

Biomed Biopharm Res
18 (2) 156 - S585 (2021)

print
ISSN 2182-2360

online
ISSN 2182-2379

BIOMEDICAL AND BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH

JORNAL DE INVESTIGAÇÃO
BIOMÉDICA E BIOFARMACÊUTICA

Editor | Luís Monteiro Rodrigues

Vol. 18, No. 2

Sponsored by / Com o patrocínio da



CPLP
Comunidade dos Países
de Língua Portuguesa

Biomedical and Biopharmaceutical Research is published twice yearly by ALIES, the Lusófona Association for the Development of Research and Education in Health Science. *BBR* is published in both English and Portuguese, and is dedicated to sharing scientific knowledge within health sciences to educate, to inspire, and to support development in Lusophone societies and beyond

Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica é publicada duas vezes por ano pela ALIES, a Associação Lusófona para o Desenvolvimento da Ensino e Investigação na Ciência da Saúde. *JIBB* é publicada em inglês e português, e dedica-se à partilha de conhecimentos científicos no âmbito das ciências da saúde para educar, inspirar, e apoiar o desenvolvimento nas sociedades lusófonas e fora das fronteiras

Editor in chief / Editor Coordenador

Luís Monteiro Rodrigues

Emeritus Editor in chief / Editor Coordenador Emeriti

Lesseps Lourenço dos Reis (2004-2011), Faculdade de Medicina Universidade de Lisboa, Portugal

Executive Editors / Editores Executivos

Ana Fernandes - CBIOS, Universidade Lusofona, Portugal
Anabela Mota Pinto - Instituto Patologia Geral Fac Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal
André Baby - Departamento de Farmácia da FCF, Universidade de São Paulo, Brasil
Antero Abrunhosa - Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde U Coimbra, Portugal
Candida Aparecida Kassuia - Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil
Carlos Nunes Filipe - NOVA Medical School, Portugal
Catarina F Rosado - CBIOS, Universidade Lusofona, Portugal
Domingos Ferreira - Faculdade de Farmacia, Universidade do Porto, Portugal
Edson Maistro - Universidade Estadual Paulista - UNESP Campus de Marília, SP, Brasil
Eduardo Colombari - FMDUSP-RP, Brasil
Isabel Ferreira - Instituto Politécnico de Bragança, Centro de Investigação da Montanha, Portugal
Michel Otuki - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil
Patricia M. Rijo - CBIOS, Universidade Lusofona, Portugal
Patricia Maia Campos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil
Patricia Rinken Rocco - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
Sergio Faloni Andrade - CBIOS, Universidade Lusofona, Portugal

Consulting Editors / Editores Consultores

Afonso Cavaco - Fac. Farmácia, U Lisboa, PT
Alda Pereira - IPMPH, Fac. Med -U Lisboa, PT
Alain Pierre Gadeaux - INSERM, Bordeaux, France
Amílcar Roberto - CBIOS, U Lusofona, PT
Anabela Neves - IML, NOVAMS, Portugal
Ana Paula Ribeiro - Fac. Med UNISA, LaBiREM, LAME, BR
Ana Valente - U Atlantica, PT
Antonio Raposo - CBIOS U Lusofona, PT
Carla Correia de Sá - IPP, PT
Carla Pires, INPI, PT
Carolina Panis - UNIOESTE, BR
Catarina Pinto Reis, FF, U Lisboa, P
Célia Faustino - FF, U Lisboa, PT
Cid Aimbiré - SPFGnosia, BR
Cintia Maia Braga - UNIVALI, BR
Cristiana Nunes - ISA, U Lisboa, PT
Damas Macaia - IHMT, U Nova de Lisboa, PT
Daniela Cabrini - UF Paraná, BR
Dele Raheem - Arct Centre, U Lapland, FI
Eliana Cortez, MA, US
Eliane Ayres - UEMG, BR
Elisabeth Neumann - UFMG, BR
Fabiana Vieira Lima - UFES, BR
Fernando Llimos - FF, U Porto, PT
Gabriela Pereira, IMED U Lisboa, PT
Guilherme Tavares - UF Juiz de Fora, BR
Helena Margarida Ribeiro - FF, U Lisboa, PT
Hernâni Pombas Caniço - Fac Med, U Coimbra, PT
Hugo Silva - IT, U Lisboa, PT
Hugo TD Ferreira - IBEB FC U Lisboa, PT
Isabel Almeida - FF, U Porto, PT
Isabel Vitória Figueiredo - FF, U Coimbra, PT
Joao Gregorio - CBIOS, U Lusofona, PT
José Delgado Alves - GEPOG, NOVA Med Sch, PT
José Roseiro - LNEG, PT
Joyce Costa - UFVJM, BR
Laurent Duca - U Reims Champagne-Ardenne, FR
Liliana Castanheira Mendes - UCSP Estoril, PT
Luis Lapão - INMT - NMS, PT
Madalena Sofia Oliveira - Inst U Ciências Saúde, CESPU, PT
Maria Helena Verdan - U Paraná, BR
Maria Valéria Robles Velasco - FCF U São Paulo, BR
Maria Vitorina Aguilár - UAH, ES
Mafalda Ferreira - U Coimbra, Fac Med PT
Márcia Melhado - USP - São Paulo, BR
Margarida Alves - CBIOS U Lusofona, PT
Margarida Caramona - FF, U Coimbra, PT
Margarida Castel-Branco - FF, U Coimbra, PT
Margarida Figueiredo Dias - HUC, Coimbra, PT
Maria Claudia Issa - UFF, Niterói-Rio de Janeiro, BR
Marina Pinheiro - U Porto, PT
Marisa Nicolai - CBIOS U Lusofona, PT
Mateus Freire Leite - U Federal de Alfenas, BR
Mirela Seixas - ADCO, SP, BR
Nuno Oliveira - FF, U Lisboa, PT
Odoaldo Rochefort - IFRS, BR
Patricia Fradinho - ISA U Lisboa, PT
Rejane Tavares - CBIOS, U Lusofona, PT
Regina Meneses - CBIOS, U Lusofona, PT
Ricardo Afonso - SPCAL e NOVA Medical Sch, PT
Sara Cordeiro - QU, Belfast, IR
Sara Santos Bernardes - UFMG, BR
Susana Nunes Silva - U NOVA Lisboa, PT
Susana Caldas Fonseca - FC U Porto, PT
Suzana Carvalho - UE Paulista Júlio de Mesquita UNESP, BR
Tania Almeida - CBIOS, U Lusofona, PT
Tiago Atalaia - ESSCVP, PT
Vania Leite e Silva - UNIFESP, BR
Valquíria Villas Boas - U Caxias do Sul, BR
Walter Antônio Roman Junior -UNOCHAPECO, BR

Property / Propriedade

ALIES
Lusophone Association for the Development of
Teaching and Research in Health Sciences
Associação Lusófona para o Desenvolvimento da
Investigação e Ensino em Ciências da Saúde

**Registered Office and Correspondence /
Sede Social e Correspondencia**

ALIES
Av Campo Grande, 376
1749-024 Lisboa, Portugal
Tel: +351217515550 Fax: +351217515598

**Electronic correspondence /
Correspondencia electrónica**
directorales@alies.pt
bbr_office@alies.pt

Electronic Edition / Edição electronica
<https://www.alies.pt/en/archive.html>
<https://www.alies.pt/pt/archivo.html>

Distribution / Distribuição
ALIES

Dep. Legal: 33195511

ISSN Print: 2182-2360
ISSN Online: 2182-2379

**Communication Manager /
Gerente de Comunicação**
Patricia M. Rijo

Production Manager / Gerente de Produção
Amanda B. Rodrigues

Website Manager / Gerente de Website
Clemente Rocha

Scientific Partners / Parceiros Científicos





Luís Monteiro Rodrigues

Editor

Editorial

Vol 18: Number 2

(Vol 18: Número 2)

10.19277/bbr.18.2.e

BBR 18.2

This issue in brief

The Biomedical Sciences section begins with a Clinical Case dedicated to Hereditary Hemochromatosis (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 3-8. doi: 10.19277/bbr.18.2.263).

The section continues with a case study assessing the nutritional risk in elderly adults of a senior residence. The study is centered in malnutrition, a serious issue in particular environments and a major concern for families and authorities. This study confirmed that malnutrition and risk of malnutrition are real, highlighting the need for nutritional intervention (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 9-20. doi: 10.19277/bbr.18.2.270).

The next manuscript reviews the links between the intestinal microbiota and other physiological functions through the gut-brain axis. The current knowledge of kefir, a well known probiotic, is here explored as an immunomodulator and a health-promoting food (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 21-35. doi: 10.19277/bbr.18.2.261).

Another research paper continues this section exploring the use of well known human wearable technologies such as photoplethysmography (PPG) in veterinary presurgical setting to assess cardiac and respiratory activity in dogs. This exploratory study shows a non-explored but promising application setting for these systems (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 36-44. doi: 10.19277/bbr.18.2.264).

Continuing in these domains of microcirculation, the following paper presents a new functional imaging system an Optoacoustic Tomography (OAT) recently available. This non-invasive system bridges optical and sonographic techniques to solve spatial resolution in deep-tissue imaging, showing an important applied and preclinical potential (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 45-57. doi: 10.19277/bbr.18.2.269).

The section concludes with a review on sexual violence against children, revealing that this type of sexual violence is currently emerging as an endemic threat worldwide, presenting multiple challenges, social as health, to societies. A disturbing as important narrative found in *Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 58-72 (doi: 10.19277/bbr.18.2.266).

Este numero em breves notas

A secção de Ciências Biomédicas começa com um Caso Clínico dedicado à Hemocromatose Hereditária (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 3-8. doi: 10.19277/bbr.18.2.263).

A secção continua com um estudo de caso que avalia o risco nutricional em adultos de uma residência de idosos centrada na malnutrição, uma questão grave em ambientes particulares e uma grande preocupação para as famílias e autoridades. Este estudo confirmou que a desnutrição e o risco de desnutrição são reais, salientando a necessidade de assegurar uma intervenção nutricional (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 9-20. doi: 10.19277/bbr.18.2.270).

O manuscrito seguinte é uma revisão acerca das ligações entre a microbiota intestinal e outras funções fisiológicas através do eixo intestinal-cérebro. O conhecimento actual sobre o kefir, um probiótico bem conhecido, é aqui explorado como um imunomodulador e um alimento promotor da saúde (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 21-35. doi: 10.19277/bbr.18.2.261).

Outro trabalho de investigação continua esta secção, explorando a utilização de tecnologias “usáveis” no quotidiano humano, como acontece com a fotoplethysmografia (PPG) em contexto pré-cirúrgico veterinário para avaliar a actividade cardíaca e respiratória em cães. Este estudo exploratório mostra um cenário de aplicação antes não contemplado mas, promissor para estes sistemas (*Biomed Biopharm Res.*, 18(2), 36-44. doi: 10.19277/bbr.18.2.264).

Continuando nos domínios de microcirculação, o artigo seguinte apresenta um novo sistema de imagem funcional e uma Tomografia Optoacústica (OAT) recentemente disponível. Este sistema não invasivo envolve técnicas ópticas e ultrassonográficas para melhorar a resolução espacial em imagens de tecidos profundos mostrando um importante potencial aplicado e pré-clínico (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 45-57. doi: 10.19277/bbr.18.2.269).

A secção é concluída com uma revisão sobre violência sexual contra crianças, revelando que este tipo de violência sexual está actualmente a emergir como uma ameaça endémica um pouco por todo o lado, envolvendo múltiplos desafios, sociais e de saúde, para as sociedades. Uma narrativa perturbadora e importante presente em *Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 58-72 (doi: 10.19277/bbr.18.2.266).

The Biopharmaceutical Sciences section begins with a research paper on rapid UV-Vis spectroscopy methods for quantification of ranitidine tablets, a widely used medication for the treatment and prophylaxis of peptic ulcer and gastroesophageal reflux disease. This educational manuscript shows how to design, approach and solve common analytical challenges from a quality control perspective (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 73-82. doi: 10.19277/bbr.18.2.271).

Continuing this section, the following paper is focused on transferosomes as nanovesicular systems to enhance the skin permeation of bioactive compounds. The paper approaches and compares the impact on the physicochemical properties and the *in vitro* cytotoxicity profile of different transferosomal formulations (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 83-96. doi: 10.19277/bbr.18.2.267).

The next two papers respects cosmetic science research, a regular theme in this section within our journal. This first study focus cosmetic films and evaluates the moisturizing properties of films with ascorbic acid and hyaluronic acid in their composition (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 97-107. doi: 10.19277/bbr.18.2.262).

The next paper illustrates the importance of innovation to address old problems with satisfactory solutions as it happens with oily skin. Here the authors developed a cosmetic formulation containing vitamin B3 for the treatment of oily skin and test its efficacy and acceptance by using biophysical and sensorial analysis (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 108-118. doi: 10.19277/bbr.18.2.273).

Closing this section an original manuscript researching the aggregation of Islet Amyloid PolyPeptide (IAPP), a contributor to pancreatic β -cell dysfunction and type 2 diabetes. The authors are particularly interested in studying the protective potential of *Cecropia pachystachya* against IAPP-induced cytotoxicity which seems to be a promising research path (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 119-135. doi: 10.19277/bbr.18.2.272).

Finally, this issue also includes two Supplements only available in this online version – the LVI Annual Congress of the Brazilian Society of Physiology (SBF) ePoster Abstracts, held online in October 2021 (doi: 10.19277/bbr.18.2.265) and the Abstract Book of the 33rd Brazilian Congress of Cosmetology, 2021 (doi: 10.19277/bbr.18.2.268) – two important science meetings supported by our journal.

L Monteiro Rodrigues
Editor in Chief

A secção de Ciências Biofarmacêuticas é iniciada com um trabalho de investigação sobre métodos de espectroscopia rápida UV-Vis para quantificação de comprimidos de ranitidina, um medicamento amplamente utilizado para o tratamento e profilaxia da úlcera péptica e da doença do refluxo gastroesofágico. Este manuscrito educativo mostra como conceber, abordar e resolver desafios analíticos comuns numa perspectiva de controlo de qualidade (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 73-82. doi: 10.19277/bbr.18.2.271).

Continuando esta secção, o artigo seguinte centra-se em transferossomas como sistemas nanovesiculares para melhorar a permeação da pele de compostos bioactivos. O artigo aborda e compara o impacto nas propriedades físico-químicas e o perfil de citotoxicidade *in vitro* de diferentes formulações de transferossomas (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2); 83-96. doi: 10.19277/bbr.18.2.267).

Os dois artigos seguintes respeitam a investigação científica cosmética, um tema regular nesta secção da nossa revista. Este primeiro estudo foca filmes cosméticos e avalia as propriedades hidratantes dos filmes com ácido ascórbico e ácido hialurónico na sua composição (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 97-107. doi: 10.19277/bbr.18.2.262).

O próximo artigo ilustra a importância da inovação para abordar problemas antigos com soluções satisfatórias, tal como acontece com a pele oleosa. Aqui os autores desenvolveram uma formulação cosmética contendo vitamina B3 para o tratamento de pele oleosa e testam a sua eficácia e aceitação utilizando análise biofísica e sensorial (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 108-118. doi: 10.19277/bbr.18.2.273).

Fechando esta secção um manuscrito original pesquisando a agregação do Polipéptido Amiloide Islet (IAPP), um contribuinte para a disfunção pancreática β - disfunção de células e diabetes tipo 2. Os autores assemem particular interesse no estudo do potencial protector da *Cecropia pachystachya* contra a citotoxicidade induzida pelo IAPP, que parece ser um caminho de investigação promissor (*Biomed Biopharm Res.*, 2021, 18(2), 119-135. doi: 10.19277/bbr.18.2.272).

Finalmente, este número também inclui dois Suplementos apenas disponíveis nesta versão online – o Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBF) ePoster Abstracts, realizado online em Outubro de 2021 (doi: 10.19277/bbr.18.2.265) e o Livro de Resumos do 33º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2021 (doi: 10.19277/bbr.18.2.268) – dois importantes encontros científicos apoiados pela nossa revista.

L Monteiro Rodrigues
Editor Coordenador

Hereditary Hemochromatosis (Clinical case)

Hemocromatose hereditária (Caso clínico)

Bruno Sousa ^{1,2,3}, Nelson Tavares ^{1,2*}

¹School of Sciences and Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal

²CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Lisboa, Portugal

³Health Service of Autonomous Region of Madeira, Madeira, Portugal

* corresponding author (current affiliation) / autor para correspondência (afiliação actual): nelsontavares@natiris.pt

Received / Recebido: 10/07/2021

Accepted / Aceite: 24/10/2021

Electronic Edition: www.alies.pt

A sixty-eight-year-old retired man was sent for Nutrition Consultation by his family doctor due to hereditary hemochromatosis (homozygosity H63D) and other pathologies that require nutritional therapy. He was also sent to a Transfusion Medicine and Rheumatology Consultation.

Keywords: hereditary hemochromatosis, excess iron absorption, organ and tissue damage

Anthropometric assessment

Weight: 109.8 kg
Height: 170 cm
BMI: 38 kg/m²
Waist circumference: 129 cm

Body composition assessment (TANITA TBF 300®)

Body fat: 45.8%
Fat mass: 50.3 kg
Fat-free mass: 59.5 kg
Total body water: 43.6 kg

Analytical Parameters

Hematology

Leukocytes: $9.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.5 - 11.0)
Erythrocytes: $4.59 \times 10^6/\mu\text{L}$ (4.50 - 6.50)
Hemoglobin: 14.9 g/dL (13.0 - 18.0)
Hematocrit: 44.0% (40.0 - 54.0)
Glycated hemoglobin (A1C): 5.8% (4.0 - 6.0)

Um homem de 68 anos, reformado, foi enviado à Consulta de Nutrição pela médica de família por hemocromatose hereditária (homozigotia H63D) e com outras patologias que necessitam de terapêutica nutricional. É enviado também para a Consulta de Medicina Transfusional e de Reumatologia.

Palavras-chave: hemocromatose hereditária, absorção excessiva de ferro, danos de órgãos e tecidos

Avaliação antropométrica

Peso: 109,8 kg
Estatura: 170 cm
IMC: 38 kg/m²
Perímetro da cintura: 129 cm

Avaliação da composição corporal (TANITA TBF 300®)

Gordura corporal: 45,8%
Massa gorda: 50,3 kg
Massa isenta de gordura: 59,5 kg
Água corporal total: 43,6 kg

Parâmetros analíticos

Hematologia

Leucócitos: $9,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4,5 - 11,0)
Eritrócitos: $4,59 \times 10^6/\mu\text{L}$ (4,50 - 6,50)
Hemoglobina: 14,9g/dL (13,0 - 18,0)
Hematócrito: 44,0% (40,0 - 54,0)
Hemoglobina glicada (A1C): 5,8% (4,0 - 6,0)

Prothrombin time: 27.9 sec (9.4 - 12.5)
INR: 2.34 (0.9-1.2)

Biochemistry

Glucose: 97 mg/dL (82.0 - 115.0)
Urea: 43 mg/dL (8.0 - 50.0)
Creatinine: 1.07 mg/dL (0.70 - 1.20)
Uric acid 6.4 mg/dL (4.8 - 8.0)
Total cholesterol: 180 mg/dL (<200.0)
HDL cholesterol: 32.0 mg/dL (>40.0)
LDL cholesterol: 120.8 mg/dL (<115.0)
Triglycerides: 136.0 mg/dL (<150.0)
Alanine Aminotransferase: 55.7 U/L (17.0 - 63.0)
Aspartate Aminotransferase: 40.6 U/L (10.0 - 50.0)
Gamma-glutamyltransferase: 45.6 U/L (7.0 - 50.0)
Iron: 130.0 µg/dL (45.0 - 182.0)
C-reactive protein: 2.98 mg/L (< 6.10)

Hormonology

Thyroid function:
Free T4: 1.3 ng/dL (0.6 - 1.7)
TSH: 1.39 µUI/mL (0.30 - 4.70)

Anemias

Ferritin: 286.0 ng/mL (30.0 - 400.0)
Folic acid: 5.45 ng/mL (>3.89)
Vitamin B12: 563 pg/ml (197 - 771)

Clinical evaluation

Personal background

- Acute myocardial infarction approximately three years ago
- Mixed dyslipidemia
- Severe hepatic steatosis
- Atrial Fibrillation
- HTA
- Class II obesity
- Obstructive Sleep Apnea Syndrome

Medication

Omeprazol 20 mg; Paracetamol 1 g; Atorvastatina 20 mg; Enalapril/hidroclorotiazida 20 mg/12,5 mg; Sintrom 4 mg; Bisoprolol 2,5 mg; Fenofibrato 145 mg; Metformina 850 mg.

Tempo de protrombina: 27,9 seg (9,4 - 12,5)
INR: 2,34 (0,9 - 1,2)

Bioquímica

Glicose: 97 mg/dL (82,0 - 115,0)
Ureia: 43 mg/dL (8,0 - 50,0)
Creatinina: 1,07 mg/dL (0,70 - 1,20)
Ácido úrico: 6,4 mg/dL (4,8 - 8,0)
Colesterol total: 180 mg/dL (<200,0)
Colesterol HDL: 32,0 mg/dL (>40,0)
Colesterol LDL: 120,8 mg/dL (<115,0)
Triglicéridos: 136,0 mg/dL (<150,0)
Alanina Aminotransferase: 55,7 U/L (17,0 - 63,0)
Aspartato Aminotransferase: 40,6 U/L (10,0 - 50,0)
Gamma-glutamiltransferase: 45,6 U/L (7,0 - 50,0)
Ferro: 130,0 µg/dL (45,0 - 182,0)
Proteína C-reativa: 2,9 mg/L (<6,10)

Hormonologia

Função tiroideia:
T4 livre: 1,3 ng/dL (0,6 - 1,7)
TSH: 1,39 µUI/mL (0,30 - 4,70)

Anemias

Ferritina: 286,0 ng/mL (30,0 - 400,0)
Ácido fólico: 5,45 ng/mL (>3,89)
Vitamina B12: 563 pg/mL (197 - 771)

Avaliação clínica

Antecedentes pessoais:

- Enfarte agudo do miocárdio há cerca de 3 anos
- Dislipidemia mista
- Esteatose hepática severa
- Fibrilação Auricular
- HTA
- Obesidade classe II
- Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono

Medicação:

Omeprazol 20 mg; Paracetamol 1 g; Atorvastatina 20 mg; Enalapril/hidroclorotiazida 20 mg/12,5 mg; Sintrom 4 mg; Bisoprolol 2,5 mg; Fenofibrato 145 mg; Metformina 850 mg.

Complementary diagnostic tests

- NMR (2013): Left sacroiliitis
- Joint ultrasound (October 2017): no signs of active synovitis
- Electrocardiogram (July/2018): no significant changes
- Echocardiogram (July/2018): examination made difficult by poor acoustic window, mild mitral-aortic degenerative changes + slight left ventricular hypertrophy with preserved systolic function.

Intestinal transit: regular

Eating habits

Wake up at 7 am

Breakfast: 7:30 am

1 cup of semi-skimmed milk (240 ml) with instant blended coffee + 1 dessert spoon of sugar
2 buns + 1 slice of cheese + 1 slice of ham

Lunch: 1:00 pm

Plate: Half a plate of white rice or 3 potatoes + meat or fish (120 g) + cooked vegetables (about 100 g)
Drink beer or water

Afternoon snack: 4:30 pm

1 cup of semi-skimmed milk (240 ml) with instant blended coffee + 1 dessert spoon of sugar
2 buns + 1 slice of cheese + 1 slice of ham

Dinner: 8:00 pm

Identical to lunch

Bedtime snack: 10:30 pm

1 glass of semi-skimmed milk (200 ml)
3 Maria cookies

Go to bed at 11:00 pm

Water consumption: about 1 liter per day

Alcohol habits: about 6 beers a day

Smoking habits: Stopped smoking approximately five years ago

Exames complementares de diagnóstico

- RMN (2013): Sacroileíte esquerda
- Ecografia articular (outubro/2017): sem sinais de sinovite ativa
- Electrocardiograma (julho/2018): sem alterações significativas
- Ecocardiograma (julho/2018): exame dificultado por má janela acústica, ligeiras alterações degenerativas mitro-aórticas + ligeira hipertrofia do ventrículo esquerdo com função sistólica preservada.

Trânsito intestinal: regular

Hábitos alimentares

Acorda às 7h

Pequeno-almoço: 7h30

1 chávena de leite meio gordo (240 ml) com café de mistura solúvel + 1 colher de sobremesa de açúcar
2 pães + 1 fatia de queijo + 1 fatia de fiambre

Almoço: 13h

Prato: Meio prato de arroz branco ou 3 batatas + carne ou peixe (120 g) + verdura cozidas (cerca de 100 g)
Bebe cerveja ou água

Lanche da tarde: 16h30

1 chávena de leite meio gordo (240 ml) com café de mistura solúvel + 1 colher de sobremesa de açúcar
2 pães + 1 fatia de queijo + 1 fatia de fiambre

Jantar: 20h

Idêntico ao almoço

Ceia: 22h30

1 copo de leite meio gordo (200 ml)
3 bolachas Maria

Deita-se às 23h

Consumo de água: cerca de 1 litro por dia

Hábitos etílicos: cerca de 6 cervejas diárias

Hábitos tabágicos: deixou de fumar há cerca de 5 anos.

Environment, behavior and social

He is married and lives with his wife.

He spends most of his time at home, where he takes his meals, and is not in the habit of socializing with people other than his household.

He likes to eat bread and mentions that he is careful in the preparation of food, namely, to avoid fried foods.

He has a sedentary activity. He reports difficulty in performing certain activities of daily living, namely putting on shoes.

Questions

1. What is hereditary hemochromatosis?
2. How can hereditary hemochromatosis be identified?
3. What are the symptoms of hemochromatosis?
4. How can complications from hereditary hemochromatosis be prevented?
5. What dietary changes will help prevent complications?

Authors Contributions Statement

The contribution to the preparation of this Case Study was identical for both authors.

