions bivalentes como o Zn e assim dificulta sua absorção.

Em um trabalho publicado por Simpson et al., em 1993, sugere que a quelação do Zn no organismo pode prejudicar os efeitos do tratamento, mas relaciona esse prejuízo ao início de ação da TB, pois a quelação do Zn impede a ligação dele as moléculas da TB e isso impede a catalização da reação, e diminui a velocidade do processo todo, estudo tinha como objetivo o tratamento de envenenamento pela neurotoxina, mas traz melhor esclarecimento da função das moléculas de Zn no processo e ação da TB.

Além das informações acima, uma revisão da literatura publicada em 2023 por Mallat et al., apresenta diversos esclarecimentos e informações da relação Zn/TB. Em sua discussão está presente trabalho de Simpson (2013) que novamente fundamenta a importância do Zn dentro do processo de ação da cadeia leve da TB, para promover a função da mesma após sua internalização no citoplasma celular.

Através da revisão ficou demonstrado que não há nenhum trabalho ou consenso que forneça um protocolo de suplementação de Zn a ser seguido em nenhum dos trabalhos revisados, nem sobre duração ou dosagem da mesma. Além de não existir evidências de sinais clínicos ou subclínicos que representem a deficiência de Zn nos indivíduos, como também não há evidências de ingestão de fitato alta o suficiente para prejudicar a absorção das moléculas de Zn.

Por fim, Mallat et al., em 2023, concluem que a falta de uniformidade entre os estudos, divergentes em dosagens de suplementação, dosagens de TB, número de

participantes dos estudos e outros fatores, dificulta o esclarecimento e fechamento de consenso absoluto sobre o assunto, mas fica aparente uma possível correlação Zn/TB, mas não sobre a necessidade e efetividade da suplementação para o tratamento.

No presente estudo, através da análise estatística dos dados de G1 e G2 não houve diferença estatística significativa em nenhum dos momentos do estudo para influência da diferença de dosagem de Zn no sangue, demonstrando inexistência de relação entre os efeitos da TB e Zn.

6.4 Avaliação fotográfica pelo ImageJ

ImageJ é um software de domínio público, com mais de duas décadas em atividade com recursos importantes para análises fotográficas, um desing do software é simples e intuitivo, mesmo com recursos interessantes, fica simples e rápido de realizar as análises nele, permitindo uso e estudo de imagens em diversas áreas da pesquisa e mesmo da indústria.

Através do ImageJ, no presente estudo, foi avaliada a área das ríides dinâmicas durante contração isométrica do músculo frontal dos pacientes, em todos os momentos de acompanhamento, D1, D2, D3, D4, ou seja, desde antes da aplicação da TB até 12 semanas de acompanhamento, para assim verificar a efetividade do tratamento, com 2 semanas da aplicação e a durabilidade visualizada na manutenção da diminuição da área de ríides no acompanhamento de 5 e 12 semanas.

E os dados obtidos corroboraram com resultados da efetividade e durabilidade do tratamento, uma vez que se constatou melhora de cerca de 80% das ríides dinâmicas com 2 semanas de acompanhamento, 69,7% de melhora das ríides dinâmicas com 5 semanas de acompanhamento e 46% de melhora com 12 semanas de acompanhamentos, todos os percentis são da comparação de melhora em relação a área de rugas mensurada antes do tratamento com TB.

Mesmo que haja uma diferença entre os percentis de melhora das ríides entre os grupos G1 e G2, através da análise estatística, com o Friedman-test, pós constatação da inexistência de distribuição normal dos dados coletados nas imagens

de acompanhamento dos pacientes, temos que em nenhum dos momentos houve diferença estatística significativa na melhora da área de rítides entre os grupos de dosagens de Zn distintas, o que mais um vez corrobora a falta de evidência da correlação de efetividade e durabilidade do Zn em relação aos efeitos da TB.

Deste modo, através de todos os resultados demonstrados e discutidos ao longo deste trabalho, verifica-se uma falta de evidências que relacionem a dosagem de zinco com alterações de força muscular, diminuição da efetividade e durabilidade da TB.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através da análise estatística dos dados de eletromiografia demonstraram que as diferentes dosagens de zinco não influenciaram na efetividade ou durabilidade do tratamento com TB.

Além disso, através das análises das fotografias no *software ImageJ*, foi possível constatar a efetividade e durabilidade dos efeitos do tratamento com TB para finalidade estética em todos os indivíduos participantes, novamente sem influência do Zn sérico, pois a diminuição da área de ríides dinâmicas foi satisfatória em todos os indivíduos.

REFERÊNCIAS

Alkan A, Günay M. Identification of EMG signals using discriminant analysis and SVM classifier. *Expert Syst Appl*. 2012 Jan;39(1):44-47. doi: 10.1016/j.eswa.2011.06.043. ISSN 0957-4174.

Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P, et al. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature*. 1993 Sep 9;365(6442):160-3. doi: 10.1038/365160a0. PMID: 8103915.