Acknowledgements

The authors wish to express their thanks to the patient who allowed the elaboration of the case study.

Conflict of Interests

The authors declare there are no financial and personal relationships that could present a potential conflict of interests.

Ambiente, comportamento e social

É casado e vive com a esposa.

Passa a maior parte do tempo em casa, onde realiza as suas refeições, e não tem por hábito conviver com outras pessoas para além do seu agregado familiar.

Gosta de comer pão e refere que tem cuidados na confecção dos alimentos nomeadamente a evitar os fritos.

Apresenta uma atividade sedentária. Refere dificuldade em executar determinadas atividades da vida diária, nomeadamente calçar os sapatos.

Questões

1. O que é hemocromatose hereditária?
2. Como a hemocromatose hereditária pode ser identificada?
3. Quais são os sintomas da hemocromatose?
4. Como prevenir as complicações da hemocromatose hereditária?
5. Como as que mudanças dietéticas ajudarão a prevenir complicações?

Declaração sobre as contribuições do autor

A contribuição na preparação deste Caso de Estudo foi idêntica para os dois autores.

Agradecimentos

Os autores desejam expressar os seus agradecimentos ao paciente que permitiu a elaboração deste caso de estudo.

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não há relações financeiras e pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

Respostas	Answers
<p>1. Hemocromatose hereditária é uma doença hereditária caracterizada por absorção excessiva de ferro (na pele, coração, fígado, pâncreas, glândula pituitária e articulações) devido a deficiência de hepcidina. Demasiado ferro é tóxico para o corpo. Resulta em danos nos tecidos e pode causar doenças hepáticas como cirrose e carcinoma hepatocelular, cardiomiopatia, artropatia, diabetes e hipogonadismo.</p> <p>2. Através de uma análise bioquímica com o doseamento dos níveis séricos de ferritina e ferro, e de um teste de diagnóstico molecular para a hemocromatose hereditária para confirmação do diagnóstico. Podem ainda ser realizados testes não invasivos como ressonância magnética T2 para quantificação da deposição hepática de ferro.</p> <p>3. Fadiga, dores nas articulações, hiperpigmentação da pele, dor abdominal e perda do desejo sexual.</p> <p>4. Fazer análises bioquímicas de rotina com doseamento sérico de ferritina e ferro, e quando necessário fazer flebotomia e terapia de quelação de ferro.</p> <p>5. Uma alimentação pobre em ferro assim como abstinência alcoólica. É igualmente importante alertar para a não suplementação vitamínica, nomeadamente de ferro, vitamina C ou multivitamínico.</p> <p>Uma vez que apresenta outras patologias como a obesidade, HTA e Dislipidemia, é importante ter uma alimentação hipocalórica e com baixos teores em sódio e em gordura saturada.</p>	<p>1. Hereditary hemochromatosis is a hereditary disease characterized by excessive iron absorption (in the skin, heart, liver, pancreas, pituitary gland, and joints) due to hepcidin deficiency. Too much iron is toxic to the body. It results in tissue damage and can cause liver disorders such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma, cardiomyopathy, arthropathy, diabetes and hypogonadism.</p> <p>2. Through a biochemical analysis with the measurement of serum levels of ferritin and iron, and a molecular diagnostic test for hereditary hemochromatosis to confirm the diagnosis. Non-invasive tests such as MRI T2 can also be performed to quantify hepatic iron deposition.</p> <p>3. Fatigue, joint pain, grayish hyperpigmentation of the skin, abdominal pain and loss of sexual desire.</p> <p>4. Perform routine biochemical analysis with serum determination of ferritin and iron, and when necessary perform phlebotomy and iron chelation therapy.</p> <p>5. A diet low in iron as well as alcohol abstinence. It is equally important to warn against vitamin supplementation, namely iron, vitamin C or multivitamins.</p> <p>Since it has other pathologies such as obesity, hypertension and dyslipidemia, it is important to have a low-calorie diet with low levels of sodium and saturated fat.</p>

References / Referências

1. Kowdley, K. V., Brown, K. E., Ahn, J., & Sundaram, V. (2019). ACG Clinical Guideline: Hereditary Hemochromatosis. *The American journal of gastroenterology*, 114(8), 1202–1218. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000315>
2. Porter, J. L., & Rawla, P. (2021). Hemochromatosis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.PMID: 28613612.
3. Raymond, J.L., Morrow, K. (2020). *Krause and Mahan's Food & the Nutrition Care Process* (15th ed). Saunders.

Assessment of nutritional risk in elderly adults of a senior residence – a case study

Avaliação do risco nutricional em idosos utentes de uma residência sénior – um estudo de caso

Diana Pereira ¹, Cíntia Ferreira-Pêgo ², and Bruno Sousa ^{2*}

¹School of Sciences and Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal; ²CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

*corresponding author / autor para correspondência: bruno.sousa@ulusofona.pt

Abstract

Elderly adults have reduced appetite and energy expenditure, and possible malnutrition is related to the decline in biological and physiological functions, as well as its consequences. The aim of this study was to assess the nutritional status and malnutrition risk in elderly adults living in a senior residence. A cross-sectional observational analysis was carried out between February and March 2019 in a private senior residence in which the complete Mini Nutritional Assessment (MNA) was applied. It was observed that of the total of 45 participants, 5 individuals had a normal nutritional status, 18 had malnutrition and 22 were at risk. Malnutrition was related to a decrease in intake in the last 3 months ($p=0.015$) or to the fact that they experienced some type of psychological stress or acute illness in the same period ($p=0.023$). A higher incidence of malnutrition was also found in bedridden individuals or those in wheelchairs ($p<0.001$), as well as in patients with severe dementia ($p=0.010$), with the presence of skin lesions or bedsores ($p=0.006$), weight loss in the previous 3 months ($p=0.003$), and decreased fluid consumption ($p=0.017$). In conclusion, in this residence we verified that the malnutrition and malnutrition risk values are high, highlighting the need for nutritional intervention.

Keywords: Elderly adults, Malnutrition, Nutrition assessment, Nutritional status

Resumo

Os idosos apresentam apetite e gasto energético reduzidos, e a possível desnutrição está relacionada com o declínio nas funções biológicas e fisiológicas, assim como com as suas consequências. O objetivo do presente trabalho consistiu em avaliar o estado nutricional e o risco de desnutrição em idosos institucionalizados numa residência sénior. Foi realizada uma análise observacional transversal, entre fevereiro e março de 2019, numa residência sénior privada, na qual foi aplicado o Mini Nutritional Assessment (MNA) completo. Do total de 45 participantes, 5 indivíduos (11,1%) apresentaram um estado nutricional adequado, 18 apresentaram desnutrição (40,0%) e 22 estavam sob risco (48,9%). A desnutrição estava relacionada com uma diminuição da ingestão alimentar nos últimos 3 meses ($p=0,015$) ou com o facto de terem passado por algum tipo de stress psicológico ou doença aguda no mesmo período de tempo ($p=0,023$). Também se encontrou uma maior prevalência de desnutrição em indivíduos acamados ou em cadeiras de rodas ($p<0,001$), assim como em pacientes com demência grave ($p=0,010$), com presença de lesões na pele ou escaras ($p=0,006$), perda de peso nos últimos 3 meses ($p=0,003$), e consumo <3 copos de líquidos/dia ($p=0,017$). Como conclusão, nesta residência verificamos que os valores de desnutrição e de risco de desnutrição são elevados, evidenciando a necessidade de uma intervenção nutricional.

Palavras-chave: Avaliação nutricional, Desnutrição, Estado nutricional, Idosos

Introduction

According to the PORDATA website, 21.7% of the total Portuguese population was 65 years old or older in 2018, an increase over recent years (1). Ageing is a process, conditioned by biological, social, environmental, historical, and cultural factors (2,3). Elderly adults generally have a reduced appetite and energy expenditure, which may be related to the decline in biological and physiological functions, such as reduced lean body mass, and/or changes in the levels of cytokines and hormones, and/or changes in the regulation of electrolytes in body fluids, which have an independent effect on the delay of gastric emptying which may lead to a decrease in smell and taste (2,3). Additionally, pathological and social changes of ageing, such as chronic diseases, psychological illnesses, depression, social isolation, and medication intake, play an important role in the complex etiology of malnutrition in aged adults (2,4).

Malnutrition is defined as "a state in which a deficiency or imbalance of energy, protein, or other macro- and micronutrients, causes adverse effects on form, function, and clinical outcome" (2). The etiology is multifactorial, and it is not possible to present only one cause (2). It is in this sense that malnutrition is a fundamental element of the health of the elderly population as it largely affects the ageing process, causing a decline in functional status, impaired muscle function, decreased bone mass, immune dysfunction, anemia, reduced cognitive function, poor wound healing, delayed recovery from surgery, higher rates of hospitalization and consequently higher mortality (2,3).

The prevalence of malnutrition is higher in the elderly population as compared to any other age group, especially in the institutionalized elderly population (2,5). According to the Portuguese elderly nutritional status surveillance system (PEN 3S) study (6), 4.8% of the elderly residing in nursing homes are malnourished while only 0.6% of the elderly residing in their homes were in the same clinical situation. In the case of risk of malnutrition, it was found to be 38.7% in nursing homes while for those residing in their usual homes it was 16.9%. Other international studies have also described that more than 30% of patients at hospital admission were at nutritional risk (7). These data in Portugal are between 28.5% and 47.3% (8). However, the assessment of the nutritional risk of institutionalized elderly individuals specifically in each home, in a recurrent manner and a multidisciplinary team, is of special interest to provide information on the nutritional

Introdução

De acordo com o site PORDATA, no ano de 2018 a população com 65 anos ou mais, representava 21,7% do total da população portuguesa, observando-se um aumento ao longo dos últimos anos (1). O envelhecimento é um processo, condicionado por diversos fatores, sendo eles, biológicos, sociais, ambientais, históricos e culturais (2,3). As pessoas idosas geralmente têm apetite e gasto energético reduzidos, o que pode estar relacionado com o declínio nas funções biológicas e fisiológicas, como redução da massa magra, e/ou alterações nos níveis de citocinas e hormonas e/ou alterações na regulação de eletrólitos nos fluidos orgânicos, os quais detêm um efeito independente sobre o atraso do esvaziamento gástrico o que pode levar a uma diminuição do olfato e do paladar (2,3). Adicionalmente, alterações patológicas e sociais do envelhecimento, como doenças crônicas, doenças psicológicas, depressão, isolamento social e toma de medicação, desempenham um importante papel na complexa etiologia da desnutrição no idoso (2,4).

A desnutrição define-se como "um estado no qual uma deficiência ou desequilíbrio de energia, proteína ou outros macro e micronutrientes, causa efeitos adversos na forma, função e resultado clínico" (2). A etiologia é multifatorial, não sendo possível apresentar apenas uma causa (2). É neste sentido, que a malnutrição é um elemento importante e fundamental da saúde da população idosa, já que afeta largamente o processo de envelhecimento, causando declínio no estado funcional, função muscular prejudicada, diminuição da massa óssea, disfunção imunológica, anemia, função cognitiva reduzida, má cicatrização de feridas, atraso na recuperação da cirurgia, maiores taxas de internamento hospitalar e consequentemente maior mortalidade (2,3).

A prevalência de desnutrição é superior na população idosa, em comparação com qualquer outra faixa etária, sobretudo em população idosa institucionalizada (2,5). De acordo com o estudo *Portuguese Elderly Nutritional Status Surveillance System* (PEN 3S) (6), 4,8% dos idosos que residem em lares estão desnutridos enquanto que apenas 0,6% dos idosos que residem nas suas casas se encontravam na mesma situação clínica. No caso de risco de desnutrição verificou-se que nos lares este foi igual 38,7% enquanto que para aqueles que residem nas suas residências habituais foi de 16,9%. Também outros estudos internacionais descreveram que mais de 30% dos doentes na admissão hospitalar se encontrava em risco nutricional (7). Estes dados em Portugal situam-se entre 28,5% e 47,3% (8) Contudo, a avaliação do

status. This same nutritional risk analysis is extremely relevant to promote the coordination of several areas of action, as for (appropriate) adequacy of human resources, including the presence of a nutritionist, as it promotes better use of resources toward positive effects in the correction and treatment of this condition, and consequently in the longevity and quality of life of the elderly adults.

For all these reasons, the main objective of the present study was to assess the nutritional status and malnutrition risk in elderly people institutionalized in a senior residence in Lisbon, as well as to evaluate the factors related to and influencing this malnutrition.

Materials and Methods

Design and study population

This study consists of cross-sectional observational analysis specially designed to assess the nutritional status of institutionalized elderly people within a private senior residence in the district of Lisbon between February and March 2019. The entire resident population, a total of 47 adults, was considered eligible for inclusion, however, two did not authorize their participation. Thus, the study sample consisted of 45 elderly adults (96% of the resident population), 36 females, and 9 males. This study was conducted following the ethical standards outlined in the 1964 Declaration of Helsinki and its subsequent amendments or comparable ethical standards. The management of the evaluated senior residence approved the conduct of the present study. All participants gave informed consent before the evaluation.

Evaluation of nutritional status

The complete Mini Nutritional Assessment (MNA) was applied by the nutritionist in the presence of the nurse who accompanies the resident to assist in some answers (9-11). This tool consists of 18 questions and is divided into two parts: Screening and Global Assessment. The MNA was applied to provide a quick and unique assessment of the nutritional status of elderly residents in the senior residence. The questionnaire can be applied to elderly patients in outpatient clinics, hospitals, and nursing homes, and has been translated

risco nutricional dos idosos institucionalizados em específico em cada lar, de forma recorrente e em equipa multidisciplinar, é de especial interesse para fornecer informação sobre o estado nutricional. Esta mesma análise do risco nutricional é de extrema relevância para a promoção da coordenação de diversas áreas de atuação, como para a correta adequação dos recursos humanos, incluindo a presença de um nutricionista, já que promove uma melhor utilização de recursos, objetivando um efeito positivo na correção e tratamento desta condição, e consequentemente na longevidade e qualidade de vida do idoso.

Por todos estes aspetos, o principal objetivo da presente estudo foi avaliar o estado nutricional e o risco de desnutrição em idosos institucionalizados numa residência sénior em Lisboa, assim como avaliar os fatores relacionados e influenciadores dessa mesma desnutrição.

Material e Métodos

Desenho e estudo da população

O presente estudo consiste numa análise observacional transversal, especialmente desenhado para avaliar o estado nutricional de idosos institucionalizados, utentes de uma residência sénior particular do distrito de Lisboa, entre fevereiro e março de 2019. Como critério de inclusão foi considerado o total de utentes residentes o que perfaz um total de 47 idosos, contudo 2 não autorizaram participar neste estudo, sendo assim a amostra foi constituída por 45 idosos (96% dos idosos institucionalizados na residência analisada), 36 do sexo feminino e 9 do sexo masculino. O presente estudo foi realizado de acordo com as normas éticas estabelecidas na Declaração de Helsínquia de 1964 e as suas posteriores emendas ou normas éticas comparáveis. A direção da residência sénior avaliada, aprovou a realização do presente estudo. Todos os participantes deram o seu consentimento informado antes da avaliação.

Avaliação do estado nutricional

O Mini Nutritional Assessment (MNA) completo foi aplicado pelo nutricionista, na presença da enfermeira que acompanha os utentes, para auxílio em algumas respostas (9-11). Esta ferramenta é constituída por 18 questões e dividido em duas partes: Triagem e Avaliação Global. O MNA foi aplicado com o objetivo de fornecer uma avaliação rápida e única do estado nutricional dos idosos residentes na residência sénior.

into several languages and validated in various clinical settings around the world (3). It consists of simple anthropometric measurements and short questions that can be completed in about 10 minutes. The sum of the MNA score distinguishes between elderly people with adequate nutritional status (with a score greater than or equal to 24 points), malnourished (with a score less than 17 points), and at risk of malnutrition (for scores between 17 and 23.5 points). Anthropometric measurements were performed according to standard procedures using calibrated equipment (5,8). Weight was measured by trained professionals using an electronic scale and recorded to the nearest decigram (0.1 kg). Height was measured using a calibrated stadiometer, and the value was recorded to the nearest millimeter (0.1 cm). Height was also assessed with participants standing with their backs to the stadiometer and with feet and knees together, head positioned so that the gaze remained horizontal, according to the Frankfurt plane. All participants wore light clothing and no shoes during all measurements.

Weight and height data in wheelchair-bound and bedridden elderly people who were unable to stand (12) were obtained using estimated measurements, namely for weight by the arm and leg (twin) circumferences (13), and height by the heel-knee distance (14), using the specific formulas. A fixed length (non-elastic) anthropometric tape with a resolution of 0.1 cm was used to measure both perimeters and the heel-knee distance.

The Body Mass Index (BMI) was calculated using the normalized formula [Weight (in kg)/Height² (in m)].

Statistical analysis

Data are presented as means and standard deviation (SD) for continuous variables or numbers (n) and percentages (%) for categorical variables. The distribution of selected characteristics was compared between groups, gender, or nutritional status categories according to MNA, using Pearson χ^2 tests for categorical variables or Student's t-tests or analysis of variance (ANOVA), as appropriate, for continuous variables. All statistical tests were two-tailed, and the significance level was set at $p < 0.05$. All analyses were performed using SPSS software version 23.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

O questionário pode ser aplicado em pacientes idosos em ambulatórios, hospitais e casas de repouso, tendo sido traduzido em vários idiomas e validado em vários contextos clínicos em todo o mundo (3). É composto por medições antropométricas simples e perguntas breves que podem ser concluídas em cerca de 10 minutos. A soma do resultado do MNA distingue entre idosos com: estado nutricional adequado (com pontuação superior ou igual a 24 pontos), desnutrido (com pontuação inferior a 17 pontos) e sob risco de desnutrição (se obtiver uma pontuação entre 17 e 23,5 pontos). As medições antropométricas foram efetuadas de acordo com procedimentos padrão, utilizando equipamentos calibrados (5,8). O peso foi medido por profissionais treinados utilizando uma balança eletrônica e registrado o valor no decígrama mais próximo (0,1 kg). A estatura foi medida utilizando um estadiômetro calibrado e o valor foi registrado no milímetro mais próximo (0,1 cm). A estatura foi avaliada com os participantes de pé, de costas para o estadiômetro e com os pés e joelhos juntos, a cabeça posicionada para que o olhar permanecesse horizontal, de acordo com o plano de Frankfurt. Todos os participantes usaram roupas leves e não usaram sapatos durante todas as medições.

A obtenção de dados de peso e estatura em idosos que se encontravam em cadeiras de rodas e acamados, sendo incapazes de permanecer em pé (12), foi realizada com recurso a medidas estimadas, nomeadamente para o peso através dos perímetros do braço e da perna (geminal) (13), e para a estatura através da distância calcânhar – joelho (14), utilizando as fórmulas específicas. Na medição de ambos os perímetros e da distância calcânhar - joelho foi utilizada uma fita antropométrica não extensível de resolução de 0,1cm.

O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado utilizando a fórmula normalizada [Peso (em kg)/Estatura² (em m)].

Análise estatística

Os dados são apresentados como médias e desvio padrão (DP) para variáveis contínuas ou números (n) e percentagens (%) para variáveis categóricas. Comparou-se a distribuição das características selecionadas entre os grupos, sexos ou categorias de estado nutricional de acordo com o MNA, usando testes de Pearson χ^2 para variáveis categóricas ou testes t de Student ou análise de variância (ANOVA), conforme apropriado, para variáveis contínuas. Todos os testes estatísticos foram bicaudais e o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software SPSS versão 23.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Table 1 - Demographic and nutritional characterization of the total sample and according to gender.
Tabela 1 - Caracterização demográfica e nutricional da amostra total e de acordo com o sexo.

	Total population / População total (n=45)	Women / Mulher (n=36)	Men / Homem (n=9)	p-value*
Age / Idade, years / anos	84.42 (9.06)	85.58 (8.27)	79.78 (11.03)	0.086
Weight / Peso, kg	56.66 (12.19)	56.13 (12.92)	59.87 (6.37)	0.579
Height / Estatura, m	1.51 (0.08)	1.48 (0.06)	1.63 (0.02)	<0.001
Arm perimeter / Perímetro do braço, cm				
< 21	15.60 (7)	13.90 (5)	22.20 (2)	
21 – 22	4.40 (2)	5.60 (2)	0.00 (0)	0.661
> 22	80.00 (36)	80.60 (29)	77.80 (7)	
Leg perimeter / Perímetro da perna, cm				
< 31	37.80 (17)	41.70 (15)	22.20 (2)	
≥ 31	62.20 (28)	58.30 (21)	77.80 (7)	0.282
BMI / IMC, kg/m ²	25.46 (5.82)	25.96 (6.09)	22.59 (2.98)	0.295
BMI categories / Categorias de IMC, % (n)				
< 19	7.7 (2)	9.1 (2)	0.0 (0)	
19 – 21	11.5 (3)	4.5 (1)	50.0 (2)	
21 – 23	11.5 (3)	9.1 (2)	25.0 (1)	0.037
≥ 23	69.2 (18)	77.3 (17)	25.0 (1)	

Data expressed as mean (SD) or percentage (n), as appropriate. *p-value for comparisons between groups (male/female) assessed by Student's t-test for continuous variables or Pearson χ^2 for categorical variables. Abbreviations: BMI, Body Mass Index / Dados expressos em média (DP) ou percentagem (n), como apropriado. *Valor P para comparações entre grupos (homem/mulher) avaliado por Teste t de Student para variáveis contínuas ou Pearson χ^2 para variáveis categóricas. Abreviaturas: IMC, Índice de Massa Corporal

Results

Forty-five participants (36 women and 9 men) with a mean age of 84 years (SD: 9 years) participated in the present analysis. The demographic and nutritional characteristics of the population (total and by gender) are shown in Table 1.

No statistically significant differences were found for age, weight, arm circumference, leg circumference, and BMI. However, men are significantly taller than women and a lower proportion of men were found in the BMI categories <19 kg/m² and >23 kg/m².

Table 2 shows the assessment of indicator characteristics of nutritional status based on the MNA for the total sample and according to the gender of the participants. No significant differences were observed in any of the parameters previously analyzed. Also, no statistical differences were observed regarding the final MNA score or its categories in the distribution by gender.

Resultados

Participaram na presente análise 45 participantes (36 mulheres e 9 homens), com uma idade média de 84 anos (DP: 9 anos).

As características demográficas e nutricionais da população, para a amostra total e de acordo com o sexo podem ser observadas na Tabela 1. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a idade, peso, perímetro do braço, perímetro da perna e IMC. Contudo, os homens são significativamente mais altos do que as mulheres e encontrou-se uma menor proporção de homens nas categorias de IMC <19 kg/m² e ≥23 kg/m².

A Tabela 2 mostra a avaliação de características indicadoras do estado nutricional com base no MNA para a amostra total e de acordo com o sexo dos participantes. Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros anteriormente analisados. Também não foram observadas diferenças estatísticas no que toca à pontuação final do MNA ou suas categorias na distribuição por sexo.

Finally, nutritional status was assessed based on the three categories of the final MNA score (Table 3). Of the total sample, 5 participants had an adequate nutritional status, 18 had malnutrition, and 22 were at risk. There were no relationships between nutritional status and gender, age, or BMI. However, there were significant differences in the variables "decreased food intake in the past three months," "weight loss in the past three months," "mobility," "experiencing psychological stress or acute illness in the past three months," "neuropsychological problems," "presence of skin lesions or bedsores," and "fluid intake." The largest percentage of malnourished participants had a moderate to severe decrease in intake in the three months prior the interview, as well as greater weight loss during the same period. Concerning mobility, there is a higher percentage of bedridden or wheelchair-bound individuals presenting malnutrition: 88.90% of the bedridden or wheelchair-bound individuals and 11.10% of ambulatory individuals presented malnutrition. Of the institutionalized users with malnutrition, 66.70% had experienced some type of psychological stress or acute illness in the three months prior to completing the questionnaire. It is also noteworthy that the majority of patients with severe dementia presented malnutrition, as did all the participants with the presence of skin lesions or bedsores. Finally, half of the elderly users with malnutrition consumed less than three cups of liquid per day.

Discussion

Nutritional risk assessment through the MNA may contribute to the early diagnosis of nutritional status and prevention of a possible deterioration of the general health status. In the present study, the MNA was applied to elderly adults institutionalized in a senior residence in the district of Lisbon, and we found that 40.0% were malnourished and 48.9% were at risk of malnutrition. The high prevalence of the elderly at nutritional risk has been recently observed both nationally and worldwide (15).

The residential situation of elderly adults also determines their nutritional status, their quality of life, and even their physical and psychological well-being (16). In a systematic review and meta-analysis of data on nutritional status in older persons using the MNA, the prevalence of malnutrition was differentiated

Por último, foi avaliado o estado nutricional com base nas 3 categorias da pontuação final no MNA (Tabela 3). Do total da amostra, 5 participantes apresentaram um estado nutricional adequado, 18 apresentaram desnutrição e 22 estavam sob risco. Não existiram relações entre o estado nutricional e o sexo, idade ou IMC. Contudo, existiram diferenças significativas nas variáveis "diminuição da ingestão alimentar nos últimos 3 meses", "perda de peso nos últimos 3 meses", "mobilidade", "passar por situações de stress psicológico ou doença aguda nos últimos 3 meses", "problemas neuropsicológicos", "presença de lesões na pele ou escaras", e "consumo de líquidos". A maior percentagem de participantes desnutridos apresentava uma diminuição moderada a grave de ingestão nos últimos 3 meses anteriores à entrevista, assim como maior perda de peso durante o mesmo período de tempo. Em relação à mobilidade, existe maior percentagem de indivíduos acamados ou em cadeiras de rodas que apresentam desnutrição: 88,9% dos indivíduos acamados ou em cadeiras de rodas, assim como 11,1% dos que deambulavam apresentaram desnutrição. Dos utentes institucionalizados com desnutrição, 66,7% passaram por algum tipo de stress psicológico ou doença aguda no período que correspondia aos 3 meses antecedentes ao preenchimento do questionário. É também de salientar que a maioria dos pacientes com demência grave, apresentaram desnutrição, assim como a totalidade dos participantes com presença de lesões na pele ou escaras. Finalmente, a metade dos utentes idosos com presença de desnutrição consumiram menos de três copos de líquidos por dia.

Discussão

A avaliação do risco nutricional através do MNA poderá contribuir para o diagnóstico precoce do estado nutricional e prevenção de uma possível deterioração do estado geral de saúde. No presente estudo foi aplicado o MNA em idosos institucionalizados numa residência sénior do distrito de Lisboa, e verificamos que 40,0% apresentavam desnutrição e 48,9% estavam sob risco de desnutrição. A elevada prevalência de idosos em risco nutricional é algo que tem vindo a ser observado ultimamente, tanto a nível nacional como mundial (15).

O local onde os idosos habitam também determina o seu estado nutricional, a qualidade de vida e mesmo o seu bem-estar físico e psicológico (16). Numa revisão sistemática e meta-análise de dados sobre o estado nutricional em pessoas idosas usando o MNA, a prevalência de desnutrição diferiu significativamente

Table 2. Evaluation of nutritional status indicator characteristics based on MNA for the total sample and according to gender.**Tabela 2.** Avaliação de características indicadoras do estado nutricional com base no MNA para a amostra total e de acordo com o sexo.

	Total sample / Amostra total (n=45)	Women / Mulher (n=36)	Men / Homem (n=9)	p-value*
MNA[#]	18.07 (5.11)	18.22 (4.97)	17.44 (5.87)	0.688
MNA categories / categorias, % (n)				
Normal nutritional status / Estado nutricional normal	11.1 (5)	11.1 (4)	11.1 (1)	
At risk of malnutrition / Sob risco de desnutrição	48.9 (22)	52.8 (19)	33.3 (3)	0.539
Malnourished / Desnutrido	40.0 (18)	36.1 (13)	55.6 (5)	
Decreased food intake last 3 months / Diminuição de ingestão alimentar últimos 3 meses				
Severe / Severa	4.4 (2)	2.8 (1)	11.1 (1)	
Moderate / Moderada	40.0 (18)	44.4 (16)	22.2 (2)	0.322
No decrease / Sem diminuição	55.6 (25)	52.8 (19)	66.7 (6)	
Weight loss in the last 3 months / Perda de peso nos últimos 3 meses, kg				
No loss / Sem perda	55.6 (25)	52.8 (19)	66.7 (6)	
1 -3	37.8 (17)	38.9 (14)	33.3 (3)	0.589
> 3	6.7 (3)	8.3 (3)	0.0 (0)	
Mobility / Mobilidade				
Bedridden or wheelchair-bound / Acamado ou cadeira de rodas	53.3 (24)	55.6 (20)	44.4 (4)	
Walks / Deambula	44.4 (20)	41.7 (15)	55.6 (5)	0.694
Normal	2.2 (1)	2.8 (1)	0.0 (0)	
Psychological stress or acute illness last 3 months / Stress psicológico ou doença aguda últimos 3 meses	46.7 (21)	50.0 (18)	33.3 (3)	0.37
Neuropsychological problems / Problemas neuropsicológicos				
Severe dementia / Demência grave	40.0 (18)	33.3 (12)	66.7 (6)	
Mild dementia / Demência leve	53.3 (24)	58.3 (21)	33.3 (3)	0.166
No problems / Sem problemas	6.7 (3)	8.3 (3)	0.0 (0)	
Presence of skin lesions or bedsores / Presença de lesões na pele ou escaras	13.3 (6)	11.1 (4)	22.2 (2)	0.38
Daily cups of liquid consumed / Copos diários de líquidos consumidos				
< 3	31.1 (14)	25.0 (9)	55.6 (5)	
3 -5	26.7 (12)	30.6 (11)	11.1 (1)	0.183
> 5	42.2 (19)	44.4 (16)	33.3 (3)	
Number of meals daily / Número de refeições diárias				
1	2.2 (1)	2.8 (1)	0.0 (0)	
2	2.2 (1)	2.8 (1)	0.0 (0)	0.77
3	95.6 (45)	94.4 (34)	100.0 (9)	
Intake of / Consumo de:				
1 daily portion of milk or dairy products / 1 porção diária de leite ou derivados	88.9 (40)	91.7 (33)	77.8 (7)	0.236
2 daily servings of fruit or vegetables / 2 porções diárias de fruta ou hortícolas	97.8 (44)	97.2 (35)	100.0 (9)	0.613
Meat, fish or poultry every day / Carne, peixe ou aves todos os dias	93.3 (42)	91.7 (33)	100.0 (9)	0.37
2 weekly servings of legumes and eggs / 2 porções semanais de leguminosas e ovos	91.1 (41)	88.9 (32)	100.0 (9)	0.295

Data expressed as percentage (n). *p value for comparisons between groups (male/female) evaluated by Pearson χ^2 . Abbreviations: MNA, Mini Nutritional Assessment. #MNA: final score from 0 to 30 points./ Dados expressos em percentagem (n). *Valor P para comparações entre grupos (homem/mulher) avaliado por Pearson χ^2 . Abreviaturas: MNA, Mini Nutritional Assessment. #MNA: pontuação final de 0 a 30 pontos.

between the healthcare settings: 3.1% in the community, 6.0% in the outpatient clinic, 8.7% in home care services, 22.0% in the hospital level, 17.5% in nursing homes, 28.7% in long-term care units, and 29.4% in rehabilitation units (17). In Portugal, the prevalence of malnutrition in the elderly community in general is low, although a high number of elderly are at nutritional risk, compared to institutionalized elderly who are generally malnourished (16). According to the PEN 3S study, 4.8% of the elderly residing in nursing homes are malnourished while only 0.6% of the elderly residing in their homes were found with this clinical condition. In nursing homes, the risk of malnutrition was 38.70%, while the risk was 16.90% for those residing in their own homes (6). A similar situation has been found in Brazil, where the majority of the population is at risk of malnutrition, particularly the institutionalized elderly (18). Differing from the conclusions of this study and other scientific evidence, Saka et al., Serrano-Urrea and García-Meseguer showed that in Turkey and Spain, respectively, the elderly living in institutions were better nourished than in their usual homes (19,20).

The high levels of malnutrition and risk of malnutrition found in our studied senior residence, higher than the data found in the literature, may also be related to its lack of a specialized nutritional technician to carry out these assessments routinely and support any consequent nutritional intervention to avoid these high levels, with clear consequences for the health of these elderly people.

During the ageing process, there is a decrease in both balance and functional mobility, and immobility is one of the factors associated with decreased oral intake (20,21). Our results can be partially explained by this statement, as we observed that only the elderly with adequate nutritional status had normal mobility. In addition, the presence of psychological stress was observed only in the elderly at risk of malnutrition and in the malnourished elderly. It is known that a high incidence of neuropsychological problems can interfere with autonomy and social or professional performance in elderly individuals (22). In this study, malnutrition was associated with severe dementia, a situation also reported in other studies (23,24). On the other hand, the presence of skin lesions or bedsores was only observed in the malnourished elderly. Previously published studies have likewise indicated the existence of associations between malnutrition and the development of pressure ulcers and consequently the difficulty of their healing (21).

entre os ambientes de saúde considerados: na comunidade foi de 3,1%; em ambulatorio de 6,0%; em serviços de atendimento domiciliar de 8,7%; a nível hospitalar de 22,0%; lares de idosos de 17,5%; em unidades de cuidados de longo prazo foi de 28,7%; e em unidades de reabilitação de 29,4% (17). Em Portugal verifica-se uma baixa prevalência da desnutrição dos idosos na comunidade de forma geral e um elevado número de idosos em risco nutricional, quando comparado com idosos institucionalizados que se encontram maioritariamente desnutridos (16). De acordo com o estudo PEN 3S, 4,8% dos idosos que residem em lares estão desnutridos enquanto que apenas 0,6% dos idosos que residem nas suas casas se encontravam na mesma situação clínica. No caso de risco de desnutrição verificou-se que nos lares este risco foi de 38,7% enquanto que para aqueles que residem nas suas residências habituais foi de 16,9% (6). O mesmo também se verifica fora de Portugal, nomeadamente no Brasil, onde a maioria da população se encontra em risco de desnutrição, particularmente os idosos institucionalizados à semelhança de Portugal (18). Divergindo das conclusões do presente estudo, assim como de diversa evidência científica, Saka et al., Serrano-Urrea e García-Meseguer demonstraram que na Turquia e em Espanha, respetivamente, os idosos residentes em instituições encontravam-se melhor nutridos do que nas suas residências habituais (19,20).

Os elevados níveis de desnutrição e risco de desnutrição encontrados nesta residência sénior, superiores aos dados encontrados na literatura, também podem estar relacionados com a inexistência na instituição de um técnico especializado na área da nutrição, para realizar estas avaliações por rotina e a consequente intervenção nutricional, para evitar estes níveis elevados, com claras consequências para a saúde destes idosos.

Durante o processo de envelhecimento ocorre uma diminuição tanto do equilíbrio como da mobilidade funcional, já para não referir que a imobilidade é um dos fatores associados à diminuição da ingestão oral (20,21). Os nossos resultados podem em parte ser explicados por esta afirmação, já que observamos que apenas os idosos com estado nutricional adequado apresentavam mobilidade normal. Também a presença de stress psicológico observou-se apenas em idosos sob o risco de desnutrição e em idosos desnutridos. É conhecido que os problemas neuropsicológicos têm alta incidência no idoso interferindo na sua autonomia, no desempenho social ou profissional do indivíduo (22). Neste estudo, a desnutrição esteve associada à demência grave, situação que é igualmente reportada

Table 3. Evaluation of factors related to nutritional status, according to the categories of nutritional status obtained through the MNA.**Tabela 3.** Avaliação dos fatores relacionados com o estado nutricional, de acordo com as categorias de estado nutricional obtidas através do MNA.

	Normal nutritional status / Estado nutricional normal (n=5)	At risk of malnutrition / Sob risco de desnutrição (n=22)	Malnourished / Desnutrido (n=18)	p-value*
Gender / Sexo				
Women / Mulher	11.1 (4)	52.8 (19)	36.1 (13)	0.539
Men / Homem	11.1 (1)	33.3 (3)	55.6 (5)	
Age / Idade, years / anos				
< 85	14.3 (3)	42.9 (9)	42.9 (9)	0.694
≥ 85	8.3 (2)	54.2 (13)	37.5 (9)	
BMI / IMC, kg / m²				
< 19	0.0 (0)	12.5 (2)	0.0 (0)	0.177
19 – 21	20.0 (1)	0.0 (0)	40.0 (2)	
21 – 23	0.0 (0)	18.8 (3)	0.0 (0)	
≥ 23	80.0 (4)	68.8 (11)	60.0 (3)	
Decreased food intake last 3 months / Diminuição de ingestão alimentar últimos 3 meses				
Severe / Severa	0.0 (0)	0.0 (0)	11.1 (2)	0.015
Moderate / Moderada	0.0 (0)	31.8 (7)	61.1 (11)	
No decrease / Sem diminuição	100.0 (5)	68.2 (15)	27.8 (5)	
Weight loss in the last 3 months / Perda de peso nos últimos 3 meses, kg				
No loss / Sem perda	0.0 (0)	0.0 (0)	16.7 (3)	0.003
1 – 3	0.0 (0)	27.3 (6)	61.1 (11)	
> 3	100.0 (5)	72.7 (16)	22.2 (4)	
Mobility / Mobilidade				
Bedridden or wheelchair-bound / Acamado ou cadeira de rodas	0.0 (0)	36.4 (8)	88.9 (16)	<0.001
Walks / Deambula	80.0 (4)	63.6 (14)	11.1 (2)	
Normal	20.0 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	
Psychological stress or acute illness last 3 months / Stress psicológico ou doença aguda últimos 3 meses				
Neuropsychological problems / Problemas neuro psicológicos	0.0 (0)	40.9 (9)	66.7 (12)	0.023
Severe dementia / Demência grave	0.0 (0)	27.3 (6)	66.7 (12)	0.010
Mild dementia / Demência leve	100.0 (5)	68.2 (15)	22.2 (4)	
No problems / Sem problemas	0.0 (0)	4.5 (1)	11.1 (2)	
Presence of skin lesions or bedsores / Presença de lesões na pele ou escaras	0.0 (0)	0.0 (0)	33.3 (6)	0.006
Number of meals daily / Número de refeições diárias				
1	0.0 (0)	0.0 (0)	5.6 (1)	0.535
2	0.0 (0)	0.0 (0)	5.6 (1)	
3	100.0 (5)	100.0 (22)	88.9 (16)	
Intake of / Consumo de:				
≥ 1 daily portion of milk or dairy products / 1 porção diária de leite ou derivados	100.0 (5)	90.9 (20)	83.3 (15)	0.528
≥ 2 daily servings of fruit or vegetables / 2 porções diárias de fruta ou hortícolas	100.0 (5)	95.5 (21)	100.0 (18)	0.586
Meat, fish or poultry every day / Carne, peixe ou aves todos os dias	100.0 (5)	90.9 (20)	94.4 (17)	0.741
≥ 2 weekly servings of legumes and eggs / 2 porções semanais de leguminosas e ovos	80.0 (4)	90.9 (20)	94.4 (17)	0.603
Daily cups of liquid consumed / Copos diários de líquidos consumidos				
< 3	20.0 (1)	18.2 (4)	50.0 (9)	0.017
3-5	20.0 (1)	18.2 (4)	38.9 (7)	

Data expressed as a percentage (n). *p-value for comparisons between groups assessed by Pearson χ^2 . Abbreviations: BMI, Body Mass Index./ Dados expressos como percentagem (n). *Valor P para comparações entre grupos avaliado por Pearson χ^2 . Abreviaturas: IMC, Índice de Massa Corporal.

Our study has several strengths, including the use of a validated and published tool for the assessment of nutritional status. However, some limitations should be assumed. This is a case study with a small sample size which limits the significance of the results, and the existence of other potential correlations. In our small sample, we observed a high prevalence of malnutrition, which negatively affects the general health status of elderly populations and particularly within the institutionalized elderly. However, this study reflects the reality within a single institution. It is important to conduct more systematic and frequent studies in other senior residences and to increase the sample size to strengthen the scientific evidence on the prevalence of states of nutritional risk and malnutrition in institutionalized elderly in our country.

Conclusion

In this senior residence, we found that the malnutrition and malnutrition risk values are high, highlighting the need for nutritional intervention, as these places need specialized technicians in the area in order to promote a good nutritional status, which is so important, particularly in this age group.

Authors Contributions Statement

BS conceptualization and study design; BS, DP experimental implementation, and data collection; C.F.-P. data analysis; DP, C.F.-P. drafting, editing, and reviewing; C.F.-P. tables, figures, and graphics; C.F.-P., BS supervision; C.F.-P., BS final writing.

noutros trabalhos (23,24). Por outro lado, a presença de lesões na pele ou escaras apenas se observou em idosos desnutridos. Neste sentido, estudos já previamente publicados indicam a existência de associações entre a desnutrição e o desenvolvimento de lesões por pressão e consequentemente a dificuldade da sua cicatrização (21).

O nosso estudo tem vários pontos fortes, como por exemplo a utilização de uma ferramenta validada e publicada para a avaliação do estado nutricional. Contudo, algumas limitações devem ser assumidas. Trata-se de um estudo de caso com uma amostra reduzida o que limita o significado dos resultados, e a existência de outras potenciais correlações. Na nossa pequena amostra, observámos uma elevada prevalência de subnutrição, que afecta negativamente o estado geral de saúde das populações idosas e particularmente no seio dos idosos institucionalizados. Contudo, este estudo reflete apenas a realidade de uma única instituição. É importante realizar de forma mais frequente mais estudos em outras residências sénior, e com uma amostra superior de modo a fortalecer a evidência científica sobre a prevalência, mas sobretudo também a incidência, de risco nutricional e de desnutrição em idosos institucionalizados no nosso país.

Conclusões

Nesta residência sénior verificamos que os valores de desnutrição e de risco de desnutrição são elevados, evidenciando a necessidade da intervenção nutricional, pois estes locais necessitam de técnicos especializados na área, no sentido de promoverem um bom estado nutricional, tão importante, particularmente nesta faixa etária.

Declaração sobre as contribuições do autor

B.S. conceitualização e concepção do estudo; B.S, D.P. implementação experimental e recolha de dados; C.F.-P. análise de dados; D.P, C.F.- P. redação, edição e revisão; C.F.-P. tabelas, figuras e gráficos; C.F.-P., B.S. supervisão; C.F.-P., B.S. redação final.

Funding

Cíntia Ferreira Pêgo is funded by Foundation for Science and Technology (FCT) Scientific Employment Stimulus contract with the reference number CEEC/CBIOS/NUT/2018. This work is funded by national funds through FCT - Foundation for Science and Technology, IP, under the UIDB/04567/2020 and UIDP/ 04567/2020 projects, and ALIES-COFAC - PADDICC2021.

Acknowledgments

The authors acknowledge all the participants.

Conflict of Interests

All authors have stated that there are no financial and/or personal relationships that could represent a potential conflict of interest.

Financiamento

Cíntia Ferreira Pêgo é financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) Contrato de Estímulo ao Emprego Científico com o número de referência CEEC/CBIOS/NUT/2018. Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., ao abrigo dos projetos UIDB/04567/2020 e UIDP/ 04567/2020, e ALIES-COFAC - PADDICC2021.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os participantes.

Conflito de Interesses

Todos os autores declararam que não existem relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

1. PORDATA - Base de Dados Portugal Contemporâneo. (2015). População residente: total e por grandes grupos etários em Portugal. PORDATA.
2. Ahmed, T., & Haboubi, N. (2010). Assessment and management of nutrition in older people and its importance to health. *Clinical interventions in aging*, 5, 207–216. <https://doi.org/10.2147/cia.s9664>.
3. World Health Organization. (2015). World Report on Aging and Health. Geneve.
4. Serván, P.R., Poyatos, R.S., Rodríguez, J.S., Gómez-Candela, C., Luna, P.P.G., Serra-Majem, L. (2015). Consideraciones y recomendaciones en el caso de estudios nutricionales realizados en adultos mayores. *Revista Española de Nutrición Comunitaria 21* (Supl. 1), 81-87. DOI: 10.14642/RENC.2015.21.sup1.5055
5. Bernstein, M., & Munoz, N. (2012). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Food and Nutrition for Older Adults: Promoting Health and Wellness. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(8), 1255–1277.
6. Madeira, T., Peixoto-Plácido, C., Sousa-Santos, N., Santos, O., Alarcão, V., Goulão, B., Mendonça, N., Nicola, P. J., Yngve, A., Bye, A., Bergland, A., Amaral, T. F., Lopes, C., & Gorjão Clara, J. (2018). Malnutrition among older adults living in Portuguese nursing homes: the PEN-3S study. *Public Health Nutrition*, 22(3), 486-497. doi:10.1017/S1368980018002318
7. Direção-Geral da Saúde. 2019. Rastreamento Nutricional – Documento de apoio à implementação da avaliação do risco nutricional. Lisboa: Direção-Geral da Saúde.
8. Matos, L., Teixeira, M.A., Henriques, A., Tavares, M.M., Alvares, L., Antunes, A., et al. 2007. Nutritional status recording in hospitalized patient notes. *Acta Médica Portuguesa*, 20(6):503-510.
9. Vellas, B., Villars, H., Abellan, G., Soto, M. E., Rolland, Y., Guigoz, Y., Morley, J. E., Chumlea, W., Salva, A., Rubenstein, L. Z., & Garry, P. (2006). Overview of the MNA® - Its History and Challenges. *The journal of nutrition, health & aging*, 10, 456-465.
10. Rubenstein, L.Z., Harker, J.O., Salva, A., Guigoz, Y., Vellas, B. (2001). Screening for Undernutrition in Geriatric Practice: Developing the Short-Form Mini Nutritional Assessment (MNA-SF). *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 56A, M366-377.
11. Guigoz, Y. (2006) The Mini-Nutritional Assessment (MNA®) Review of the Literature - What does it tell us? *The journal of nutrition, health & aging*, 10, 466-487.
12. Chumlea, W.C., Roche, A.F., Steinbaugh, M.L. (1985). Estimating Stature from Knee Height for Persons 60 to 90 Years of Age. *Journal of the American Geriatrics Society*, 33(2),116–120.
13. Stewart, A., Marfell-Jones, M., Olds, T., De Ridder, H. (2011). ISAK: International Society for Advancement of Kinanthropometry. International standards for anthropometric assessment.
14. Chumlea, W.C., & Guo, S. (1992). Equations for predicting stature in White and Black elderly individuals. *Journal of gerontology*, 47(6), M197-203. <http://doi.org/10.1093/geronj/47.6.m197>
15. Lage, J., Simões, C.D., Comadão, J., Silva, A.P., Valente, A. (2018). Avaliação do risco nutricional em idosos utentes de um centro de saúde de Lisboa. *Acta Portuguesa de Nutricao*, 14,6–9.
16. Bernardo, S. C. (2013). Estado Nutricional dos Idosos que Frequentam os Centros de Dia e Centros de Convívio do Concelho de Paços de Ferreira (Tese de mestrado, Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto). Repositório aberto da Universidade do Porto. <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/66544/4/23883.2.pdf>
17. Cereda, T., Pedrolli, C., Klersy, C., Bonardi, C., Quarleri, L., Cappello, S., Turri, A., Rondanelli, M., Caccialanza, R. (2016). Nutritional status in older persons according to healthcare setting: A systematic review and meta-analysis of prevalence data using MNA®. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 35(6),1282-1290. <http://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.03.008>
18. Damo, C.C., Doring, M., Alves, A.L.S., Portella, M.R. (2018). Risk of malnutrition and associated factors in institutionalized elderly persons. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia 21*(6), 711–717. <https://doi.org/10.1590/1981-22562018021.180152>
19. Saka, B., Ozkaya, H., Karisik, E., Akin, S., Akpınar, T.S., Tufan, F., Bahat, G., Dogan, H., Horasan, Z., Cesur, K., Erten, N., Karan, M.A.(2016). Malnutrition and sarcopenia are associated with increased mortality rate in nursing home residents: A prospective study. *European Geriatric Medicine* 7(3), 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.eurger.2015.12.010>
20. Serrano-Urrea, R., & García-Meseguer, M.J. (2014). Relationships between nutritional screening and functional impairment in institutionalized Spanish older people. *Maturitas*, 78(4), 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.05.021>
21. Alfieri, F. M., Silva, N. O. V. E, Kutz, N. A., & Oliveira, M. M. H. de A. de. (2016, abril-junho). Relações entre equilíbrio, força muscular, mobilidade funcional, medo de cair e estado nutricional de idosos da comunidade. *Revista Kairós Gerontologia 19*(2), 147-165.
22. Loução, A.T. (2013). Avaliação Nutricional no Idoso (Tese de mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra). Repositório Científico da Universidade de Coimbra. <http://hdl.handle.net/10316/47650>
23. Dos Santos, T.B.N., Fonseca, L.C., Tedrus, G.M.A.S., Delbue, J.L. (2018). Alzheimer's disease: nutritional status and cognitive aspects associated with disease severity. *Nutricion hospitalaria*, 35(6),1298-1304. <http://doi.org/10.20960/nh.2067>.
24. Vicente de Sousa, O., Mendes, J., Amaral, T.F. (2020). Nutritional and Functional Indicators and Their Association With Mortality Among Older Adults With Alzheimer's Disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*, 35, 1533317520907168. <http://doi.org/10.1177/1533317520907168>.

Probiotics in the gut-skin axis – the case of kefir

Probióticos no eixo intestino-pele - o caso do kefir

Emília Alves ^{1,2}, Patrícia Rijo ^{1,3}, Luís Monteiro Rodrigues ^{1*}, Catarina Rosado ^{1**}

¹CBIOS - Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal; ²Department of Biomedical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Alcalá, Campus Universitario, 28871 Alcalá de Henares, Spain; ³Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.U LISBOA), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisbon, Portugal

*corresponding author / autor para correspondência: catarina.rosado@ulusofona.pt

**shared senior mentorship / supervisão senior partilhada

Abstract

The intestinal microbiota is linked to important functions in the host. Alterations in its composition and/or its by-products, causing loss of homeostasis, contribute to dysfunctions in other organic systems, including the skin, hence suggesting a gut-skin relationship. The oral administration of probiotics, widely associated with improved intestinal health, can act through an immunomodulatory response, both locally and systemically, presenting itself as potentially beneficial in inflammatory skin diseases such as atopic dermatitis. Traditional kefir, consumed for centuries as a health-promoting natural food, has its biological activity attributed both to the presence of a complex microbiota and to the action of the metabolites released during fermentation. The biological activity of kefir has been demonstrated in part by its ability to positively impact the intestinal microbiota, mainly based on animal models and *in vitro*, thus providing limited information. The nutritional and microbiological value of kefir makes its application as a probiotic in the gut-skin relationship a topic of significant interest.

This review aimed to explore the impact of probiotics as regulators of the gut-skin axis, focusing on the current knowledge of kefir as a health-promoting food.

Keywords: kefir, probiotic, gut-skin axis, skin health, atopic dermatitis

Resumo

A microbiota intestinal está ligada a importantes funções no hospedeiro. Alterações em sua composição e/ou subprodutos, causando perda da homeostase, contribuem para disfunções em outros sistemas orgânicos, incluindo a pele, sugerindo uma relação intestino-pele. A administração oral de probióticos, amplamente associada à melhora da saúde intestinal, pode atuar por meio de uma resposta imunomoduladora, quer local quer sistemicamente, apresentando-se como potencialmente benéfica em doenças inflamatórias da pele como a dermatite atópica. O kefir tradicional, consumido durante séculos como um alimento natural promotor de saúde, tem a sua actividade biológica atribuída à presença de uma microflora complexa, bem como à acção dos metabolitos libertados durante a fermentação. A actividade biológica de kefir parcialmente demonstrada pela sua capacidade de influenciar positivamente a microbiota intestinal, tem sido baseada principalmente em modelos animais e *in vitro*, proporcionando assim informação limitada. O valor nutricional e microbiológico do kefir torna sua aplicação como um probiótico na relação intestino-pele de grande interesse.