Chowdhury RH, Reaz MB, Ali MA, Bakar AA, Chellappan K, Chang TG. Surface electromyography signal processing and classification techniques. *Sensors (Basel)*. 2013 Sep 17;13(9):12431-66. doi: 10.3390/s130912431. PMID: 24048337; PMCID: PMC3821366.

Dimberg U. Facial electromyography and emotional reactions. *Psychophysiology*. 1990 Sep;27(5):481-94. doi: 10.1111/j.1469-8986.1990.tb01962.x. PMID: 2274612.

Dressler D, Saberi FA, Barbosa ER. Botulinum toxin: mechanisms of action. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005 Mar;63(1):180-5. doi: 10.1590/s0004-282x2005000100035. Epub 2005 Apr 13. PMID: 15830090.

National Academy of Sciences. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Food and Nutrition Board. 2001.

Fu FN, Lomneth RB, Cai S, Singh BR. Role of zinc in the structure and toxic activity of botulinum neurotoxin. *Biochemistry*. 1998 Apr 14;37(15):5267-78. doi: 10.1021/bi9723966. PMID: 9548758.

Gupta S, Brazier AKM, Lowe NM. Zinc deficiency in low- and middle-income countries: prevalence and approaches for mitigation. *J Hum Nutr Diet*. 2020 Oct;33(5):624-643. doi: 10.1111/jhn.12791. Epub 2020 Jul 6. PMID: 32627912.

King JC. Zinc: an essential but elusive nutrient. *Am J Clin Nutr*. 2011 Aug;94(2):679S-84S. doi: 10.3945/ajcn.110.005744. Epub 2011 Jun 29. PMID: 21715515; PMCID: PMC3142737.

Koshy JC, Sharabi SE, Feldman EM, Hollier LH Jr, Patrinely JR, Soparkar CN. Effect of dietary zinc and phytase supplementation on botulinum toxin treatments. *J Drugs Dermatol*. 2012 Apr;11(4):507-12. PMID: 22453589.

Krotkiewski M, Gudmundsson M, Backström P, Mandroukas K. Zinc and muscle strength and endurance. *Acta Physiol Scand*. 1982 Nov;116(3):309-11. doi: 10.1111/j.1748-1716.1982.tb07146.x. PMID: 7168359.

Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, Stevens RC. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol.* 1998 Oct;5(10):898-902. doi: 10.1038/2338. PMID: 9783750

Mafra D, Cozzolino SMF. The importance of zinc in human nutrition. *Rer Nutr.* 2004 Mar;17(1). doi: 10.1590/S1415-52732004000100009

Mallat F, Kaikati J, Kechichian E. Botulinum Toxins and Zinc: From Theory to Practice-A Systematic Review. *Clin Neuropharmacol.* 2023 Jun 20; 46(4):164-167. doi: 10.1097/WNF.0000000000000557. Epub ahead of print. PMID: 37335837.

Montecucco C, Schiavo G. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q Rev Biophys.* 1995 Nov;28(4):423-72. doi: 10.1017/s0033583500003292. PMID: 8771234.

Pamphlett R. Early terminal and nodal sprouting of motor axons after botulinum toxin. *J Neurol Sci.* 1989 Sep;92(2-3):181-92. doi: 10.1016/0022-510x(89)90135-4. PMID: 2809617.

Papagiannis GI, Triantafyllou AI, Roumpelakis IM, Zampeli F, Eleni PG, Koulouvaris P, et al. Methodology of surface electromyography in gait analysis: review of the literature. *J Med Eng Technol.* 2019 Jan;43(1):59-65. doi: 10.1080/03091902.2019.1609610. Epub 2019 May 10. PMID: 31074312.

Prasad AS. Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health. *Front Nutr.* 2014 Sep 1;1:14. doi: 10.3389/fnut.2014.00014. PMID: 25988117; PMCID: PMC4429650.

Richardson JH, Drake PD. The effects of zinc on fatigue of striated muscle. *J Sports Med Phys Fitness.* 1979 Jun;19(2):133-4. PMID: 502525.

Rizo J, Südhof TC. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Biol.* 1998 Oct;5(10):839-42. doi: 10.1038/2280. PMID: 9783736.

Sandström B. Bioavailability of zinc. *Eur J Clin Nutr.* 1997 Jan;51 Suppl 1:S17-9. PMID: 9023474.

Simpson LL, Coffield JA, Bakry N. Chelation of zinc antagonizes the neuromuscular blocking properties of the seven serotypes of botulinum neurotoxin as well as tetanus toxin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Nov;267(2):720-7. PMID: 8246147.

Sposito MMM. Toxina Botulínica do Tipo A: mecanismo de ação. *Acta Fisiátrica.* 2009 Mar;16(1):25-37. doi:10.11606/issn.2317-0190.v16i1a103037.