Esta revisão teve como objetivo explorar o impacto dos probióticos enquanto reguladores do eixo intestino-pele, focando o conhecimento atual do kefir como um alimento promotor de saúde.

Palavras-chave: kefir, probiótico, eixo intestino-pele, saúde da pele, dermatite atópica

Introduction

The adult human intestine includes a complex ecosystem of microorganisms referred to as gut microbiota (1). The intestinal microbiota is linked to important functions in the host, including digestion of fermentable carbohydrates into short-chain fatty acids (SCFAs) used as an energy source for intestinal cells; production of key nutrients such as essential vitamins and amino acids; protection against pathogens and regulation of the immune system (2,3,4,5). Under normal conditions, intestinal barrier function is highly efficient due to a complex network of mechanisms including a mucus layer, junction proteins, antimicrobial factors, and adaptive immune cells (5,6). However, changes in both the quantitative and qualitative composition of the microbiota, designated as intestinal dysbiosis, potentiates the disruption of these conditions, resulting in loss of homeostasis and, consequently, contributing to a disease state (4,7,8,9). This connection between the gut microbiome and human health foresees that the factors affecting microbial composition can indirectly modulate disease states. Among these, the inclusion of probiotics in the host's diet plays a prominent role, both for its nutritional value and easy digestion, and for the growing predisposition of individuals to consume foods perceived as healthy (3,6,10,11,12). Traditional kefir, originating in the Caucasus Mountains, has been consumed for centuries. Current knowledge supports the historical consideration of kefir as a health-promoting natural food (13,14,15), and this review aimed to explore the impact of probiotics from kefir as regulators of the gut-skin axis.

Gut-Skin Axis

The intestinal microbiota and its by-products have been shown to affect other organic systems, including the skin, thus demonstrating the existence of a gut-skin relationship (16,17,18). This influence can manifest itself directly via modulation of the immunological response, or indirectly through the secretory activity of the intestinal epithelium and the impact of the host's diet (19,20,21).

Alterations in the balance of the gut-skin relationship are associated with dysfunctions both at the gastrointestinal and skin levels. Changes in the intestinal microbiota associated with increased intestinal permeability can impact the immune system, thus promoting systemic inflammation, and allowing the direct migration of

Introdução

O intestino humano adulto inclui um ecossistema complexo de microrganismos conhecidos como microbiota intestinal (1). A microbiota intestinal está ligada a funções importantes no hospedeiro, como digestão de hidratos de carbono fermentáveis em ácidos gordos de cadeia curta (AGCCs) que são usados como fonte de energia para as células intestinais; produção de nutrientes, como síntese de vitaminas e aminoácidos essenciais; proteção contra patógenos e regulação do sistema imunológico (2,3,4,5). Em condições normais, a função da barreira intestinal é altamente eficiente devido a uma complexa rede de mecanismos como a presença de uma camada de muco, proteínas de junção, fatores antimicrobianos e células imunes adaptativas (5,6). Porém, alterações, quer quantitativas quer qualitativas, na composição da microbiota, denominadas disbiose intestinal, potenciam a perturbação dessas condições, resultando na perda da homeostase, contribuindo consequentemente para o estado de doença (4,7,8,9). Esta conexão entre o microbioma intestinal e a saúde humana prevê que os fatores que afetam a composição microbiana possam indiretamente modular os estados de doença. Dentre estes, a dieta do hospedeiro, incluindo a ingestão de probióticos, desempenha papel de destaque, tanto pelo seu valor nutricional e de fácil digestão, quanto pela crescente predisposição dos indivíduos a consumir alimentos percebidos como saudáveis (3,6,10,11,12). O kefir tradicional, originário da Cordilheira do Cáucaso, é consumido há séculos. O conhecimento atual corrobora a visão histórica do kefir como um alimento natural promotor da saúde (13,14,15), pelo que esta revisão teve como objetivo explorar o impacto dos probióticos do kefir como reguladores do eixo intestino-pele.

Eixo intestino-pele

A microbiota intestinal e seus subprodutos têm a capacidade de afetar outros sistemas orgânicos, incluindo a pele, demonstrando assim a existência de uma relação intestino-pele (16,17,18). Essa influência pode manifestar-se diretamente pela modulação da resposta imunológica, ou indiretamente, pela atividade secretora do epitélio intestinal e pelo impacto da dieta do hospedeiro (19,20,21). Alterações no equilíbrio da relação intestino-pele estão associadas a disfunções tanto no nível gastrointestinal quanto na pele. Alterações na microbiota intestinal associadas ao aumento da permeabilidade intestinal podem impactar o sistema

inflammatory products into the circulation. When these products reach the skin, skin homeostasis can be impaired, thus reinforcing the existence of a link between the intestinal microbiota and dermatological diseases (1,3,4,22,23). Although the mechanisms of action are still unclear, considering the current knowledge, the response to intestinal environmental changes seems to involve a combination of factors that lead to a state of systemic inflammation, thus affecting the skin. Moreover, intestinal dysbiosis has been found to be a common factor in inflammatory skin diseases such as atopic dermatitis, rosacea, acne, and psoriasis, thus supporting the bidirectionality of this axis (22,24,25,26).

Probiotics in the modulation of the gut

By definition, probiotics are live microorganisms that confer a health benefit to the host when administered in adequate amounts (27). However, growing evidence suggests that non-microbial components, such as microbial metabolites and cell wall compounds, can also positively affect human health (16,28,29). In addition to their nutritional benefits, the use of probiotics has been widely associated with improved intestinal health, whether by improving the intestinal barrier function, modulating the immune system and antimicrobial effect against intestinal pathogens, or by producing metabolites with anti-inflammatory action, such as SCFA acetate, propionate, and butyrate (5,28,30,31,32,33,34,35). The mechanisms of action, however, have yet to be fully identified. Moreover, no product with health claims associated with the administration of probiotics has yet been approved by the European Food Security Authority (EFSA) (36).

Probiotics and skin health

The integrity of the skin barrier is critical for skin defense and immune performance (35,37,38). Immune skin diseases such as rosacea, acne, and atopic dermatitis are associated with the breakdown of the skin barrier, whereas its restoration is associated with an improvement in clinical outcomes (38,39,40,41).

Probiotics can modulate the immune response locally or systemically (1,6,23,24,40). Topical application of probiotics reduces pro-inflammatory molecules, hence controlling the spread of skin inflammation in acne, and produces anti-inflammatory molecules via

imunológico, promovendo inflamação sistêmica, além de permitir a migração direta de produtos inflamatórios para a circulação. Quando esses produtos atingem a pele pode ocorrer perturbação na homeostase cutânea, reforçando a existência de um elo entre a microbiota intestinal e as doenças dermatológicas (1,3,4,22,23). Embora os mecanismos de ação ainda sejam obscuros, considerando-se os conhecimentos atuais, a resposta às alterações ambientais intestinais parece envolver uma combinação de fatores que levam a um estado de inflamação sistêmica, afetando a pele. Além disso, em doenças inflamatórias da pele como dermatite atópica, rosácea, acne e psoríase, a disbiose intestinal é considerada um fator comum, apoiando desse modo a bidirecionalidade deste eixo (22,24,25,26).

Probióticos na modulação do intestino

Probióticos são, por definição, microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (27). No entanto, evidências crescentes sugerem que componentes não microbianos, como metabolitos microbianos e compostos da parede celular, também podem afetar positivamente a saúde humana (16,28,29). O uso de probióticos, além dos seus benefícios nutricionais, tem sido amplamente associado à melhoria da saúde intestinal, seja pela melhoria da função de barreira intestinal, pela modulação do sistema imunológico e pelo efeito antimicrobiano contra patógenos intestinais, seja pela produção de metabolitos com ação antiinflamatória, como os AGCC, acetato, propionato e butirato, apesar dos seus mecanismos de ação não estarem ainda totalmente identificados (5,28,30,31,32,33,34,35). Além disso, nenhum produto com alegações de saúde associadas à administração de probióticos foi ainda aprovado pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) (36).

Probióticos e a saúde da pele

A integridade da barreira cutânea é crítica para a defesa da pele e para o desempenho imunológico (35,37,38). Doenças imunológicas da pele, como rosácea, acne e dermatite atópica, estão associadas à quebra da barreira cutânea, enquanto que a sua restauração está associada a uma melhoria nos desfechos clínicos (38,39,40,41). Os probióticos podem modular a resposta imune, local ou sistemicamente (1,6,23,24,40). A aplicação

dendritic cells in atopic dermatitis (AD) (16,22,42). In addition to improving the intestinal barrier function, oral administration of probiotics can modulate the immune response and reduce systemic inflammation, thereby improving skin health through the gut-skin axis (22,23,41). Research on the contribution of probiotics to skin health has focused on skin conditions such as AD, acne, wound healing, and skin barrier improvement (17,18,22,26,41,43,44). Furthermore, increasing evidence suggests that in addition to the microbial effect, non-microbial components such as microbial metabolites and cell wall compounds may also have beneficial effects, including benefits to skin health (16,28,29,45).

Immunological modulation of probiotics and skin health

The immunological impact of probiotics has been demonstrated by their ability to upregulate regulatory T cells (Treg) and Type-1 T-helper (Th1) cells, responsible for the production of anti-inflammatory cytokines such as interleukin-10 (IL-10), in addition to their ability to downregulate Type-2 and Type-17 T-helper cells (Th2 and Th17, respectively) responsible for the production of pro-inflammatory cytokines such as interferon (INF)- γ , interleukin-4 (IL-4) and interleukin-5 (IL-5) (5,46). Furthermore, probiotics also suppress the maturation of dendritic cells leading to inhibition of naive T cell differentiation into Th2 cells, thus fighting skin inflammation (35,47,48,49).

The role of microbial metabolites of probiotics in skin health

Several bacterial metabolites can enhance immunological response, thus leading to beneficial dermal effects (29). Lactic acid is the major product of metabolization of carbohydrates by either homo- or heterofermentative lactic-acid bacteria (LAB), which can be produced in sufficient concentrations to exhibit antibacterial activity against most pathogenic dermal bacteria (29,45,50,51). Lactic acid has been documented as part of the natural moisturizing factor (NMF) that retains moisture in the skin, and it plays important roles in the physical properties of the stratum corneum (29). Acetic acid, also produced by heterofermentative LAB, has been shown to exert antibacterial effects on different bacterial species, likely due to its pH lowering capability, thereby creating an environment unsuitable for pathogen growth (29,45). Diacetyl can also be produced by some strains of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* at concentrations that

tópica de probióticos reduz a produção de moléculas pró-inflamatórias, controlando assim a propagação da inflamação da pele no acne, além de produzir moléculas anti-inflamatórias, via células dendríticas, na dermatite atópica (DA) (16,22,42). A administração oral de probióticos, além de melhorar a função de barreira intestinal, pode modular a resposta imune e reduzir a inflamação sistêmica, melhorando a saúde da pele através do eixo intestino-pele (22,23,41). Pesquisas sobre a contribuição dos probióticos para a saúde da pele focaram doenças da pele como DA, acne, cicatrização de feridas e melhoria da barreira cutânea (17,18,22,26,41,43,44). Adicionalmente, evidências crescentes sugerem que, além do efeito microbiano, componentes não microbianos, como metabolitos microbianos e compostos da parede celular, também podem exercer efeitos benéficos para a saúde, inclusive na saúde da pele (16,28,29,45).

Modulação imunológica de probióticos e saúde da pele

O impacto imunológico dos probióticos tem sido demonstrado pela sua capacidade de regular positivamente as células T reguladoras (Treg) e as células T auxiliares do tipo 1 (Th1), responsáveis pela produção de citocinas antiinflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10), além de regular negativamente as células T auxiliares do tipo 2 (Th2) e do tipo 17 (Th17), responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como interferon (INF)- γ , interleucina-4 (IL-4) e interleucina-5 (IL-5) (5,46). Adicionalmente, os probióticos também suprimem a maturação das células dendríticas, levando à inibição da diferenciação das células T naïve em células Th2, combatendo assim a inflamação da pele (35,47,48,49).

O papel dos metabólitos microbianos dos probióticos na saúde da pele

Vários metabolitos bacterianos podem aumentar a resposta imunológica, conduzindo a efeitos dérmicos benéficos (29). O ácido láctico é o principal produto da metabolização de hidratos de carbono por bactérias ácido-lácticas homo e heterofermentativas (BAL), que podem produzi-lo em concentrações suficientes para exibir atividade antibacteriana contra a maioria das bactérias dérmicas patogênicas (29,45,50,51). O ácido láctico foi documentado como fazendo parte do fator de hidratação natural (NMF), que retém a umidade da pele e desempenha papéis importantes nas propriedades físicas do estrato córneo (29). O ácido acético, também produzido por BAL heterofermentativas, demonstrou exercer efeitos antibacterianos em diferentes espécies

suggest its potential dermal antimicrobial activities (45). Lipoteichoic acid (ALT) and peptidoglycan (PG) are structural components of cell walls and play a vital role in their growth and physiology, with evidence that their production by LAB can be sufficient to increase the dermal cell defense against bacterial infection (29,45). Moreover, PG from *Lactobacilli* demonstrated the ability to stimulate an immune response, thus contributing to skin protection (2,9,23), and can be effective even at low concentrations by synergism with LTA (25). Hyaluronic acid (HA), widely utilized in dermatology as a biomaterial and in the promotion of wound healing due to its highly osmotic nature, is relevant in controlling tissue hydration during inflammatory processes (52). To date, only certain strains of *Lactobacilli* are known to produce HA (45). Finally, sphingomyelinase (SMase), an enzyme that generates ceramides and sphingomyelin precursors necessary for the development of extracellular lipid bilayers in the stratum corneum, has demonstrated important activity for skin barrier function (29,53). SMase can be produced by strains of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* at sufficient concentrations to promote ceramide production in skin cells with the possibility to improve barrier properties (45).

Probiotics in Atopic Dermatitis

AD is a chronic inflammatory skin disease associated with an exacerbated skin response to environmental agents that, together with the disruption of the skin barrier integrity, promote a decrease in the antimicrobial response, thus enabling abnormal skin inflammation (38,54). Although the etiology remains unclear, AD onset points towards a complex interaction between skin barrier dysfunction, immune dysregulation, environmental risk factors, and dysbiosis of the intestinal and skin microbiota, which correlates with its clinical severity (54,55,56,57).

Immunological imbalance has been reported in AD patients, namely a decrease in Treg cells and an increase in Th2 cells and Th17 cells in the acute phase of the disease, whereas Th1 cells were associated with the chronic phase (23,26). Th17 cells were also positively correlated with AD severity (58). Current research has focused on the immunomodulatory effect of probiotics, as they are able to stimulate Treg cells and suppress Th2 cells mediated responses, which are the predominant immune responses in AD (23,26,41,46,59,60,61,62,63). However, evidence supporting their use for the treatment and prevention of AD is limited (40,41,61,64,65,66,67,68).

bacterianas, provavelmente devido à sua capacidade de diminuir o pH, criando assim um ambiente inadequado para o crescimento de patógenos (29,45). Também o diacetil pode ser produzido por algumas estirpes de *Lactobacilli* e *Bifidobacteria* em concentrações que sugerem sua potencial atividade antimicrobiana dérmica (45). O ácido lipoteicóico (ALT) e o peptidoglicano (PG) são componentes estruturais das paredes celulares bacterianas e desempenham um papel vital no seu crescimento e fisiologia, existindo evidência de que a sua produção por BAL consegue atingir quantidades suficientes para aumentar a defesa celular dérmica contra infecção bacteriana (29,45). Adicionalmente, o PG de *Lactobacilli* demonstrou capacidade para estimular a resposta imune, contribuindo assim para a proteção da pele (2,9,23), podendo ainda ser eficaz mesmo em baixas concentrações por sinergismo com o LTA (25). O ácido hialurônico (AH), amplamente utilizado na dermatologia como biomaterial e também na promoção da cicatrização de feridas devido à sua natureza altamente osmótica, é relevante no controle da hidratação dos tecidos durante os processos inflamatórios (52). Até o momento, apenas certas estirpes de *Lactobacilli* são conhecidas por produzir AH (45). Por fim, a esfingomielinase (SMase), uma enzima que gera ceramidas e precursores de esfingomielina para o desenvolvimento de bicamadas lipídicas extracelulares no estrato córneo, demonstrou atividade importante para a função de barreira da pele (29,53). SMase pode ser produzida por estirpes de *Lactobacilli* e *Bifidobacteria* em concentrações suficientes para promover a produção de ceramidas nas células da pele com a possibilidade de melhorar as propriedades de barreira (45).

Probióticos na Dermatite Atópica

A DA é uma doença inflamatória crônica da pele associada a uma resposta exacerbada da pele a agentes ambientais que, juntamente com a quebra da integridade da barreira cutânea, promovem uma diminuição na resposta antimicrobiana, possibilitando, assim, uma inflamação cutânea anormal (38,54). Embora a etiologia permaneça obscura, o início da DA aponta para uma complexa interação entre a disfunção da barreira cutânea, a desregulação imunológica, fatores de risco ambientais e disbiose da microbiota intestinal e cutânea, que se correlacionam com a sua gravidade clínica (54,55,56,57).

Desequilíbrios imunológicos têm sido relatados em pacientes com DA, nomeadamente a diminuição das células Treg e o aumento das células Th2 e Th17, na

The composition of the gut microbiota has been shown to be different in AD patients, which helps support the hypothesis that aberrant gut microbiota may underlie the onset or worsening of AD (23,59,69). Through the gut-skin axis, intestinal dysbiosis has the ability to negatively impact skin function, either by increasing epithelial permeability via pro-inflammatory cytokines, thus promoting immune dysregulation and contributing to the chronic systemic inflammation in AD, or by perpetuating pruritus via secretion of neuroendocrine itch mediators, leading to a chronic itch-scratch cycle, thus further disrupting the skin barrier (47,54,70,71). Consequently, the gut-skin axis may be receptive to modulation via dietary modification, which represents a potential complementary alternative in AD therapy (6,13). Despite growing evidence that probiotics can improve the intestinal disorders associated with AD, their use has not always proven to be effective, as the observed decrease in gut permeability may be insufficient to cause a discernible disease improvement (59,63,65).

To date, research conducted *in vivo* in human adults on the impact of probiotics on AD is scarce (40,41,48,59,61). Typically studied probiotics are *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Saccharomyces boulardii*, both isolated or in combination. In this sense, and due to the lack of consistency of the results obtained, it is plausible that some of the observed effects may be dependent on strains or species used, as well as on the microbial diversity and potential synergisms between microbes (26,44,63,72,73,74).

fase aguda da doença, enquanto as células Th1 foram associadas à sua fase crônica (23,26). As células Th17 também foram positivamente correlacionadas com a gravidade da DA (58). Investigação recente tem-se concentrado no efeito imunomodulador dos probióticos, face à sua capacidade de estimular as células Treg e suprimir as respostas mediadas pelas células Th2, que são as respostas imunes predominantes na DA (23,26,41,46,59,60,61,62,63). No entanto, as evidências atuais que apoiam o seu uso para o tratamento e prevenção da DA são limitadas (40,41,61,64,65,66,67,68).

A composição da microbiota intestinal mostrou ser diferente em pacientes com DA, o que ajuda a apoiar a hipótese de que uma microbiota intestinal aberrante pode estar subjacente ao início ou agravamento da DA (23,59,69). Através do eixo intestino-pele, a disbiose intestinal tem a capacidade de impactar negativamente a função da pele, seja pelo aumento da permeabilidade epitelial via citocinas pró-inflamatórias, promovendo assim a desregulação imunológica e contribuindo para a inflamação sistêmica crônica na DA, ou perpetuando o prurido via secreção de mediadores neuroendócrinos, levando a um ciclo crônico de prurido-coçar, danificando ainda mais a barreira da pele (47,54,70,71). Consequentemente, o eixo intestino-pele pode ser receptivo à modulação por meio de alterações dietéticas, representando, portanto, uma potencial alternativa complementar na terapia da DA (6,13). Apesar das evidências crescentes de que os probióticos podem melhorar os distúrbios intestinais associados à DA, a sua utilização nem sempre se mostrou eficaz, pois a diminuição observada na permeabilidade intestinal pode ser insuficiente para causar uma melhora perceptível da doença (59,63,65).

Até o momento, pesquisas conduzidas *in vivo*, em humanos adultos, são escassas sobre o impacto dos probióticos na DA (40,41,48,59,61). Os probióticos normalmente estudados são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces boulardii*, geralmente isolados ou em combinação. Nesse sentido, e devido à falta de consistência dos resultados obtidos, é plausível que alguns dos efeitos observados possam ser dependentes de estirpes ou espécies usadas, bem como da diversidade microbiana, devido a possíveis sinergismos entre micróbios (26,44, 63,72,73,74).

Kefir, a traditional and trendy probiotic beverage

Traditional kefir production uses kefir grains as a starter culture for the fermentation of milk, differentiating it from other fermented foods (75). The microorganisms present in the grains are responsible for the lactic, acetic, and alcoholic fermentation of the milk, originating a product with a viscous texture, a sour and slightly acidic taste, and a low alcohol and carbonation content (76,77). Although these microbiological mixtures may not be fully defined, this product is considered acceptable for human consumption by EFSA due to its long tradition of food production using the traditional fermentation substrate (e.g., cow milk) (36,78).

Currently, the growing demand for healthy foods has encouraged the consumption of kefir, drawing the attention of the food industry into its industrial production. However, due to the microbiological complexity of the kefir grains, maintaining the product quality in industrial production is problematic (79). Additionally, secondary yeast fermentation during storage compromised attempts to package traditionally produced kefir, further contributing to limit its large-scale production (80). Thus, pure cultures, composed of a mixture of bacteria with or without yeast, are used in current kefir-like industrial products. Despite their similar flavor, some of the health benefits typically ascribed to traditional kefir may not occur, in part due to this change in microbial diversity (77,81,82).

The microbiological composition of the fermented beverage is different from that of the grains and varies depending on its origin and cultivation method (75,83). The nutritional composition is influenced by the type of milk, the time and temperature of fermentation, and the storage conditions (51,84,85). Even so, traditionally produced kefir fulfills both microbiological and nutritional requirements (86,87).

The lactic acid produced by LAB and the presence of acetic acid produced by acetic-acid bacteria act as natural preservatives, resulting in a low contamination risk for the traditional homemade product (31,88). LAB also contribute to the organoleptic properties of the beverage by producing volatile compounds (e.g., acetaldehyde and acetyl), exopolysaccharides, and free amino acids (89,90). Yeasts produce alcohol and carbon dioxide that contribute to the characteristic mouth feel and taste of kefir (51). The biochemical composition of kefir is reflected in its nutritional value, which is typically around 3% protein, less than 10% fat, and at

Kefir, uma bebida probiótica tradicional e moderna

A produção tradicional de kefir usa grãos de kefir como cultura inicial para a fermentação do leite, diferenciando-o de outros alimentos fermentados (75). Os microrganismos presentes nos grãos são responsáveis pela fermentação láctica, acética e alcoólica do leite, originando um produto de textura viscosa, sabor azedo e ligeiramente ácido, baixo teor alcoólico e carbonatado (76,77). Uma longa tradição de produção de alimentos usando essas misturas microbiológicas não totalmente definidas e sendo o substrato de fermentação consistente com essa tradição (por exemplo, leite de vaca), torna este produto como aceitável para consumo humano pela EFSA (36,78).

Atualmente, a crescente demanda por alimentos saudáveis tem estimulado o consumo do kefir, atraindo a atenção da indústria alimentar para sua produção industrial. No entanto, devido à complexidade microbiológica dos grãos de kefir, manter a qualidade do produto na produção industrial é problemático (79). Além disso, as tentativas de embalar o kefir tradicionalmente produzido foram comprometidas pela fermentação secundária de leveduras durante o armazenamento, o que contribuiu ainda mais para limitar sua produção em larga escala (80). Assim, o uso de culturas puras, compostas por uma mistura de bactérias com ou sem leveduras, está na base dos atuais produtos industriais do tipo kefir. Apesar de seu sabor semelhante, alguns dos benefícios para a saúde, tipicamente atribuídos ao kefir tradicional, podem não ocorrer, em parte devido a esta diferença na diversidade microbiana (77,81,82).

A composição microbiológica da bebida fermentada é diferente da dos grãos e varia em função da origem dos grãos e do seu método de cultura (75,83). Já a composição nutricional é influenciada pelo tipo de leite, pelo tempo e temperatura de fermentação e pelas condições de armazenamento (51,84,85). No entanto, o kefir tradicionalmente produzido cumpre os requisitos microbiológicos e nutricionais (86,87).

O ácido láctico produzido pelas BAL, potencializado pela presença do ácido acético produzido por bactérias ácido-acéticas, atua como conservante natural, permitindo que o produto caseiro tradicional tenha baixo risco de contaminação (31,88). As BAL também contribuem para as propriedades organolépticas da bebida, produzindo compostos voláteis (por exemplo, acetaldeído e acetyl), exopolissacarídeos e aminoácidos

least 0.6% lactic acid, according to the Codex criteria (86). Kefir can be refrigerated to maintain a shelf life of 3–12 days (77,81,91).

Health effects of kefir

Several health-promoting properties have been ascribed to kefir consumption (14,50,51,84,92,93,94,95). However, to date, most studies have been conducted *in vitro* with undigested kefir, or in animal models, thus limiting the prediction of the biological activity of kefir in humans (96,97,98). Among the reported health activities of kefir are the improved lactose digestion, hypocholesterolemic effect, reduction of insulin resistance and antihypertensive effect, anti-inflammatory effect, antimicrobial activity, antioxidant activity, antitumor activity, endothelial dysfunction, wound healing, modulation of the immune system and inhibition of pathogenic microorganisms (28,31,52,88,99,100,101,102,103,104). *In vivo* human studies using kefir, however scarce, have been able to support some of these health benefits such as anti-inflammatory activity, hypocholesterolemic effect, and intestinal integrity conditions (107,109,126,127).

These putative beneficial health properties can be attributed both to the complex microbial fraction of kefir that has shown *in vitro* an ability to colonize the human gut and modulate intestinal microbiota composition (98,112,124), and to the non-microbial fraction containing bioactive metabolites resulting from fermentation (32,76,100,102,105,106), including lactic acid, acetic acid, ethanol and CO₂, vitamins, peptides, polysaccharides (such as kefiran), bacteriocins, acetaldehyde and diacetyl (74,98,108,110,111). The role of the lactic acid has been highlighted. In addition to down-regulating pro-inflammatory responses at intestinal level (33,34,108), lactic acid can be used by the gut microbiota to produce acetate, propionate, and butyrate. These SCFAs are highly associated with intestinal health and the modulation of the immune response (5,62,98,112). Furthermore, the antimicrobial capacity of kefir, mainly attributed to the presence of organic acids and other inhibitor compounds such as bacteriocins, has also been demonstrated *in vitro* (28,31,106). Its peptides have been linked to anti-hypertensive, antimicrobial, immunomodulatory, and anti-oxidative properties (14,108,113,114). Moreover, the water-soluble polysaccharide kefiran has demonstrated *in vitro* resistance to enzymatic intestinal hydrolysis (77,89,108,115,116,117), therefore becoming available to act as a substrate to the beneficial gut microbiota (118). Additionally, anti-tumor, anti-

livres (89,90). As leveduras produzem álcool e dióxido de carbono que contribuem para a sensação na boca e sabor característicos do kefir (51). A composição química do kefir reflete-se no seu valor nutricional, que é normalmente cerca de 3% de proteína, menos de 10% de gordura e pelo menos 0,6% de ácido láctico, de acordo com os critérios do Codex (86). O kefir pode ser refrigerado mantendo uma vida útil de 3–12 dias (77,81,91).

Efeitos do kefir na saúde

Várias propriedades de promoção da saúde foram atribuídas ao consumo de kefir (14,50,51,84,92,93,94,95). No entanto, até o momento, a maioria dos estudos foi realizada *in vitro* usando kefir não digerido ou em modelos animais, limitando assim a previsão da atividade biológica do kefir em humanos (96,97,98). Entre as atividades de saúde relatadas sobre o kefir estão a melhoria da digestão da lactose, efeito hipocolesterolémico, redução da resistência à insulina e efeito anti-hipertensivo, efeito antiinflamatório, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, atividade antitumoral, disfunção endotelial, cicatrização de feridas, modulação do sistema imunológico e inibição de microorganismos patogênicos (28,31,52,88,99,100,101,102,103,104). Estudos *in vivo*, em humanos, usando kefir, embora escassos, têm sido capazes de apoiar alguns desses benefícios para a saúde, como a atividade antiinflamatória, efeito hipocolesterolémico e integridade das condições intestinais (107,109,126,127).

Essas supostas propriedades benéficas para a saúde podem ser atribuídas tanto à complexa fração microbiana do kefir, que demonstrou, *in vitro*, uma capacidade de colonizar o intestino humano e modular a composição da microbiota intestinal (98,112,124), quanto à fração não microbiana que contém todos os metabolitos bioativos resultantes da fermentação (32,76,100,102,105,106), como ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂, vitaminas, peptídeos, polissacarídeos (como o kefirano), bacteriocinas, acetaldeído e diacetil (74,98,108,110,111). O papel do ácido láctico tem sido destacado, pois além de regular as respostas pró-inflamatórias ao nível intestinal (33,34,108), também pode ser usado pela microbiota intestinal para produzir acetato, propionato e butirato, que são AGCC altamente associados à saúde intestinal e à modulação da resposta imune (5,62,98,112). Adicionalmente, a capacidade antimicrobiana do kefir, atribuída principalmente à presença de ácidos orgânicos e outros compostos inibidores, como bacteriocinas, também foi demonstrada *in vitro* (28,31,106). Os seus peptídeos têm sido relacionados com propriedades anti-hipertensivas,

fungal, anti-bacterial, anti-hypertensive, anti-glycemic, laxative, immunomodulatory, anti-inflammatory, healing, and antioxidant properties of kefir have been reported (100,102,116,118,119,120).

Modulation of the gut by kefir

The ability of kefir to positively impact both the intestinal microbiota and the general condition of the digestive system has been demonstrated *in vitro*, in animal models, and in a limited number of human trials, where its potent anti-inflammatory effect has been frequently noted (93,96,98,108,112,121,122,123,124,125). Recent research in humans on the putative modulation of intestinal microbiota showed that after the consumption of kefir, individuals with metabolic syndrome presented positive correlations between the composition of the intestinal microbiota and improvement of the insulin profile, decreased levels of pro-inflammatory cytokines (such as Tumoral Necrosis Factor (TNF)- α and IFN- γ) and lower blood pressure (126). In addition, another study in humans demonstrated the ability of kefir to modulate the composition of the intestinal microbiota by increasing the concentration of serum zonulin, thus avoiding disruption of the intestinal permeability (109). Thereby, the positive impact of kefir in the host's gut microbiota suggests that regular kefir consumption may reduce the risk of intestinal dysbiosis and, consequently, could improve the outcome of diseases, such as those with an inflammatory component (127,128).

Effect of kefir on the skin

Research regarding the impact of kefir on the skin thus far has been limited to *in vitro* and animal studies and to the beneficial effect of its topical application on wound healing (52,102) and anti-inflammatory and antimicrobial activity (52,102,119). A recent study exploring the impact of oral administration of a kefir yeast (*Kazachstania turicensis*) in AD using an animal model verified a beneficial effect on the modulation of the gut microbiota as well as in the immune response, thus increasing the potential of kefir as a possible application in AD (121).

Noteworthy, none of the *in vivo* human studies found in the literature assessed the impact of a diet containing traditionally homemade kefir as the probiotic, neither in healthy nor atopic skin (5,112).

antimicrobianas, imunomoduladoras e antioxidantes (14,108,113,114). O polissacarídeo hidrossolúvel, kefirano, demonstrou *in vitro* resistência à hidrólise enzimática intestinal (77,89,108,115,116,117), tornando-se, desse modo, disponível para atuar como um substrato para a microbiota intestinal benéfica (118). Por fim, o kefirano tem sido também evidenciado pelas suas propriedades antitumorais, antifúngicas, antibacterianas, anti-hipertensivas, anti-glicémicas, laxantes, imunomoduladoras, antiinflamatórias, cicatrizantes e antioxidantes (100,102,116,118,119,120).

Modulação do intestino pelo kefir

A capacidade do kefir de impactar positivamente a microbiota intestinal e a condição geral do sistema digestivo foi demonstrada *in vitro*, em modelos animais e num número limitado de testes em humanos, onde o seu forte efeito antiinflamatório se destacou (93,96,98, 108,112,112,121,122,123,124,125). Pesquisas recentes em humanos sobre a potencial modulação da microbiota intestinal mostraram que, após o consumo do kefir, indivíduos com síndrome metabólica apresentaram correlações positivas entre a composição da microbiota intestinal e melhoria do perfil insulínico, diminuição de citocinas pró-inflamatórias (como a Tumoral Fator de necrose (TNF)- α e IFN- γ) e na pressão arterial (126). Adicionalmente, outro estudo em humanos foi capaz de demonstrar a capacidade do kefir em modular a composição da microbiota intestinal, aumentando a concentração de zonulina sérica, evitando assim a ruptura da permeabilidade intestinal (109). Deste modo, o impacto positivo do kefir na microbiota intestinal sugere a possibilidade de que o consumo regular de kefir pode reduzir o risco de disbiose intestinal e, conseqüentemente, melhorar o resultado de doenças, como aquelas com um carácter inflamatório (127,128).

Efeito do kefir na pele

A investigação sobre o impacto do kefir na pele está até agora limitada a estudos *in vitro* e em animais, e ao efeito benéfico de sua aplicação tópica na cicatrização de feridas (52,102) e atividade antiinflamatória e antimicrobiana (52,102,119). Um estudo recente explorando o impacto da administração oral de uma levedura de kefir (*Kazachstania turicensis*) na DA, usando um modelo animal, verificou um efeito benéfico na modulação da microbiota intestinal, bem como na resposta imune, aumentando assim o potencial do kefir como uma possível aplicação em AD (121).

Conclusion

This work provided an overview of the impact of probiotics on the gut, and their potential effects on the skin, as a gut-skin axis appears to exist. In addition, current knowledge regarding the role of probiotics in skin health was presented.

Intestinal dysbiosis promotes the occurrence of low-grade systemic chronic inflammation; hence modulation of the intestinal microbiota may represent a promising strategy for the prevention and treatment of cutaneous and non-cutaneous disease states. The use of fermented foods with probiotic activity, such as kefir, may represent an excellent nutritionally based alternative therapeutic strategy via intestinal modulation. Kefir stands out as a probiotic with potential to regulate the gut-skin axis, both for its nutritional and microbiological value, and supported by the historical safety of its consumption and its wide availability and growing popularity. However, scientific literature regarding the impact of a diet containing kefir on skin health is limited, making it essential to identify the effects of kefir in greater depth, as well as its mechanisms of action, in well-controlled human intervention studies. Thus, this review demonstrates the need for further *in vivo* studies in humans to assess the impact of traditional kefir on skin conditions both in healthy and diseased skin, particularly in individuals presenting AD.

Conflict of Interests

The editors involved in this manuscripts' authorship had no participation in the review or decision process. All authors have stated that there are no financial and/or personal relationships that could represent a potential conflict of interest.

Author Contributions Statement

CR, LMR, PR and EA: conceptualization and study design; EA: drafting; EA, PR and CR: drafting editing and reviewing.

Digno de nota, nenhum dos estudos em humanos, *in vivo*, encontrados na literatura avaliou o impacto de uma dieta contendo kefir tradicionalmente produzido, como probiótico, quer em pele saudável, quer atópica (5,112).

Conclusão

Este trabalho forneceu uma visão geral do impacto dos probióticos no intestino e dos seus potenciais efeitos na pele, dada a aparente existência de um eixo intestino-pele. Além disso, foi fornecido o estado da arte sobre o papel dos probióticos na saúde da pele.

A disbiose intestinal promove a ocorrência de inflamação crônica sistêmica de baixo grau, portanto a modulação da microbiota intestinal pode representar uma estratégia interessante para a prevenção e tratamento de estados de doença, incluindo as cutâneas. O uso de alimentos fermentados com atividade probiótica, como o kefir, pode representar uma excelente alternativa de base nutricional, como modulador intestinal. O kefir destaca-se como um probiótico com potencial para regular o eixo intestino-pele, seja pelo seu valor nutricional e microbiológico, aliado à sua segurança evidenciada pelo seu histórico de consumo humano, seja pela sua ampla disponibilidade e crescente popularidade. No entanto, a literatura ainda é escassa sobre o impacto de uma dieta contendo kefir na saúde da pele, sendo imprescindível identificar todos os envolvidos nos efeitos do kefir, bem como os seus mecanismos de ação, em estudos de intervenção humana bem controlados. Assim, esta revisão demonstra a necessidade de mais estudos *in vivo*, em humanos, sobre o impacto do kefir tradicional nas condições da pele, tanto na pele saudável quanto na doente, particularmente naquela que apresenta DA.

Conflito de interesses

Os editores envolvidos na autoria deste manuscrito não participaram do processo de revisão ou decisão. Todos os autores afirmaram que não existem relações financeiras e / ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

Declaração sobre as contribuições do autor

CR, LMR, PR e EA: conceptualização e desenho de estudo; EA: redação; EA, PR e CR: edição e revisão da redação.

References / Referências

1. Salem, I., Ramser, A., Isham, N., & Ghannoum, M. A. (2018). The gut microbiome as a major regulator of the gut-skin axis. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01459>
2. Hill, D. A., & Artis, D. (2010). Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. *Annual Review of Immunology*, *28*, 623–667. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101330>
3. Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., Fitzgerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., ... White, O. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, *486*(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
4. Clemente, J. C., Manasson, J., & Scher, J. U. (2018). The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease. *BMJ (Online)*, *360*, 1–16. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5145>
5. Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, *10*, S49–S66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>
6. Wieërs, G., Belkhir, L., Enaud, R., Leclercq, S., Philippart de Foy, J.-M., Dequenne, I., de Timary, P., & Cani, P. D. (2020). How Probiotics Affect the Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00454>
7. Frick, J.-S., & Autenrieth, I. B. (2013). The Gut Microflora and Its Variety of Roles in Health and Disease. In U. Dobrindt, J. H. Hacker, & C. Svanborg (Eds.), *Between Pathogenicity and Commensalism* (pp. 273–289). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/82_2012_217
8. La Fata, G., Weber, P., & Mohajeri, M. H. (2018). Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9322-6>
9. Wu, H. J., & Wu, E. (2012). The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*, *3*(1), 4–14. <https://doi.org/10.4161/gmic.19320>
10. David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, *505*(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
11. Simonyte Sjödin, K., Vidman, L., Rydén, P., & West, C. E. (2016). Emerging evidence of the role of gut microbiota in the development of allergic diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, *16*(4), 390–395. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000277>
12. Sonnenburg, J. L., & Bäckhed, F. (2016). Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, *535*(7610), 56–64. <https://doi.org/10.1038/nature18846>
13. Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J., & Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, *12*(2–3), 91–109. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00151-0)
14. Bourrie, B. C. T., Willing, B. P., & Cotter, P. D. (2016). The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Frontiers in Microbiology*, *7*(647). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00647>
15. Vinderola, C. G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdígón, G., Farnworth, E., & Matar, C. (2005). Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, *72*(2), 195–202. <https://doi.org/10.1017/S0022029905000828>
16. Guéniche, A., Bastien, P., Ovigne, J. M., Kermici, M., Courchay, G., Chevalier, V., Breton, L., & Castiel-Higounenc, I. (2010). Bifidobacterium longum lysate, a new ingredient for reactive skin. *Experimental Dermatology*, *19*, e1–e8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00932.x>
17. Guéniche, A., Philippe, D., Bastien, P., Reuteler, G., Blum, S., Castiel-Higounenc, I., Breton, L., & Benyacoub, J. (2014). Randomised double-blind placebo-controlled study of the effect of vbaillus paracasei NCC 2461 on skin reactivity. *Beneficial Microbes*, *5*(2), 137–145. <https://doi.org/10.3920/BM2013.0001>
18. Poutahidis, T., Kearney, S. M., Levkovich, T., Qi, P., Varian, B. J., Lakritz, J. R., Ibrahim, Y. M., Chatzigiagos, A., Alm, E. J., & Erdman, S. E. (2013). Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *PLoS ONE*, *8*(10), e78898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078898>
19. Finch, J., Munhutu, M. N., & Whitaker-Worth, D. L. (2010). Atopic dermatitis and nutrition. *Clinics in Dermatology*, *28*(6), 605–614. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.03.032>
20. Kano, M., Masuoka, N., Kaga, C., Sugimoto, S., Iizuka, R., Manabe, K., Sone, T., Oeda, K., Nonoka, C., Miyazaki, K., & Ishikawa, F. (2013). Consecutive Intake of Fermented Milk Containing Bifidobacterium breve Strain Yakult and Galacto-oligosaccharides Benefits Skin Condition in Healthy Adult Women. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, *21*(1), 33–39. <https://doi.org/10.12938/bmfh.32.33>
21. Miyazaki, K., Masuoka, N., Kano, M., & Iizuka, R. (2014). Bifidobacterium fermented milk and galacto-oligosaccharides lead to improved skin health by decreasing phenols production by gut microbiota. *Beneficial Microbes*, *5*(2), 121–128. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0066>
22. Bowe, W. P., Patel, N. B., & Logan, A. C. (2014). Acne vulgaris, probiotics and the gut-brain-skin axis: From anecdote to translational medicine. *Beneficial Microbes*, *5*(2), 185–199. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0060>
23. Ellis, S. R., Nguyen, M., Vaughn, A. R., Notay, M., Burney, W. A., Sandhu, S., & Sivamani, R. K. (2019). The skin and gut microbiome and its role in common dermatologic conditions. *Microorganisms*, *7*(11), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110550>
24. Al-Ghazzewi, F. H., & Tester, R. F. (2014). Impact of prebiotics and probiotics on skin health. *Beneficial Microbes*, *5*(2), 99–107. <https://doi.org/10.3920/BM2013.0040>
25. Friedrich, A. D., Paz, M. L., Leoni, J., & Maglio, D. H. G. (2017). Message in a bottle: Dialog between intestine and skin modulated by probiotics. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(1067), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms18061067>
26. Iemoli, E., Trabattoni, D., Parisotto, S., Borgonovo, L., Toscano, M., Rizzardini, Zg., Clerici, M., Ricci, E., Fusi, A., Vecchi, E. De, Piconi, S., & Lorenzo, D. (2012). Probiotics reduce gut microbial translocation and improve adult atopic dermatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *46*, S33–S40. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31826a8468>

27. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *11*, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
28. Iraporda, C., Abatemarco Júnior, M., Neumann, E., Nunes, Á. C., Nicoli, J. R., Abraham, A. G., & Garrote, G. L. (2017). Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: Antagonism against intestinal pathogens. *Journal of Dairy Research*, *84*, 339–345. <https://doi.org/10.1017/S0022029917000358>
29. Lew, L. C., & Liong, M. T. (2013). Bioactives from probiotics for dermal health: Functions and benefits. *Journal of Applied Microbiology*, *114*(5), 1241–1253. <https://doi.org/10.1111/jam.12137>
30. Vieira, A. T., Fukumori, C., & Ferreira, C. M. (2016). New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases. *Clinical & Translational Immunology*, *5*(6), e87–e87. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.38>
31. Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2000). Inhibitory Power of Kefir: The Role of Organic Acids. *Journal of Food Protection*, *63*(3), 364–369. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.3.364>
32. Romanin, D., Serradell, M., González Maciel, D., Lausada, N., Garrote, G. L., & Rumbo, M. (2010). Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, *140*, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.014>
33. Iraporda, C., Errea, A., Romanin, D. E., Cayet, D., Pereyra, E., Pignataro, O., Sirard, J. C., Garrote, G. L., Abraham, A. G., & Rumbo, M. (2015). Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology*, *220*(10) 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.06.004>
34. Iraporda, C., Romanin, D. E., Rumbo, M., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2014). The role of lactate on the immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction of kefir. *Food Research International*, *62*, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.003>
35. Weaver, C. T., Elson, C. O., Fouser, L. A., & Kolls, J. K. (2013). The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *8*(October 2012), 477–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130318>
36. EFSA Panel on Dietetic Products, N. and A. (NDA). (2016). Guidance on the scientific requirements for health claims related to the immune system, the gastrointestinal tract and defence against pathogenic microorganisms. *EFSA Journal*, *14*(1), 4369. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4369>
37. Swamy, M., Jamora, C., Havran, W., & Hayday, A. (2010). Epithelial decision makers: in search of the “epimune.” *Nature Immunology*, *11*(8), 656–665. <https://doi.org/10.1038/ni.1905>
38. Proksch, E., Fölster-Holst, R., Bräutigam, M., Sepelmann, M., Pfeiffer, S., & Jensen, J. M. (2009). Role of the epidermal barrier in atopic dermatitis: Academy CME. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, *7*(10), 899–911. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2009.07157.x>
39. Deng, Z., Chen, M., Xie, H., Jian, D., Xu, S., Peng, Q., Sha, K., Liu, Y., Zhang, Y., Shi, W., & Li, J. (2019). Claudin reduction may relate to an impaired skin barrier in rosacea. *The Journal of Dermatology*, *46*(4), 314–321. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14792>
40. Rusu, E., Enache, G., Cursaru, R., Alexescu, A., Radu, R., Onila, O., Cavallioti, T., Rusu, F., Posea, M., Jinga, M., & Radulian, G. (2019). Prebiotics and probiotics in atopic dermatitis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 926–931. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7678>
41. Notay, M., Foolad, N., Vaughn, A. R., & Sivamani, R. K. (2017). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for the Treatment and Prevention of Adult Dermatological Diseases. *American Journal of Clinical Dermatology*, *18*(6), 721–732. <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0300-2>
42. Gueniche, A., Knautd, B., Schuck, E., Volz, T., Bastien, P., Martin, R., Röcken, M., Breton, L., & Biedermann, T. (2008). Effects of nonpathogenic gram-negative bacterium *Vitreoscilla filiformis* lysate on atopic dermatitis: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *British Journal of Dermatology*, *159*(6), 1357–1363. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08836.x>
43. Nermes, M., Kantele, J. M., Atosuo, T. J., Salminen, S., & Isolauri, E. (2011). Interaction of orally administered *Lactobacillus rhamnosus* GG with skin and gut microbiota and humoral immunity in infants with atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, *41*, 370–377. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03657.x>
44. Drago, L., Iemoli, E., Rodighiero, V., Nicola, L., De Vecchi, E., & Piconi, S. (2011). Effects of *Lactobacillus Salivarius* LS01 (DSM 22775) Treatment on Adult Atopic Dermatitis: A Randomized Placebo-Controlled Study. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *24*(4), 1037–1048. <https://doi.org/10.1177/039463201102400421>
45. Lew, L. C., Gan, C. Y., & Liong, M. T. (2013). Dermal bioactives from *lactobacilli* and *bifidobacteria*. *Annals of Microbiology*, *63*(3), 1047–1055. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0561-1>
46. Lolou, V., & Panayiotidis, M. I. (2019). Functional role of probiotics and prebiotics on skin health and disease. *Fermentation*, *5*(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/fermentation5020041>
47. Lee, S.-Y., Lee, E., Park, Y. M., & Hong, S. J. (2018). Gut-Skin Axis in Atopic Dermatitis. *Allergy, Asthma, and Immunology Research*, *10*(4), 354–362. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6021588/pdf/aa10-354.pdf>
48. Rather, I. A., Bajpai, V. K., Kumar, S., Lim, J., Paek, W. K., & Park, Y. H. (2016). Probiotics and atopic dermatitis: An overview. *Frontiers in Microbiology*, *7*(APR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00507>
49. Lise, M., Mayer, I., & Silveira, M. (2018). Use of probiotics in atopic dermatitis. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, *64*(11), 997–1001. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.11.997>
50. Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenbergh, L. P. S., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, *6*(1177). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01177>

51. Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. D. C. G. (2017). Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, *30*(1), 82–96. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>
52. Huseini, H. F., Rahimzadeh, G., Fazeli, M. R., Mehrazma, M., & Salehi, M. (2012). Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burns*, *38*, 719–723. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2011.12.005>
53. Rerknimitr, P., Otsuka, A., Nakashima, C., & Kabashima, K. (2018). Skin Barrier Function and Atopic Dermatitis. *Current Dermatology Reports*, *7*(4), 209–220. <https://doi.org/10.1007/s13671-018-0232-y>
54. Stefanovic, N., Irvine, A. D., & Flohr, C. (2021). The Role of the Environment and Exposome in Atopic Dermatitis. *Current Treatment Options in Allergy*, *8*, 222–241. <https://doi.org/10.1007/s40521-021-00289-9>
55. Kim, D. W., Park, J. Y., Na, G. Y., Lee, S. J., & Lee, W. J. (2006). Correlation of clinical features and skin barrier function in adolescent and adult patients with atopic dermatitis. *International Journal of Dermatology*, *45*(6), 698–701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2005.02644.x>
56. Kim, J., Kim, B. E., & Leung, D. Y. M. (2019). Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy and Asthma Proceedings*, *40*(2), 84–92. <https://doi.org/10.2500/aap.2019.40.4202>
57. Kim, B. E., & Leung, D. Y. M. M. (2018). Significance of Skin Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, *10*(3), 207–215. <https://doi.org/10.4168/aa.2018.10.3.207>
58. Koga, C., Kabashima, K., Shiraiishi, N., Kobayashi, M., & Tokura, Y. (2008). Possible Pathogenic Role of Th17 Cells for Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, *128*(11), 2625–2630. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.111>
59. Makrgeorgou, A., Leonardi-Bee, J., Bath-Hextall, F. J., Murrell, D. F., Tang, M. L. K., Roberts, A., & Boyle, R. J. (2018). Probiotics for treating eczema. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2018*(11). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006135.pub3>
60. Kim, H.-J., Kim, Y.-J., Kang, M.-J., Seo, J.-H., Kim, H.-Y., Jeong, S. K., Lee, S.-H., Kim, J.-M., & Hong, S.-J. (2012). A novel mouse model of atopic dermatitis with epicutaneous allergen sensitization and the effect of *Lactobacillus rhamnosus*. *Experimental Dermatology*, *21*(9), 672–675. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01539.x>
61. Kim, S. O., Ah, Y. M., Yu, Y. M., Choi, K. H., Shin, W. G., & Lee, J. Y. (2014). Effects of probiotics for the treatment of atopic dermatitis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, *113*(2), 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2014.05.021>
62. Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N., & Garrett, W. S. (2013). The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic T&sub>H&sub>17&sub> Cell Homeostasis. *Science*, *341*(6145), 569 LP – 573. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>
63. Fang, Z., Lu, W., Zhao, J., Zhang, H., Qian, L., Wang, Q., & Chen, W. (2020). Probiotics modulate the gut microbiota composition and immune responses in patients with atopic dermatitis: a pilot study. *European Journal of Nutrition*, *59*(5), 2119–2130. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02061-x>
64. Garcia-Larsen, V., Ierodiakonou, D., Jarrold, K., Cunha, S., Chivinge, J., Robinson, Z., Geoghegan, N., Ruparelia, A., Devani, P., Trivella, M., Leonardi-Bee, J., & Boyle, R. J. (2018). Diet during pregnancy and infancy and risk of allergic or autoimmune disease: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Medicine*, *15*(2), e1002507. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002507>
65. Zhao, M., Shen, C., & Ma, L. (2018). Treatment efficacy of probiotics on atopic dermatitis, zooming in on infants: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Dermatology*, *57*(6), 635–641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijd.13873>
66. Huang, R., Ning, H., Shen, M., Li, J., Zhang, J., & Chen, X. (2017). Probiotics for the Treatment of Atopic Dermatitis in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 392. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00392>
67. Pelucchi, C., Chatenoud, L., Turati, F., Galeone, C., Moja, L., Bach, J.-F., & La Vecchia, C. (2012). Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, *23*(3), 402–414. <https://doi.org/10.1097/ede.0b013e31824d5da2>
68. Doege, K., Grajecki, D., Zyriak, B.-C., Detinkina, E., zu Eulenburg, C., & Buhling, K. J. (2012). Impact of maternal supplementation with probiotics during pregnancy on atopic eczema in childhood – a meta-analysis. *British Journal of Nutrition*, *107*(1), 1–6. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0007114511003400>
69. Petersen, E. B. M., Skov, L., Thyssen, J. P., & Jensen, P. (2018). Role of the gut microbiota in atopic dermatitis: A systematic review. *Acta Dermato-Venerologica*, *99*(1), 5–11. <https://doi.org/10.2340/00015555-3008>
70. Kim, J., & Kim, H. (2019). Microbiome of the Skin and Gut in Atopic Dermatitis (AD): Understanding the Pathophysiology and Finding Novel Management Strategies. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(4), 444. <https://doi.org/10.3390/jcm8040444>
71. O'Neill, C. A., Monteleone, G., McLaughlin, J. T., & Paus, R. (2016). The gut-skin axis in health and disease: A paradigm with therapeutic implications. *BioEssays*, *38*(11), 1167–1176. <https://doi.org/10.1002/bies.201600008>
72. Matsumoto, M., Ebata, T., Hirooka, J., Hosoya, R., Inoue, N., Itami, S., Tsuji, K., Yaginuma, T., Muramatsu, K., Nakamura, A., Fujita, A., & Nagakura, T. (2014). Antipruritic effects of the probiotic strain LKM512 in adults with atopic dermatitis. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, *113*(2), 209–216.e7. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2014.05.002>
73. Yoshida, Y., Seki, T., Matsunaka, H., Watanabe, T., Shindo, M., Yamada, N., & Yamamoto, O. (2010). Clinical effects of probiotic *bifidobacterium breve* supplementation in adult patients with atopic dermatitis. *Yonago Acta Medica*, *53*(2), 37–45. <https://ci.nii.ac.jp/naid/120002260982>
74. Roessler, A., Friedrich, U., Vogelsang, H., Bauer, A., Kaatz, M., Hipler, U. C., Schmidt, I., & Jahreis, G. (2008). The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. *Clinical and Experimental Allergy*, *38*(1), 93–102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02876.x>
75. Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., & Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *28*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000186>
76. Garrote, G. L., Abraham, A., & De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, *68*(4), 639–652. <https://doi.org/10.1017/S0022029901005210>