Tassinari LG, Cacioppo JT. Unobservable Facial Actions and Emotion. *PSYCHOL SCI.* 1992 Jan;3(1):28-33.

van Dronkelaar C, van Velzen A, Abdelrazek M, van der Steen A, Weijs PJM, Tieland M. Minerals and Sarcopenia; The Role of Calcium, Iron, Magnesium, Phosphorus, Potassium, Selenium, Sodium, and Zinc on Muscle Mass, Muscle Strength, and Physical Performance in Older Adults: A Systematic Review. *J Am Med Dir Assoc*. 2018 Jan;19(1):6-11.e3. doi: 10.1016/j.jamda.2017.05.026. Epub 2017 Jul 12. PMID: 28711425.

Wang W, De Stefano A, Allen R. A simulation model of the surface EMG signal for analysis of muscle activity during the gait cycle. *Comput Biol Med*. 2006 Jun;36(6):601-18. doi: 10.1016/j.combiomed.2005.04.002. Epub 2005 Jul 18. PMID: 16029872.

Waters DL, Wayne SJ, Andrieu S, Cesari M, Villareal DT, Garry P et al. Sexually dimorphic patterns of nutritional intake and eating behaviors in community-dwelling older adults with normal and slow gait speed. *J Nutr Health Aging*. 2014 Mar;18(3):228-33. doi: 10.1007/s12603-014-0004-8. PMID: 24626748.

ANEXO A – Certificado de Comitê de Ética

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA - CAMPUS DE
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -
UNESP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação da força muscular antes e após a aplicação de toxina botulínica.

Pesquisador: Marcelle Simões Coelho

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 58828122.0.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.704.959

Apresentação do Projeto:

Avaliação da força muscular antes e após a aplicação de toxina botulínica.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho será mensurar a força muscular do terço superior da face, antes e após a aplicação de toxina botulínica, com medição de controle antes da aplicação, imediatamente após a aplicação, 14 dias, 5-6 semanas, 12-15 semanas após a aplicação. [Texto extraído de "Informações Básicas Sobre o Projeto"]

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os proponentes, os riscos associados à participação do presente protocolo de pesquisa são considerados médios, devido a aplicação da toxina botulínica, que pode gerar alguns efeitos adversos ou secundários após a aplicação, como pequenas marcas transitórias no local da aplicação, hematomas, inflamação, ou reação não desejadas descritas na bula, esses efeitos são comumente transitórios e totalmente reversíveis. Informamos ainda, que há benefícios direto ao Sr.(a) por participar do estudo, visto que a toxina botulínica é responsável por paralisar e/ou diminuir o tônus muscular e dessa maneira faz com que as rítmicas dinâmicas, que acontecem durante os movimentos faciais, sejam amenizadas ou desapareçam além de diminuir as marcas das rítmicas estáticas, aquelas presentes mesmo com os músculos mímicos da face em repouso, além do benefício associado que será de contribuir com o conhecimento científico da sociedade

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777 - Ramal 9028

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9000

E-mail: ceph.ict@unesp.br

**INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA - CAMPUS DE
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -
UNESP**



Continuação do Parecer: 5.704.959

[Texto extraído do “TCLE”].

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto foi revisado à luz dos questionamentos apresentado no parecer anterior. Sua forma atual não contém nenhuma pendência ou inadequação no ponto de vista ético da pesquisa envolvendo seres humanos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide conclusões ou pendências e lista de inadequações

Recomendações:

Vide conclusões ou pendências e lista de inadequações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora, atendeu as pendências apontadas no parecer anterior, deixando dessa forma o protocolo adequado para sua execução.

Considerações Finais a critério do CEP:

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://www2.ict.unesp.br/> – Sobre o ICT – Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	tcle_reformulado.pdf	08/09/2022 14:16:51	CARLOS ALBERTO GUEDES	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_PROJETO_1946701.pdf	06/09/2022 12:23:51		Aceito
Outros	formulario_respondido.pdf	06/09/2022 12:22:14	Marcelle Simões Coelho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMarcelle_reformulado.pdf	06/09/2022 12:20:38	Marcelle Simões Coelho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TermodeConsentimentoLivreEsclarecido v2.pdf	06/09/2022 12:19:14	Marcelle Simões Coelho	Aceito

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777 - Ramal 9028
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9000 **E-mail:** ceph.ict@unesp.br

**INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA - CAMPUS DE
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -
UNESP**



Continuação do Parecer: 5.704.959

Ausência	TermodeConsentimentoLivreEsclarecido v2.pdf	06/09/2022 12:19:14	Marcelle Simões Coelho	Aceito
Outros	formulariorespondido_docx.docx	06/07/2022 18:14:21	Marcelle Simões Coelho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	assentimento.pdf	13/05/2022 09:53:31	Marcelle Simões Coelho	Aceito
Folha de Rosto	MarcelleSimoeseCoelho.pdf	12/05/2022 15:52:43	Marcelle Simões Coelho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 17 de Outubro de 2022

**Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador(a))**

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777 - Ramal 9028
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9000 **E-mail:** ceph.ict@unesp.br