77. Otles, S., & Cagindi, O. (2003). Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2), 54–59. <https://doi.org/10.3923/pjn.2003.54.59>
78. Food and Drug Administration. (2016). Food Draft Guidance for Industry : Dietary Supplements : New Dietary Ingredient Notifications and Related Issues. In *Center for Food Safety and Applied Nutrition*. <https://www.fda.gov>
79. Vardjan, T., Mohar Lorbeg, P., Rogelj, I., & Čanžek Majhenič, A. (2013). Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 96, 1–8. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5829>
80. Sarkar, S. (2008). Biotechnological innovations in kefir production: a review. *British Food Journal*, 110(3), 283–295. <https://doi.org/10.1108/00070700810858691>
81. Farnworth, E. R. (2005). Kefir - a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2(1), 1–17. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.13938>
82. Leite, A. M. O., Leite, D. C. A., Del Aguila, E. M., Alvares, T. S., Peixoto, R. S., Miguel, M. A. L., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4149–4159. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6263>
83. Londero, A., Hamet, M. F., De Antoni, G. L., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2012). Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. *Journal of Dairy Research*, 79(3), 262–271. <https://doi.org/10.1017/S0022029912000179>
84. Nielsen, B., Gürakan, G. C., & Ünlü, G. (2014). Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6, 123–135. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9168-0>
85. Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (1998). Characteristics of kefir prepared with different grain:milk ratios. *Journal of Dairy Research*, 65(1), 149–154. <https://doi.org/10.1017/S0022029997002677>
86. Codex Alimentarius International Food Standards. (2018). *Codex standard for fermented milks (Codex Stan CXS 243-2003)* (CAC (ed.)). World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/en/>
87. Alves, E., Ntungwe, E. N., Gregório, J., Rodrigues, L. M., Pereira-Leite, C., Caleja, C., Pereira, E., Barros, L., Aguilár-Vilas, M. V., Rosado, C., & Rijo, P. (2021). Characterization of kefir produced in household conditions: Physicochemical and nutritional profile, and storage stability. *Foods*, 10(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/foods10051057>
88. Hertzler, S. R., & Clancy, S. M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(5), 582–587. <https://doi.org/10.1053/jada.2003.50111>
89. Rimada, P. S., & Abraham, A. G. (2006). Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels. *International Dairy Journal*, 16, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.002>
90. Guzel-Seydim, Z., Kok-Tas, T., Ertekin-Filiz, B., & Seydim, A. C. (2011). Effect of different growth conditions on biomass increase in kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 94(3), 1239–1242. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3349>
91. Rattray, F. P., & O’Connell, M. J. (2011). Fermented Milks - Kefir. In M. P. Fuquay JW, Fox, PF (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. (pp. 518–524). Academic Press Inc.
92. Kesenkaş, H., Gürsoy, O., & Özbaş, H. (2016). Kefir. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00014-5>
93. Hsu, Y. J., Huang, W. C., Lin, J. S., Chen, Y. M., Ho, S. T., Huang, C. C., & Tung, Y. T. (2018). Kefir supplementation modifies gut microbiota composition, reduces physical fatigue, and improves exercise performance in mice. *Nutrients*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/nu10070862>
94. Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., & Li, T. (2010). Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: Potential significance to the enhancement of kombucha function. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169, 446–455. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8361-6>
95. Guzel-Seydim, Z. B., Kok-Tas, T., Greene, A. K., & Seydim, A. C. (2011). Review: Functional Properties of Kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 261–268. <https://doi.org/10.1080/10408390903579029>
96. Üstün-Aytekin, Ö., Şeker, A., & Arısoy, S. (2020). The effect of *in vitro* gastrointestinal simulation on bioactivities of kefir. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 283–292. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14274>
97. Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2000). Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. *Journal of Food Protection*, 63(3), 364–369. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.3.364>
98. Slattery, C., Cotter, P. D., & O’Toole, P. W. (2019). Analysis of health benefits conferred by Lactobacillus species from kefir. *Nutrients*, 11(6), 1–24. <https://doi.org/10.3390/nu11061252>
99. Liu, J. R., Chen, M. J., & Lin, C. W. (2005). Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2467–2474. <https://doi.org/10.1021/jf048934k>
100. Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S., & Kitamura, S. (2004). Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *BioFactors*, 22(1–4), 197–200. <https://doi.org/10.1002/biof.5520220141>
101. Huang, Y., Wang, X., Wang, J., Wu, F., Sui, Y., Yang, L., & Wang, Z. (2013). Lactobacillus plantarum strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *Journal of Dairy Science*, 96, 2746–2753. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6123>
102. Rodrigues, K. L., Caputo, L. R., Carvalho, J. C., Evangelista, J., & Schneedorf, J. M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 404–408. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.020>
103. Carasi, P., Racedo, S. M., Jacquot, C., Romanin, D. E., Serradell, M. A., & Urdaci, M. C. (2015). Impact of kefir derived lactobacillus kefiri on the mucosal immune response and gut microbiota. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/361604>
104. Hatmal, M. M., Nuirat, A., Zihlif, M. A., & Taha, M. O. (2018). Exploring the influence of culture conditions on kefir’s anticancer properties. *Journal of Dairy Science*, 101(5). <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13539>

105. Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., & Garrote, G. L. (2014). Yeasts from kefir grains: Isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9>
106. Golowcycz, M. A., Gugliada, M. J., Hollmann, A., Delfederico, L., Garrote, G. L., Abraham, A. G., Semorile, L., & De Antoni, G. (2008). Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: Potential use as probiotic. *Journal of Dairy Research*, 75, 211–217. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003117>
107. Fathi, Y., Faghih, S., Zibaenezhad, M. J., & Tabatabaei, S. H. R. (2016). Kefir drink leads to a similar weight loss, compared with milk, in a dairy-rich non-energy-restricted diet in overweight or obese premenopausal women: a randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*, 55(1). <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0846-9>
108. Bengoa, A. A., Iraporda, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2019). Kefir microorganisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology*, 126(3), 686–700. <https://doi.org/10.1111/jam.14107>
109. Pražnikar, Z. J., Kenig, S., Vardjan, T., Bizjak, M. Č., & Petelin, A. (2020). Effects of kefir or milk supplementation on zonulin in overweight subjects. *Journal of Dairy Science*, 103(5), 3961–3970. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17696>
110. Ogawa, M., Saiki, A., Matsui, Y., Tsuchimoto, N., Nakakita, Y., Takata, Y., & Nakamura, T. (2016). Effects of oral intake of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 (SBL88™) on dry skin conditions: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(6), 3863–3872. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3862>
111. Alves, E., Rijo, P., Rodrigues, L. M., & Rosado, C. (2021). Acceptability of kefir produced by fermentation of Portuguese milk with CIDCA AGK1 grains in a sample of Portuguese consumers. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 18(1), 1–9. <https://doi.org/10.19277/BBR.18.1.252>
112. Dimidi, E., Cox, S., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented Foods : Definitions and Characteristics , Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*, 11(1806), 1–26.
113. Dallas, D., Citerne, F., Tian, T., Silva, V., Kalanetra, K., Frese, S., Robinson, R., Mills, D., & Barile, D. (2016). Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. *Food Chemistry*, 197(0 0), 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.116>
114. Tung, Y. T., Chen, H. L., Wu, H. S., Ho, M. H., Chong, K. Y., & Chen, C. M. (2018). Kefir Peptides Prevent Hyperlipidemia and Obesity in High-Fat-Diet-Induced Obese Rats via Lipid Metabolism Modulation. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62(3). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700505>
115. Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., & Afreen, A. (2013). Kefir and Health: A Contemporary Perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 422–434. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.540360>
116. Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., & Song, S. (2008). Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.06.011>
117. Hamet, M. F., Medrano, M., Pérez, P. F., & Abraham, A. G. (2016). Oral administration of kefir exerts a bifidogenic effect on BALB/c mice intestinal microbiota. *Beneficial Microbes*, 7(2), 237–246. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0103>
118. Serafini, F., Turrone, F., Ruas-Madiedo, P., Lugli, G. A., Milani, C., Duranti, S., Zamboni, N., Bottacini, F., van Sinderen, D., Margolles, A., & Ventura, M. (2014). Kefir fermented milk and kefir promote growth of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 and modulate its gene expression. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.024>
119. Rodrigues, K. L., Carvalho, J. C. T., & Schneedorf, J. M. (2005). Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. *Inflammopharmacology*, 13(5–6), 485–492. <https://doi.org/10.1163/156856005774649395>
120. Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Nan, B., Liu, Y., & Wang, Z. (2015). Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 43, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.10.004>
121. Kim, J. H., Kim, K., Kanjanasuntree, R., & Kim, W. (2019). *Kazachstania turicensis* CAU Y1706 ameliorates atopic dermatitis by regulation of the gut–skin axis. *Journal of Dairy Science*, 102(4), 2854–2862. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15849>
122. Bekar, O., Yilmaz, Y., & Gulten, M. (2010). Kefir Improves the Efficacy and Tolerability of Triple Therapy in Eradicating *Helicobacter pylori*. *Journal of Medicinal Food*, 14(4), 344–347. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0099>
123. Maki, R., Matsukawa, M., Matsuduka, A., Hashinaga, M., Anai, H., Yamaoka, Y., Hanada, K., & Fujii, C. (2018). Therapeutic effect of lyophilized, Kefir-fermented milk on constipation among persons with mental and physical disabilities. *Japan Journal of Nursing Science*, 15(3), 218–225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jjns.12189>
124. Kim, D. H., Jeong, D., Kim, H., & Seo, K. H. (2019). Modern perspectives on the health benefits of kefir in next generation sequencing era: Improvement of the host gut microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(11), 1782–1793. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1428168>
125. Azizi, N. F., Kumar, M. R., Yeap, S. K., Abdullah, J. O., Khalid, M., Omar, A. R., Osman, M. A., Mortadza, S. A. S., & Alitheen, N. B. (2021). Kefir and its biological activities. *Foods*, 10(6), 1–26. <https://doi.org/10.3390/foods10061210>
126. Bellikci-Koyu, E., Sarer-Yurekli, B. P., Akyon, Y., Aydin-Kose, F., Karagozlu, C., Ozgen, A. G., Brinkmann, A., Nitsche, A., Ergunay, K., Yilmaz, E., & Buyuktuncer, Z. (2019). Effects of Regular Kefir Consumption on Gut Microbiota in Patients with Metabolic Syndrome: A Parallel-Group, Randomized, Controlled Study. *Nutrients*, 11(9), 2089. <https://doi.org/10.3390/nu11092089>
127. Peluzio, M. do C. G., Dias, M. de M. e., Martinez, J. A., & Milagro, F. I. (2021). Kefir and Intestinal Microbiota Modulation: Implications in Human Health. *Frontiers in Nutrition*, 8(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.638740>
128. Stiemsma, L. T., Nakamura, R. E., Nguyen, J. G., & Michels, K. B. (2020). Does Consumption of Fermented Foods Modify the Human Gut Microbiota? *Journal of Nutrition*, 150(7), 1680–1692. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa077>

Photoplethysmography in dogs: identification of spectral elements and application in a surgical setting

Fotoplethysmografia em cães: identificação dos elementos espectrais e aplicação em ambiente cirúrgico

Rui Assunção^{1,2}, Clemente Rocha³, Luis Lobo^{1,2}, Luís Monteiro Rodrigues³, João Requicha^{1,4*}

¹Faculty of Veterinary Medicine, University Lusófona, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ²Hospital Veterinário do Porto, Tv. de Silva Porto 174, 4250-475 Porto, Portugal; ³CBiOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, University Lusófona, School of Health Sciences & Technologies, Av. Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ⁴CECAV - Veterinary and Animal Research Centre and AL4Animals, Department of Veterinary Sciences, University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal

*corresponding author / autor para correspondência: jfrequicha@utad.pt

Abstract

This pilot study aimed to assess cardiac and respiratory activity in dogs using photoplethysmography (PPG) during the presurgical period and to determine the spectral elements composing the measured PPG signal. The studied sample comprised four dogs, two males and two females, ranging from 7 months to 6 years old, from different breeds under anesthetic premedication. PPG signal was obtained at the tail using a PPG sensor connected to a Bitalino hardware board (Plux, Portugal) before and after premedication with 5 µg/kg dexmedetomidine and 0.35 mg/kg methadone by intramuscular injection. The data obtained was analyzed using Matlab (MathWorks, USA) and the PPG signal decomposed into its various frequencies by the Wavelet transform. The estimated minimum and maximum values of heart and respiratory activity were then identified. Seven waves were found. Correspondence with the cardiac and respiratory activities was determined after comparing its frequency with the normal heart and respiratory frequencies in dogs. This study demonstrated that the PPG technique is a valuable diagnostic tool to record both heart and respiratory frequencies in a clinical setting using a wireless system.

Keywords: dog, respiratory rate, heart rate, photoplethysmography, anesthesia, Wavelet transform

Resumo

Este estudo piloto teve como objetivos caracterizar através da fotoplethysmografia (FPG) a atividade cardíaca e respiratória no cão durante o período pré-cirúrgico e identificar os elementos espectrais que constituem esse sinal. A amostra em estudo incluiu quatro cães de diferentes raças, dois machos e duas fêmeas, entre os 7 meses e 6 anos de idade, submetidos a pré-medicação anestésica. O sinal de FPG foi obtido na cauda com um sensor de FPG ligado à placa hardware Bitalino (Plux, Portugal), antes e após pré-medicação com uma combinação de 5 µg/kg de dexmedetomidina e 0,35 mg/kg de metadona por via intramuscular. Os dados recolhidos foram analisados com recurso ao programa Matlab (MathWorks, EUA) e o sinal de FPG decomposto nas frequências que o constituem através da transformada de Wavelet. Posteriormente estimámos os valores máximos e mínimos das atividades cardíaca e respiratória. Encontrámos sete ondas estabelecidas em função da correspondência com as atividades cardíaca e respiratória normais do cão. Este ensaio permitiu demonstrar que a FPG é um instrumento de diagnóstico valioso para registar as frequências cardíaca e respiratória em ambiente clínico com recurso de um aparelho sem-fios.

Palavras-chave: cão, frequência respiratória, frequência cardíaca, fotoplethysmografia, anestesia, transformada de Wavelet

Received / Recebido: 05/08/2021

Accepted / Aceite: 21/11/2021

Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

Wearable technology is already an integrative component of human and life sciences. In dogs, as in many other companion and working animals, wearable monitoring helps to obtain objective measurements in natural home settings, rather than relying on more subjective assessments of owners (1).

Photoplethysmography (PPG) is a non-invasive technique (2) with a wide range of clinical applications, being used in several devices, such as pulse oximeters and blood pressure detection systems (3). The PPG signal reflects changes in blood volume in the cutaneous and subcutaneous vascular plexus (3,4), having a major component associated with heartbeat and respiration and others associated with low frequency influencers (5). Using signal analysis programs, it is possible to investigate the PPG signal and characterize its various constituents at the different frequencies of the PPG signal (3). In this way, the fluctuations associated with the cardiovascular, respiratory, and neuronal systems can be properly characterized and measured within the PPG signal (6). In 2013, Nilsson described the various frequencies found in PPG signals in humans, using the wavelet method to decompose a primary signal into its various elements (7).

In veterinary medicine, as of this writing, there is no data available on the frequency range of the various constituents of the PPG signal in the dog. However, it is possible to assume that the frequencies referring to cardiac and respiratory activities have higher frequency ranges, as in dogs (as reported by Houston in 2000), the heart rate might vary between 60 and 140 beats per minute (bpm), that is, between 1 and 2.3 Hz. Likewise, the respiratory rate might vary between 18 and 36 breaths per minute (rpm), that is, between 0.3 and 0.6 Hz (8).

In the present study, the potential utility of the reflection PPG sensor was investigated in a veterinary surgical setting. Pulse wave data collected before and after the administration of sedative medication was obtained from the tails of dogs and analyzed.

Introdução

A tecnologia sem fios é já um dado adquirido nas ciências da vida com aplicação direta em humanos. Em cães, como em muitos outros animais de companhia e de trabalho, a monitorização adaptável ao corpo do animal ajuda a obter medições objectivas em ambientes domésticos naturais, em vez de depender de avaliações mais subjectivas dos proprietários (1).

A fotopleletismografia (FPG) é um método não invasivo (2) com uma vasta aplicabilidade, incluindo a monitorização anestésica, sendo usada em diversos sensores, como por exemplo, em pulsioxímetros e esfigmomanómetros (3). O sinal de FPG reflete mudanças no volume sanguíneo de vasos periféricos do plexo vascular cutâneo e subcutâneo (3,4) especialmente determinado pelo batimento cardíaco e pela respiração, para além doutros componentes (5). Com recurso a programas de análise de sinal, é possível estudar o sinal de FPG e caracterizar os seus vários constituintes nas suas diferentes frequências (3). Desta forma, flutuações de onda associadas às actividades cardíaca, respiratória e neuronal podem ser descritas e quantificadas (6). Nilson (2013) descreveu, em humanos, as várias frequências que podem ser encontradas no sinal de FPG com recurso ao método de transformada de Wavelet que permite decompor um sinal primário nos seus vários constituintes (7).

Em medicina veterinária, não há até à data, dados relativos aos intervalos de frequência dos constituintes do sinal de FPG no cão, no entanto é possível assumir que as actividades cardíaca e respiratória do sinal de FPG têm intervalos de frequência elevados. De acordo com Houston (2000), a frequência cardíaca em cães pode variar entre 60 e 140 batimentos por minuto (bpm), isto é, entre 1,0 e 2,3 Hz enquanto que a frequência respiratória pode variar entre 18 e 36 respirações por minuto (rpm), isto é, entre 0,3 e 0,6 Hz (8).

No presente estudo investigámos o potencial interesse de utilização da FPG em ambiente cirúrgico. Os dados das ondas de pulso recolhidos na cauda de cães antes e depois da administração de medicamentos sedativos foram obtidos e analisados.

Materials and Methods

This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of Lusófona University (Lisbon).

Four dogs age ranging from 7 months to 6 years old (4 ± 2.8 years), different breeds (Dalmatian, Golden Retriever, Portuguese Retriever, mixed breed), with body weights between 15-29 kg (20 ± 7.8 kg) and from different genders (two males and two females) were studied.

For each dog, we performed a trichotomy of a small area in the ventral part of the tail in order to improve the contact between the sensor and the skin (Figure 1); the choice of the tail as study site was due to ease of access and comfort for the animal. Data collection was carried out for 3 to 5 minutes followed by preanesthetic medication using 0.35 mg/kg methadone (Semfortan, Esteve, Spain) and 5 μ g/kg dexmedetomidine (Dextomitor, Zoetis, USA) by intramuscular injection. After a waiting period of between 15 and 30 minutes to ensure the expected (sedative) effect of the medication, the PPG signal was collected again in the same anatomical region. The data was obtained with a PPG sensor connected to a Bitalino hardware (Plux, Portugal) (Figure 1), and later downloaded to the OpenSignals (r)evolution software (beta version v.2015) of Bitalino. Finally, data was analyzed using the MatLab software (MathWorks Inc, v. R2016a, USA) after selecting the column of obtained values and following the visualization of the corresponding pulse wave (Figures 2 and 3).

Materiais e Métodos

Este estudo foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona (Lisboa).

A amostra estudada foi composta por quatro cães com idades compreendidas entre 7 meses e 6 anos de idade ($4 \pm 2,8$ anos), de diferentes raças (Dálmata, Golden Retriever, Perdigueiro Português e sem raça definida), com pesos vivos entre 15 e 29 kg ($20 \pm 7,8$ kg), e de diferentes géneros (dois machos e duas fêmeas).

Em cada cão, procedeu-se à tricotomia de uma pequena área na região ventral da cauda, de forma a melhorar o contacto entre o sensor e a pele do animal (Figura 1); a escolha da cauda como local de estudo prende-se com a facilidade de acesso e conforto para o animal. No mesmo momento, foi realizada uma recolha de dados durante 3 a 5 minutos, sendo posteriormente efetuada a medicação pré-anestésica com o recurso a 0,35 mg/kg metadona (Semfortan, Esteve, Espanha) e 5 μ g/kg dexmedetomidina (Dexdomitor, Zoetis, EUA) através de injeção intramuscular. Após um período de cerca de 15 a 30 minutos de espera para efeito (sedativo) da medicação, os dados de FPG foram novamente recolhidos na mesma localização anatómica. Os dados foram obtidos com um sensor de FPG conectado a uma placa de *hardware* Bitalino (Plux, Portugal) (Figura 1). Depois, os sinais foram transferidos para o programa OpenSignals (r)evolution software (beta version v. 2015) da Bitalino e avaliados com recurso ao *software* MathLab (MathWorks Inc, v. R2016a, EUA), após seleção da coluna de dados obtidos e após visualização da onda de pulso correspondente (Figuras 2 e 3).

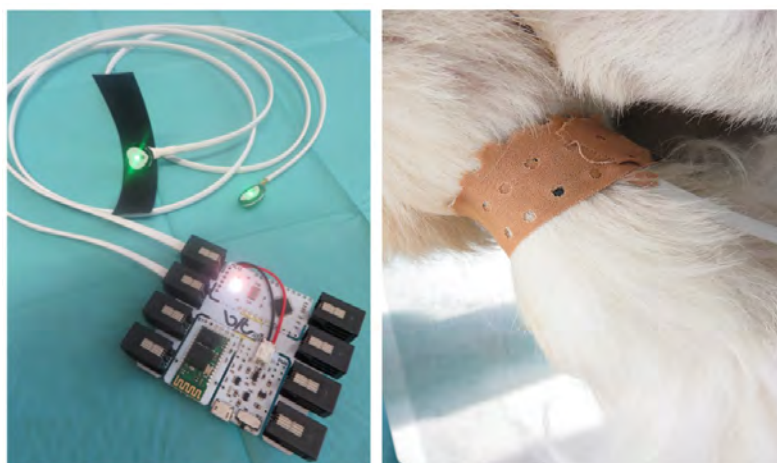


Figure 1 - *Left*, Bitalino equipment (Plux, Portugal), including the Bitalino hardware board and the respective sensors. *Right*, fixation of sensors on a dog's tail.

Figura 1 - *Esqda*, Equipamento Bitalino (Plux, Portugal), incluindo a placa de hardware Bitalino e os respectivos sensores. *Drt*, fixação dos sensores na cauda de um cão.

After selecting the data to be analyzed, the code 1 (see Appendix, taken from <http://noc.ac.uk/using-science/crosswavelet-wavelet-coherence>) was applied, which identified the maximum amplitude peaks for each wave. The next step was to create an artificial sine signal to obtain an expression of conversion of periods into frequency. Thus, a sine equation with known frequencies was created in code 2 (line b). Later a trend line was created and translated by the following equation $y = 49.416e-0.057x$; $R^2 = 0.9999$.

After the creation of the artificial sine signal, the Wavelet transform for the PPG signal was calculated. Using code 3, the Wavelet transform decomposes the signal into a periodogram resuming all different frequency components (Figure 2). With the minimum and maximum period of each wave obtained in the periodogram, we were able to obtain, minimum and maximum frequencies for each wave using the described equation. Replacing the value of x in the equation with the period value and then multiplying by 60, we obtained the activity value per minute of each wave in the periodogram.

The protocols mentioned above were applied to each animal in all records obtained before and after administration of medication.

Após identificação dos dados a analisar, foi aplicado o código 1 (ver Apêndice, obtido de <http://noc.ac.uk/using-science/crosswavelet-wavelet-coherence>) com o objetivo de identificar o pico de amplitude máxima de cada onda. O passo seguinte foi criar um sinal artificial seno, de forma a obter uma expressão de conversão de período em frequência. Assim sendo, uma equação seno com frequências conhecidas foi criada utilizando o código 2 (linha b). De seguida, uma linha de tendência foi criada e traduzida pela seguinte equação $y = 49,416e-0,057x$; $R^2 = 0,9999$.

Depois de gerarmos o sinal artificial seno, calculámos a transformada de Wavelet. Utilizando o código 3, a transformada de Wavelet decompôs o sinal primário num periodograma contendo as varias frequências dos diferentes componentes que o constituem (Figura 2).

Finalmente, foi calculado o período mínimo e máximo de cada onda do periodograma, através da equação previamente descrita. Os valores de frequência mínimos e máximos de cada onda foram obtidos, após substituir o valor de x na equação pelo valor de período de cada onda e, de seguida, multiplicando o resultado por 60, foi obtido o valor de atividade por minuto de cada onda do periodograma.

O protocolo supracitado foi realizado para todos os registos obtidos antes e depois da pré-medicação e, individualmente, para cada animal.

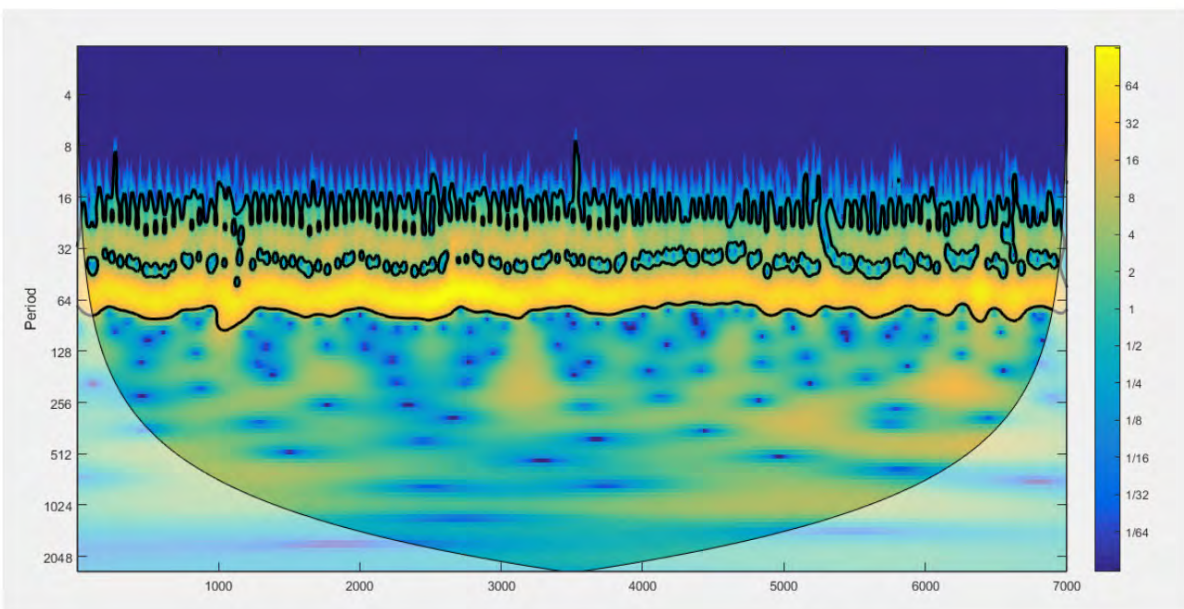


Figure 2 - Example of a Wavelet transform map (periodogram) obtained from the PPG signal in a dog.

Figura 2 - Exemplo dum mapa da transformada de Wavelet (periodograma) obtido do sinal de FPG num cão.

Results

Figure 3 shows an original PPG signal and the respective decomposition by the Wavelet transform analysis.

The maximum and minimum frequencies of each wave of the different animals analyzed before medication were, respectively: wave 1 - 3.11 and 9.43 Hz; wave 2 - 1.18 and 3.00 Hz; wave 3 - 0.57 and 0.97 Hz; wave 4 - 0.23 and 0.44 Hz; wave 5 - 0.12 and 0.21 Hz; wave 6 (registered only in three animals) - 0.09 and 0.14 Hz and wave 7 (registered only in two animals) - 0.04 and 0.09 Hz. The PPG wave-frequencies obtained after administration of medication were: wave 1 - between 1 - 2.04 and 7.55 Hz; wave 2 - 0.86 and 2.04 Hz; wave 3 - 0.28 and 0.71 Hz; wave 4 - 0.12 and 0.26 Hz; wave 5 - 0.07 and 0.12 Hz and wave 6 (only one animal) between -0.08 and 0.10 Hz.

Resultados

A Figure 3 mostra o sinal bruto da FPG e a respectiva decomposição pela análise da transformada de Wavelet.

As médias de valores de frequência máxima e mínima de cada onda constituinte do sinal de FPG antes da pré-medicação foram, respectivamente, as seguintes: onda 1 - 3,11 e 9,43 Hz; onda 2 - 1,18 e 3,00 Hz; onda 3 - 0,57 e 0,97 Hz; onda 4 - 0,23 e 0,44 Hz; onda 5 - 0,12 e 0,21 Hz; onda 6 (registada em apenas três animais) - 0,09 e 0,14 Hz e onda 7 (registada em apenas dois animais) - 0,04 e 0,09 Hz. As frequências de onda obtidas no sinal de FPG após a pré-medicação foram: onda 1 - 2,04 e 7,55 Hz; onda 2 - 0,86 e 2,04 Hz; onda 3 - 0,28 e 0,71 Hz; onda 4 - 0,12 e 0,26 Hz; onda 5 - 0,07 e 0,12 Hz e onda 6 - 0,08 e 0,10 Hz (apenas em um animal).

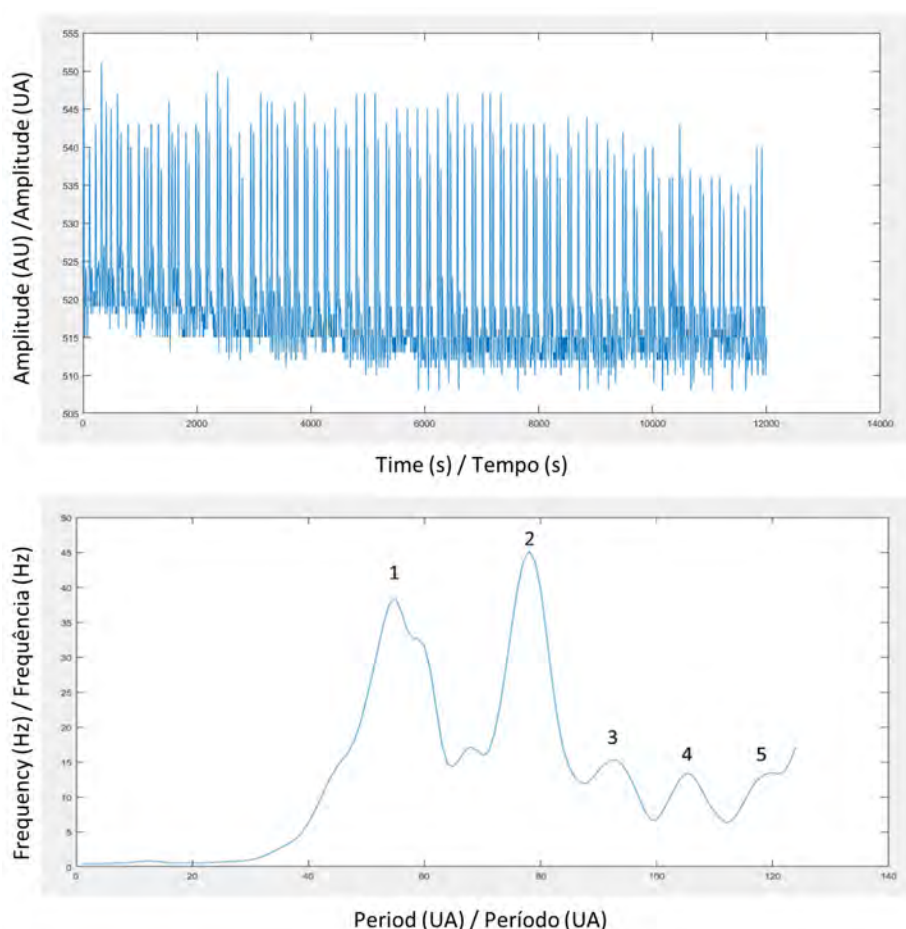


Figure 3 - *Top*, representation of the original photoplethysmography signal. *Bottom*, periodogram obtained from the Wavelet transform of the original signal. In this example five different waves, corresponding to different frequency intervals were identified (see text). The abscissa axis represents the period in arbitrary units. In this example, only five waves were identified.

Figura 3 - *Em cima*, registro original da onda de fotopletiemografia. *Em baixo*, o periodograma obtido com a transformada de Wavelet depois de aplicada ao sinal original. Neste exemplo, foram identificados cinco diferentes intervalos de frequência (veja o texto). A abscissa representa o período em unidades arbitrárias. Neste exemplo, apenas cinco ondas foram identificadas.

Discussion

This study illustrated, for the first time, the use of PPG as a monitoring technology for heart and respiratory rates in dogs in a surgical setting in veterinary medical practice, as well as the characterization of the different frequency waveforms present in the PPG signal.

Seven frequency waves were identified in these signals. Based on previous reports conducted in humans, rats and mice (6,9), taking also into account the normal heart and respiratory rates in dogs, we assumed that the different frequency waveforms were related to (in descending order of frequency averages): (i) the harmonic of cardiac activity (1st wave, between 3.11 and 9.43 Hz), (ii) cardiac activity (2nd wave, between 1.18 and 3.00 Hz), (iii) respiratory activity (3rd and 4th waves, between 0.57 and 0.97 Hz and 0.23 and 0.44 Hz, respectively), (iv) afferent vagal activity (5th and 6th waves, between 0.12 and 0.21 Hz and 0.09 and 0.14 Hz, respectively) and (v) to sympathetic tone groundings (7th wave, between 0.04 and 0.09 Hz).

After the administration of the sedative medication, a decrease in the values for cardiac and respiratory activity and a decrease in the mean frequency of each wave were clear within the PPG signal. In medical practice, the utility of PPG in determining cardiac and respiratory rates are widely recognized (7,10). In veterinary medicine, as far as our current knowledge goes, only one study has associated PPG with respiratory rate (11). Differences found regarding respiratory activity before and after administration of medication were not statistically significant, although a slight decrease in maximum respiratory activity and a (larger) decrease in minimum respiratory activity were detected. However, the purpose of this exploratory study was to test the applicability of this technology in the present setting, and in our opinion this goal was achieved.

We recognize the limitations involved in our study, including the small dimension of the sample used, the inter-individual variability, and the difficulty in selecting the ideal anatomical site for placing the sensor. Clearly, additional prospective animal studies are needed to validate the PPG technique in the present setting. Nevertheless, taking into account these results and our experience, for future studies we foresee (i) to include to a larger and more homogeneous population in terms of breed, age or live weight of the animals, in a way to reduce experimental bias, (ii) to use different anatomical sites, such as the ear or the extremities of the thoracic and pelvic limbs, (iii) to increase the duration of data collection to limit associated with animal movement

Discussão

Este estudo desenvolvido pela primeira vez em clínica veterinária, permitiu utilizar esta tecnologia como método de monitorização das frequências cardíaca e respiratória no cão em ambiente cirúrgico e, ao mesmo tempo, caracterizar as diferentes ondas presentes no sinal de FPG.

Neste sinal, foram identificadas sete intervalos de frequência. Baseado em estudos antes publicados incidindo em humanos ratos e ratinhos (6,9) e tendo em conta o intervalo de frequências cardíacas e respiratórias considerado normal em cães, assumimos que as diferentes frequência de ondas estariam relacionadas com (por ordem descendente de média de frequências): (i) harmónico da atividade cardíaca, 1^a onda entre 3,11 e 9,43 Hz), (ii) atividade cardíaca (2^a onda entre 1,18 e 3,00 Hz), (iii) atividade respiratória (3^a e 4^a ondas entre 0,57 e 0,97 Hz e 0,23 e 0,44 Hz, respetivamente), (iv) atividade vagal aferente (5^a e 6^a ondas entre 0,12 e 0,21 Hz e 0,09 e 0,14 Hz respetivamente) e (v) referente a alterações de tónus simpático (7^a onda entre 0,04 e 0,09 Hz).

Após a pré-medicação anestésica o FPG mostrou, como seria expectável, uma diminuição das atividade cardíaca e respiratória, e um decréscimo na frequência média de cada onda. Na prática médica, a utilidade pratica da FPG existem vários estudos que provam a aplicabilidade e utilidade da FPG na quantificação das frequências cardíaca e respiratória está amplamente demonstrada (7,10). Em Medicina Veterinária, de acordo com o nosso conhecimento actual, apenas um estudo exploraram a relação entre a FPG e a frequência respiratória em cães (11). Não obstante não terem sido obtidos resultados estatisticamente significativos, na análise da atividade respiratória antes e após a medicação pré-anestésica, foi possível detetar uma ligeira diminuição nos valores de atividade máxima respiratória e uma maior diminuição nos valores mínimos de atividade respiratória. Salientamos contudo, que o propósito do estudo era testar a aplicabilidade desta tecnologia no presente ambiente, o que, na nossa opinião, parece ter sido plenamente conseguido.

Reconhecemos as limitações do estudo, em especial no que respeita à reduzida amostra, à variabilidade inter-individual dos cães estudados e a dificuldade na escolha da localização anatómica ideal para colocação do sensor. Contudo, tendo em conta os resultados obtidos e a nossa experiência, poderemos sugerir para estudos futuros (i) utilizar amostras mais homogéneas em termos de raça, idade e peso vivo, de forma a reduzir os vieses experimentais, (ii) usar diferentes locais como a orelha ou as

and (iv) to conduct a comparative study of heart rate and respiratory rate obtained using other referenced techniques / methods in addition to PPG.

This study demonstrated the potential utility of such a wearable instrument in the clinical environment. The possibility of obtain biometrical data rapidly and easily, including cardiac and respiratory rates, from the photoplethysmography signal can help, in a simple way, to manage several conditions where the monitoring of these parameters gains a crucial importance to manage animals with chronic cardiopulmonary conditions, geriatric patients and convalescence animals upon surgery.

Conclusion

This pilot study demonstrated the relevance of reflection PPG, a non-invasive technique, to measure the heart and respiratory rates in dogs, and its utility in the clinical and ambulatory environment in veterinary medicine. It was also possible to confirm that the tail seems to be an appropriate anatomical area in dogs to collect these parameters.

Authors Contributions Statement

JR, LMR, conceptualization and study design; RA,LL experimental; RA, CR, HS, data curation; RA, JR, LMR, drafting, editing and reviewing; JR, LMR, supervision and final writing.

Acknowledgements

This work was funded by national funds through FCT - Foundation for Science and Technology, I.P., under the Scientific Employment Stimulus - Institutional Call - CEECINS/00127/2018 and supported by the project UIDB/CVT/00772/2020 and associated laboratory AL4AnimalS.

Conflict of Interests

Editors involved in this manuscripts' authorship had no participation in the review or decision process. All authors have stated that there are no financial and/or personal relationships that could represent a potential conflict of interest.

extremidades dos membros torácicos ou pélvicos, (iii) recolher os dados durante um maior período de tempo, de forma a limitar a presença de artefactos associados ao movimento e (iv) proceder a um estudo comparativo de deteção das frequências cardíaca e respiratória com diferentes métodos para além da FPG.

Este trabalho permitiu demonstrar o potencial de interesse de um instrumento deste tipo em ambiente clínico. A possibilidade de obter dados biométricos como a frequência cardíaca e respiratória com a facilidade proporcionada pela fotopleletismografia pode ajudar na gestão de múltiplas condições onde a monitorização destes parâmetros pode ser especialmente importante, como é o caso de animais com doenças cardiopulmonares crónicas, pacientes geriátricos ou mesmo em animais convalescentes após cirurgia.

Conclusão

Este estudo piloto demonstrou utilidade da FPG de reflexão, uma técnica não invasiva, na medição das frequências cardíaca e respiratória em cães, e a sua aplicabilidade em ambiente clínico e ambulatório em medicina veterinária. Foi também possível confirmar que a cauda parece ser um local anatómico adequado para a recolha destes parâmetros em cães.

Declaração dos contributos de cada autor

JR,LMR, concepção e desenho experimental; RA,LL experimentação; RA, CR, HS, curadoria de dados; RA, JR, LMR, elaboração do texto, edição e revisão; JR, LMR, supervisão e redacção final.

Financiamento

Este trabalho foi financiado por fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do Estímulo ao Emprego Científico - Apoio Institucional - CEECINS/00127/2018 e suportado pelo projeto UIDB/CVT/00772/2020 e pelo laboratório associado AL4AnimalS.

Conflito de interesse

O Editor presente na autoria deste manuscrito não participou nos processos de pessoais revisão e/ou decisão. Os autores declararam não possuir quaisquer relações financeiras ou que possam configurar um potencial conflitos de interesse.

References / Referências

1. Griffies, J. D., Zutty, J., Sarzen, M., & Soorholtz, S. (2018). Wearable sensor shown to specifically quantify pruritic behaviors in dogs. *BMC Veterinary Research*, *14*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1428-x>.
2. Dorlas, J. C., & Nijboer, J. A. (1985). Photo-electric plethysmography as a monitoring device in anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia*, *57*, 524–530. <https://doi.org/10.1093/bja/57.5.524>.
3. Allen, J. (2007). Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. *Physiological Measurement*, *28*(3), R1–R39. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/28/3/R01>.
4. Sahni, R. (2012). Noninvasive monitoring by photoplethysmography. *Clinics in Perinatology*, *39*(3), 573–583. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2012.06.012>.
5. Schultz-Ehrenburg, U., & Blazek, V. (2001). Value of quantitative photoplethysmography for functional vascular diagnostics: current status and prospects. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, *14*(5), 316–323. <https://doi.org/10.1159/000056362>.
6. Nilsson, L. M. (2013). Respiration signals from photoplethysmography. *Anesthesia and Analgesia*, *117*(4), 859–865. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e31828098b2>.
7. Leonard, P., Beattie, T., Addison, P. S., & Watson, J. N. (2003). Standard pulse oximeters can be used to monitor respiratory rate. *Emergency Medicine Journal*, *20*, 524–525. <https://doi.org/10.1136/emj.20.6.524>.
8. Houston D. M. (2000). Clinical exam in dogs and cats. In O. M. Radostits, D. M. Houston, & I. G. Mayhew (Eds.), *Veterinary Clinical Examination & Diagnosis* (1st ed., pp. 98-101). W. B. Saunders Co. Ltd.
9. Silva, H., Roux, É., Gadeau, A. P., & Rodrigues, L. M. (2020). Wavelet analysis of microcirculatory flowmotion reveals cardiovascular regulatory mechanisms-data from a beta-blocker. *Applied Sciences*, *10*(11), 4000. <https://doi.org/10.3390/app10114000>
10. Karlen, W., Garde, A., Myers, D., Scheffer, C., Ansermino, J. M., & Dumont, G. A. (2015). Estimation of respiratory rate from photoplethysmographic imaging videos compared to pulse oximetry. *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics*, *19*(4), 1331–1338. <https://doi.org/10.1109/JBHI.2015.2429746>.
11. Nabutovsky, Y., Pavek, T., & Turcott, R. (2012). Chronic performance of a subcutaneous hemodynamic sensor. *Pacing Clinical Electrophysiology*, *35*(8), 919–26. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.2012.034>

Appendix / Apêndice

Code 1

(<http://noc.ac.uk/using-science/crosswavelet-wavelet-coherence>)

```

a.     t=1:length(ppg);
b.     figure(1);
c.     plot(t,ppg)
d.     title('Raw Signal')
e.     xlabel('Samples');
f.     ylabel('Voltage(mV)')
g.     legend('Noisy PPG Signal')
h.     grid on
i.     %Find Peaks
j.     [~,locs_Peak] = findpeaks(ppg,'MinPeakHeight',a,...'MinPeakDistance',b);
k.     figure(3)
l.     hold on
m.     plot(t,ppg);
n.     plot(locs_Peak,ppg(locs_Peak2),'rv','MarkerFaceColor','r');
o.     axis([0 5000 440 640]); grid on;
p.     legend('PPG Signal','Peak-waves');
q.     xlabel('Samples'); ylabel('Voltage(mV)')
r.     title('Peak in PPG Signal')

```

Note: At this point the letter 'a' has been replaced by the minimum amplitude of the waves of the signal 'ppg' and the letter 'b' by the minimum distance between the maximum amplitude peaks of each wave.

Code 2

```

a.     for i=1:d, x(i)=i;
b.     seno(i)=sin(2*3.14*4/100*i)+sin(2*3.14*2/100*i)+sin(2*3.14*1/100*i)+sin(2*3.14*0.5/100*i)
        +sin(2*3.14*0.25/100*i)+sin(2*3.14*0.125/100*i)+sin(2*3.14*0.0625/100*i)+sin(2*3.14*0.03
        125/100*i);
c.     end;
d.     [waveseno,periodseno,scaleseno,coisenoseno,sig95seno]=wt(seno);
e.     amplitudeseno=abs(waveseno);
f.     for i=1:c mediaondasseno(i)=mean(amplitudeseno(i,1:d)); end
g.     plot(mediaondasseno);

```

Note: At this point, the letter "d" represented the total number of points for analysis that were chosen in the original sign (on the abscissa axis of the original sign) and the letter "c" represented the number obtained by the equation.

Code 3

```

a.     [waveppg,periodppg,scaleppg,coippg,sig95ppg]=wt(ppg);
b.     [wave,period,scale,coi,sig95]=wt(ppg,'MakeFigure',1);
c.     amplitudeppg=abs(waveppg);
d.     for i=1:c mediaondasppg(i)=mean(amplitudeppg(i,1:d)); end
e.     figure(2), plot(mediaondasppg).

```


Optoacoustic Tomography – good news for microcirculatory research

Tomografia Optoacústica – boas notícias para a investigação microcirculatória

Tiago Granja, Sérgio Faloni de Andrade, and Luis Monteiro Rodrigues *

CBIOS—Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024
Lisboa, Portugal

*corresponding author / autor para correspondência: monteiro.rodrigues@ulusofona.pt

Abstract

Tomographic imaging is a well established technology in preventive medicine and biomedical research, although not without limitations and concerns. Optoacoustic tomography (OAT) is a recent development that bridges optical and sonographic techniques to solve spatial resolution in deep-tissue imaging. In addition to safety advantages, OAT allows multiple wavelength readings for natural thermoelastic chromophores. In this study, we explore Multi Spectral Optoacoustic Tomography (MSOT) capacities to simultaneously acquire three independent chromophores – deoxygenated haemoglobin (Hb), oxygenated haemoglobin (HbO₂), and melanin, from healthy human volunteers, with maximal molar extinction of HbO₂ at 950 nm, Hb at 750 nm and melanin at 680 nm. Later we demonstrate how image stability during acquisition is fundamental for optimal resolution, precision and consistency of high throughout MSOT data collection. From recorded scans, a workflow is layered for data evaluation. With the MSOT dedicated software results were extracted from 3D image analysis of deep (15 mm³) vessels. The possibilities offered by this new system, specially in vascular pathophysiology, are immense and can be extended beyond current knowledge.

Keywords: Optoacoustic tomography; MSOT; haemoglobin; microcirculation; vascular research

Resumo

A tomografia como tecnologia de imagem está bem estabelecida na medicina preventiva e na investigação biomédica, embora com algumas limitações. A tomografia optoacústica (OAT) é um desenvolvimento recente que faz a ponte entre a óptica e a sonografia para abordar a resolução espacial em tecidos mais profundos. Além das vantagens relacionadas com a segurança, a OAT permite a leitura de comprimentos de onda múltiplos para cromóforos termo-elásticos naturais. Neste estudo, exploramos as capacidades da Tomografia Optoacústica Multiespectral (MSOT) para adquirir simultaneamente pelo menos três cromóforos independentes – Hemoglobina desoxigenada (Hb), Hemoglobina oxigenada (HbO₂) e melanina em humanos saudáveis com extinção molar máxima de HbO₂ a 950 nm, Hb a 750 nm e melanina a 680 nm. Mais tarde, demonstramos como a estabilidade da imagem durante a aquisição é fundamental para a melhor resolução, precisão e consistência da elevada produção de dados do MSOT. A partir de varrimentos gravados, o fluxo de trabalho é estratificado para avaliação de dados. O software dedicado MSOT permite a análise de imagem 3D de vasos profundos (15 mm³). As possibilidades oferecidas por este novo sistema especialmente na patofisiologia vascular são imensas e podem ser alargadas para além do conhecimento actual.

Palavras-chave: Tomografia optoacústica; MSOT; Hemoglobina; microcirculação; investigação vascular

Received / Recebido: 17/09/2021

Accepted / Aceite: 30/12/2021

Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

The importance of tomography in preventive medicine as in biomedical research is well established. Tomographic techniques such as computed tomography (CT), single-photon emission computed tomography (SPECT), and positron emission tomography (PET) offer different image resolution and contrast, meaning also different applicabilities, costs, and limitations. (1-4). A major limitation of this technology is spatial resolution in deep-tissue imaging due to light diffusion effects (4,5). Recent advances in photonics and optical imaging have drawn our attention to new optical tomography systems such as diffuse optical tomography (DOT), fluorescence molecular tomography (FMT), bioluminescence tomography (BLT), and photoacoustic tomography (PAT). These new developments aim to improve sensitivity and precision, and include new learning methods to provide more accurate and reliable reconstruction analysis (5,6).

Photoacoustic tomography (PAT) is a particularly interesting imaging technology, as it combines optics and ultrasound principles rather than classical ionizing radiation. It is also known as thermoacoustic tomography (TAT) or, more currently, optoacoustic tomography (OAT). This technology uses laser light of different frequencies to heat and expand the targeted tissue, creating a sonographic wave that can be measure at skin surface (6-9). This signal can then be used to produce an image by specific reconstruction algorithms. Different biological components can be targeted by different laser wavelengths. Compared with similar technologies, several advantages of this technique can be identified. PAT does not use ionizing radiation, in contrast to classical CT PET and or MRI, and is faster, easier, and less expensive to operate. Compared with DOT or with FMT, PAT shows better penetration capacities with high resolution, showing better contrast and fewer artifacts than sonography (6-10), the most common technology for cardiovascular diagnostics (9,10).

PAT applications have expanded significantly in the last years, from basic investigation to clinical applications, also in cardiovascular medicine (10-13). A recent development of this technology is the use of lasers with multiple wavelengths – the multi-spectral optoacoustic tomography (MSOT) – which allows the (in vivo) identification of several chromophores without contrast agents. These chromophores might be regarded as endogenous biomarkers of microcirculatory function, such as oxygenated haemoglobin (HbO_2), deoxygenated

Introdução

A importância da tomografia na medicina preventiva assim como na investigação biomédica está bem estabelecida. As técnicas de tomografia como a tomografia computadorizada (CT) de fóton único (SPECT) e a tomografia por emissão de positrões (PET) oferecem diferentes resoluções de imagem e contraste, o que significa também diferentes aplicabilidades e custos. (1-4). Uma limitação desta tecnologia é a resolução espacial das imagens em tecidos profundos devido à difusão de luz (4,5). Avanços recentes em fotónica e imagem óptica chamam a nossa atenção para novos sistemas de tomografia óptica como a tomografia óptica difusa (DOT), a tomografia molecular fluorescente (FMT), a tomografia de bioluminescência (BLT), e a tomografia fotoacústica (PAT). Todos estes novos desenvolvimentos visam melhorar a sensibilidade e precisão, o que inclui a utilização de novos métodos de aprendizagem que proporcionam uma melhor e mais fiável análise de reconstrução (5,6).

A tomografia fotoacústica (PAT) é uma tecnologia de imagem que parece ser particularmente interessante, uma vez que combina princípios ópticos e de ultrasonografia em alternativa à radiação ionizante clássica. É também conhecida como tomografia termoacústica (TAT) ou mais actualmente tomografia optoacústica (OAT). Esta tecnologia utiliza uma luz laser de diferentes frequências que aquece e expande o tecido alvo, criando uma onda sonográfica que pode ser medida à superfície da pele (6-9). Este sinal pode agora ser utilizado para produzir uma imagem através de algoritmos específicos de reconstrução. Um laser com comprimentos de onda é utilizado para medir diferentes componentes biológicos. Em comparação com tecnologias semelhantes, várias vantagens podem ser identificadas. Pensando na clássica CT, PET e mesmo na RM, o PAT não utiliza radiação ionizante, é mais rápido, fácil de operar e menos dispendioso. Em comparação com o DOT ou com o FMT, o PAT mostra melhores capacidades de penetração com alta resolução, mostrando melhor contraste e menos artefactos do que a Sonografia (6-10) a tecnologia mais popular utilizada no diagnóstico cardiovascular (9,10).

As aplicações PAT expandiram significativamente nos últimos anos, desde a investigação básica até aplicações clínicas, também na medicina cardiovascular (10-13). Um desenvolvimento recente desta tecnologia - a tomografia optoacústica multiespectral (MSOT) fornece lasers com comprimentos de onda múltiplos que permitem identificar vários cromóforos sem

Table 1 - Characterization of the study population. *bpm* - *beats per minute*.**Tabela 1** - Caracterização da população em estudo. *bpm* - *batimentos por minuto*

	Men / Homens	Women / Mulheres
n	3	3
Age/ Idade (years old / anos idade)	43.50 ± 1.00	29.89 ± 14.66
Height/ Altura (m)	1.75 ± 0.07	1.71 ± 0.03
Weight / Peso (kg)	76.00 ± 6.08	71.50 ± 0.71
BMI (kg/m ²)	24.79 ± 0.17	24.46 ± 0.57
Heart Rate / Frequência Cardíaca (bpm)	70.50 ± 4.20	73.67 ± 5.98
Systolic Pressure / Pressão Sistólica (mmHg)	123.50 ± 9.43	113.73 ± 8.11
Diastolic Pressure / Pressão Diastólica (mmHg)	85.00 ± 9.43	77.91 ± 9.08

haemoglobin (Hb), or the mean saturation of oxygen (mSO₂) (14-18). Other chromophores, including lipids, melanin and water might also be detected and visualised for functional analysis (10,16). In the present study we explore the operation and capabilities of MSOT in a set of healthy human participants.

Materials and Methods

Participants

Our convenience sample included six healthy participants of both genders (3 men and 3 women), 18 to 60 years old (mean ± sd 36.70 ± 15.16), selected following specific inclusion / non-inclusion criteria. Participants were normotensive, nonsmokers, and free of any medication or food supplementation. Restrictions included caffeine and alcohol consumption 24 hours prior to measurements, and the use any topical formulations (including cosmetic) on the skin. Participants reported regular physical activity and absence of any metabolic disease (diabetes, dyslipidaemia). Table 1 summarises the full characterization of the participants. All study procedures followed the principles established by the Helsinki Declaration and subsequent amendments (19) and were previously approved by the Institutional Ethics Committee.

agentes de contraste. Estes cromóforos podem ser considerados como biomarcadores endógenos de função microcirculatória, tais como hemoglobina oxigenada (HbO₂), hemoglobina desoxigenada (Hb), ou a saturação média de oxigénio (mSO₂) (14-18). Outros cromóforos como os lípidos, melanina e água podem também ser detectados e visualizados para análise funcional (10,16). No presente estudo exploramos o funcionamento e as capacidades do MSOT num conjunto de participantes humanos saudáveis.

Materiais e Métodos

Participantes

Esta amostra de conveniência envolveu seis participantes saudáveis de ambos os sexos (3 homens e 3 mulheres), de 18 a 60 anos (média+dp 36,70 ± 15,16) seleccionados segundo critérios específicos de inclusão / não-inclusão. Os participantes eram normotensos, não fumadores, e livres de qualquer medicação ou suplemento alimentar. As restrições incluíam o consumo de cafeína e álcool 24 horas antes das medições, e a utilização de quaisquer formulações tópicas (incluindo cosméticas) sobre a pele. Os participantes relataram actividade física regular e ausência de qualquer doença metabólica (diabetes, dislipidemia). A Tabela 1 resume a caracterização completa dos participantes. Todos os procedimentos seguiram os princípios estabelecidos pela Declaração de Helsínquia e subsequentes emendas (19) e foram previamente aprovados pela Comissão de Ética Institucional.

Multi Spectra Optoacoustic Tomography and Image Analysis

A MSOT optoacoustic imaging system from Acuity (iThera Medical GmbH, Munich, Germany) was used for all analyses. This instrument is composed of a Nd:YAG laser, which produces excitation pulses of 9 ns at wavelengths from 680 nm to 980 nm. The MSOT system repetition rate can reach 50 Hz with a wavelength tuning speed of 10 ms and a peak pulse energy of 35 mJ at 730 nm. A fiber-optic bundle integrated into the detector produces a circular spot of light of approximately 10 mm diameter. In this system, ultrasound detection is made by 256 ultrasound transducers with a centre frequency of 8 MHz (60% bandwidth), organized in a hemispherical array of 98° angular coverage and a radius of curvature of 30 mm. The laser light is conducted to a 3D probe by an optical fiber of 15 mm³. After scanning, images were processed for fluence correction, optical focusing given by the speed of sound and optoacoustic thermoelastic signals of the selected chromophores for Hb and HbO₂ were reconstructed, and Regions of Interest (ROIs) were analysed with the iThera Medical ViewMSOT software.

ImageJ software (National Institutes of Health, USA v.1.53k14 from 26 June 2021) was used to analyse the merged, (re)constructed, image from individual images of X, Y and Z axis scans.

Experimental Procedure

The ventral aspect of a randomly chosen forearm, with body hair chemically removed immediately prior to analysis, was marked for probe application (4,20). The MSOT 3D probe was then applied and focused in a fixed orientation. A thin layer of gel for sonography was applied in the MSOT 3D cup before contact with the skin to improve image acquisition conditions. The MSOT 3D cup was locked in position with a self-assembled arm (ITEM – Engineering, Solingen, Germany)(Figure 1).

Statistics

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 9.2.0, MachineID: 0861F12DB8D10, and normal distribution was tested with the Shapiro-Wilk test and direct observation of QQ plots. Except where noted, all data is presented as mean ± sd. Significance was observed through t test of selected comparisons, analysed with 95% confidence level.

Tomografia Optoacústica Multi-Espectral e Análise de Imagem

Foi utilizado um sistema de imagem optoacústica MSOT da Acuity (iThera Medical GmbH, Munique, Alemanha). Este instrumento é composto por um laser Nd:YAG que fornece impulsos de excitação de 9 ns em comprimentos de onda de 680 nm a 980 nm. A taxa de repetição do sistema MSOT vai até 50 Hz com uma velocidade de afinação do comprimento de onda de 10 ms e uma energia de pico de pulso de 35 mJ a 730 nm. Um feixe de fibras integrado no detector fornece uma mancha de luz circular de aproximadamente 10 mm de diâmetro. A detecção ultra-sónica iThera MSOT é composta por 256 transdutores ultra-sónicos com uma frequência central de 8 MHz (60% de largura de banda), organizados numa matriz hemisférica de 98 graus de cobertura angular e um raio de curvatura de 30 mm. A luz laser é conduzida a uma sonda 3D por fibra óptica com 15 mm³. Após a digitalização, as imagens foram processadas para correcção da fluência, a focagem óptica dada pela velocidade do som e os sinais termoelásticos optoacústicos de cromóforos seleccionados Hb, HbO₂ foram reconstruídos e a Região de Interesse (ROI) analisada com o software iThera Medical ViewMSOT.

O software ImageJ (National Institutes of Health, USA v.1.53k14 de 26 de Junho de 2021) foi utilizado para trabalhar com imagens reconstruídas a partir de imagens individuais de varrimentos dos eixos X, Y e Z.

Procedimento experimental

O aspecto ventral do antebraço, escolhido aleatoriamente em cada participante, foi previamente tratado com a remoção química do pêlo corporal, e marcado para aplicação da sonda (4,20). Em seguida, a sonda MSOT 3D foi aplicada e focalizada numa orientação fixa. Uma fina camada de gel para sonografia foi aplicada no detector 3D do MSOT antes do contacto com a pele para proporcionar melhores condições de aquisição de imagem. O detector 3D do MSOT foi bloqueado na posição com um braço desenhado com a tecnologia da ITEM - Engeneering (Solingen, Alemanha) (Figura 1).

Estatística

A análise estatística foi realizada com o GraphPad Prism 9.2.0, MachineID: 0861F12DB8D10, e a distribuição da normalidade testada com o Shapiro-Wilk e a observação directa das parcelas QQ. Todos os dados são apresentados como média±dp, excepto quando indicados de forma diferente. A significância foi observada através do teste t de comparações seleccionadas analisadas com 95% do nível de confiança.

Results and Discussion

The MSOT detects numerous chromophore signals at a repetition rate of 50 Hz with a wavelength tuning speed of 10 ms. MSOT wavelengths range from near visible to infra-red imaging (680 to 980 nm), allowing non-invasive analysis up to 15 mm deep and producing regions of analysis of 15 mm³ from the recording of 10 frames (in 2 seconds) for each (X, Y and Z) axis for every (preset) thermoelastic chromophore. Micrometre resolution of selected regions yield HbO₂, Hb, and melanin data from 3D reconstructed images (using a single-element ultrasonic transducer and a curved ultrasound 2-D sensor), referred as the most important biomarkers from OAT (4,15,18,21,22).

The MSOT can virtually be instructed to "unmix" up to three different thermoelastic chromophores (certified by the manufacturer) and loaded as pre-sets before any

Resultados e Discussão

O MSOT detecta vários cromóforos a uma taxa de repetição de 50 Hz com uma velocidade de afinação do comprimento de onda de 10 ms. Os comprimentos de onda MSOT variam desde o visível ao infravermelho (680 a 980 nm) permitindo abordar, de modo não invasivo uma grande profundidade (até 15 mm) em 2 segundos. A resolução microscópica das regiões seleccionadas produz dados de HbO₂, Hb desoxigenada e melanina de imagens reconstruídas em 3D (utilizando um transdutor ultra-sónico de um único elemento e um sensor de ultrasons curvo 2-D) referidos como os biomarcadores mais importantes da PAT (4,15,18,21,22).

As imagens adquiridas pelo MSOT correspondem a 15 mm³ em volume. Para cada varrimento, o sistema regista 10 frames para cada eixo X, Y e Z para cada cromóforo termoelástico produzindo um sinal entre

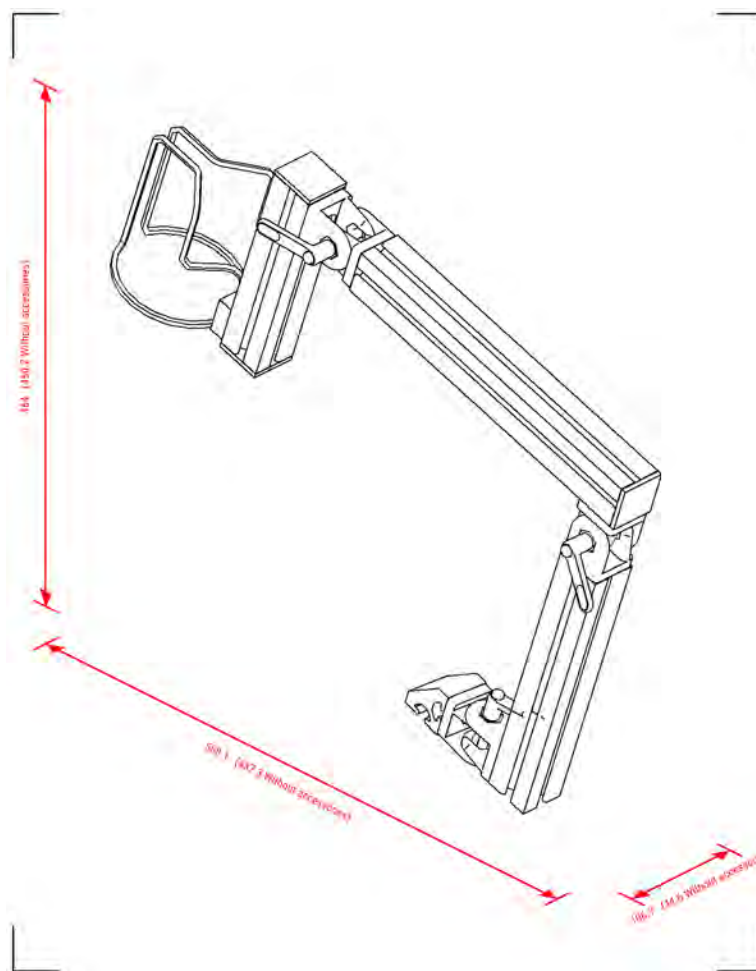


Figure 1 - Isometric view of the MSOT probe holder flexible arm. Designed to hold the MSOT 3D probe this piece was designed with the ITEM engineering tool (<https://item.engineering/>).

Figura 1 - Vista isométrica do braço flexível que suporta a sonda MSOT. Concebida para estabilizar a sonda MSOT 3D esta peça foi construída com a ferramenta de engenharia ITEM (<https://item.engineering/>).

acquisition. As discussed, for our study, the instrument was set up to observe signals from HbO₂, Hb, and melanin. While acquiring from any given region (e.g., the skin), an image stack composed of XY, XZ, and YZ axes is generated (Figure 2A). At a depth of 15 mm, the images produced have a resolution of 150 μm, enabling the identification of the first and second vascular plexuses of the skin.

Spectra unmixing and image merge

Objects generated during acquisition are three dimensional (3D), and the screenshot view allows measurements and annotations as shown in Figure 2B. To extract data from acquired images, prior analysis requires assembly of multiple thermoelastic signals and post processing by the iThera MSOTview software. This process follows a reconstruction sequence of optoacoustic signals - the correction of the speed of

680 a 980nm (4,14,18,22). O MSOT pode virtualmente ser instruído para distinguir até três cromóforos termoelásticos diferentes certificados pela empresa iThera e carregados como programa de função antes de qualquer aquisição. Para o ensaio actual, a configuração carregada foi orientada para observar sinais de HbO₂, Hb e melanina respectivamente. Enquanto se adquire sinal em qualquer região (por exemplo, a pele), é gerado um conjunto de imagens compostas pelos eixos XY, XZ, e YZ (Figura 2A). A 15 mm de profundidade, as imagens têm uma resolução de 150 μm, permitindo a identificação do primeiro e segundo plexos vasculares da pele (Figura 2B).

Resolução espectral e construção de imagens

Os objectos gerados durante a aquisição são tridimensionais (3D), e a vista de ecrã permite medições e anotações como mostra a Figura 2B. Para extrair dados das imagens adquiridas, a análise prévia requer a montagem de múltiplos sinais termoelásticos e o pós-processamento pelo software iThera MSOTview. Este processo segue uma sequência de reconstrução

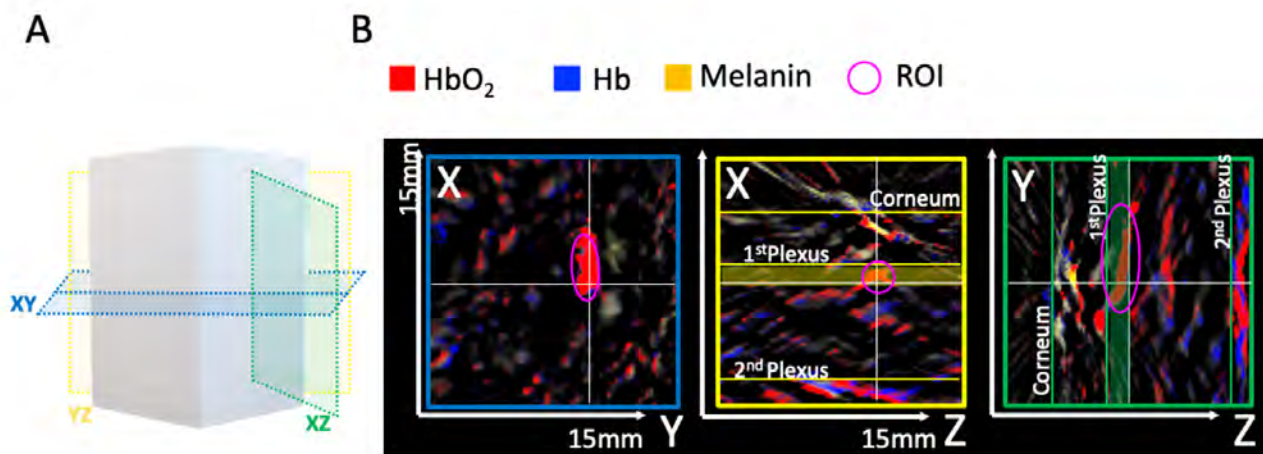


Figure 2 - MSOT image acquisition overview.

Image of HbO₂ acquired signal displayed in red, Hb signal displayed in blue, and melanin signal displayed in yellow. A) Graphical representation of acquired images in 3D with superimposed axis XY (blue plane), XZ (green plane) and YZ (yellow plane). Selected region of interest (ROI) for analysis are shown in magenta. B) Dissection of skin structure through all information given by MSOT chromophores HbO₂, Hb and melanin displayed with a tissue depth of 15 mm in three dimensions XY (blue plane), XZ (green plane) and YZ (yellow plane).

Figura 2 - Visão geral da aquisição de imagens com o MSOT.

Imagem do sinal adquirido de HbO₂ em vermelho, sinal de Hb em azul e sinal de melanina em amarelo. A) Representação gráfica das imagens adquiridas em 3D com sobreposição dos eixos XY (plano azul), XZ (plano verde) e YZ (plano amarelo). Qualquer região de interesse (ROI) seleccionada para análise será mostrada em magenta. B) Dissecção da estrutura da pele através de toda a informação MSOT fornecida pelos cromóforos HbO₂, Hb e melanina apresentados com uma profundidade de tecido de 15 mm em três dimensões XY (plano azul), XZ (plano verde) e YZ (plano amarelo).

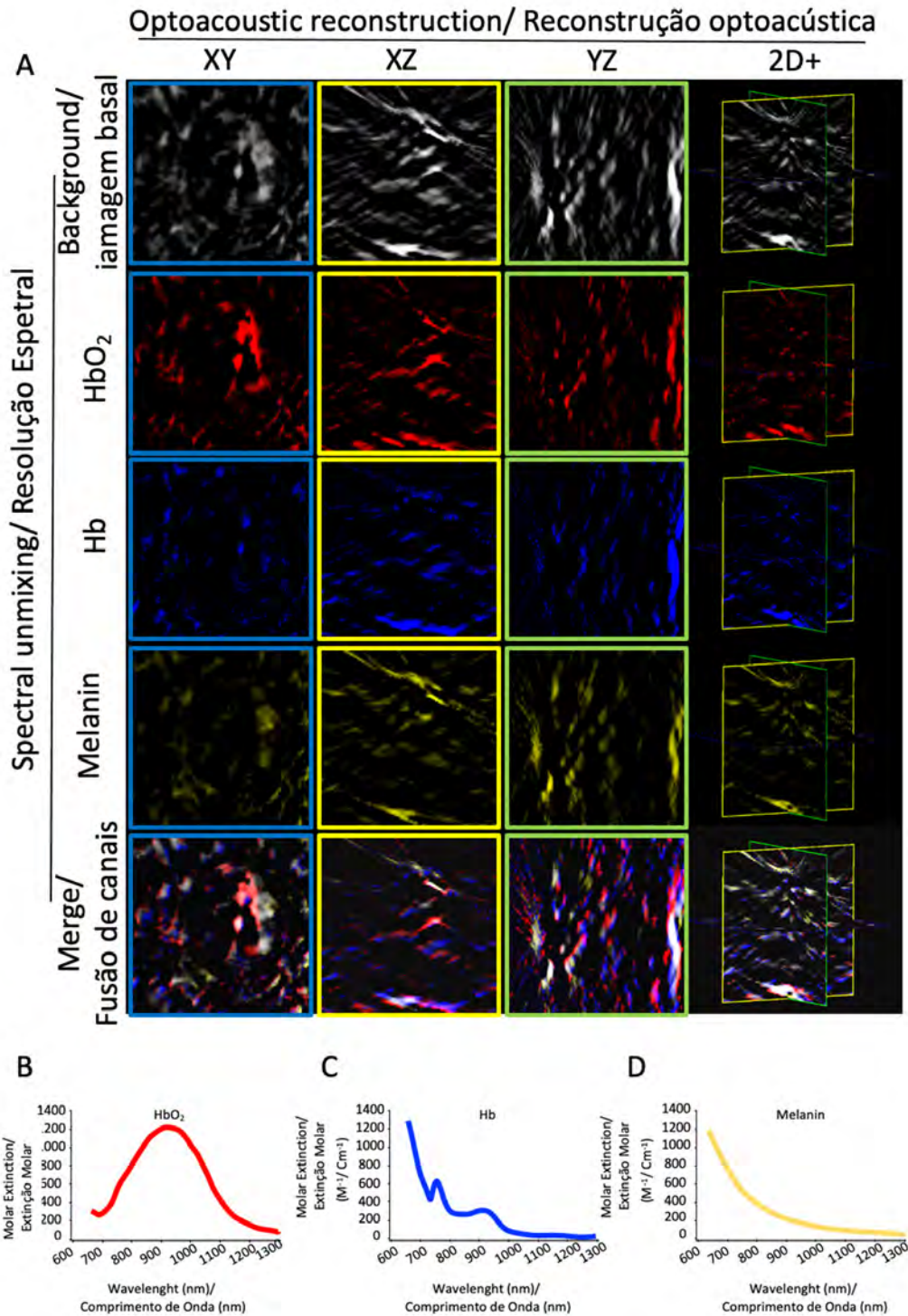


Figure 3 - Spectra of molar extinction of natural chromophores HbO₂, Hb and melanin and the 2D+ display of optoacoustic signals isolated and merged after post processing analysis.

A) Representative single images of unmixed acquired signals by the MSOT, resulting merge scans and 2D+ view. B) for best signal acquisition MSOT is set to reads maximal HbO₂ molar extinction at 950 nm; C) Hb molar extinction is collected at 750 nm and D) melanin molar extinction given at 680 nm.

Figura 3 - Espectros de extinção molar de cromóforos naturais HbO₂, Hb e melanina e a visualização 2D+ de sinais optoacústicos isolados e fundidos após análise pós processamento. A) Imagens únicas representativas dos sinais adquiridos não misturados pelo MSOT, resultantes das varreduras de fusão e visualização 2D+. B) para melhorar a aquisição de sinais, o MSOT está definido para ler a extinção molar máxima de HbO₂ a 950 nm; C) A extinção molar de Hb é recolhida a 750 nm e D) a extinção molar de melanina dada a 680 nm.

sound for calibration of best focus, application of fluence correction, and calculation of spectral unmixing for the acquired signals of HbO₂, Hb and melanin (Figure 3A). For best signal acquisition, the MSOT reads maximal HbO₂ molar extinction at 950 nm, Hb at 750nm, and melanin at 680nm (Figure 3B-D). Representative images of each of the acquired signals of HbO₂, Hb, and melanin demonstrate the perfect unmixing of the acquired signals in all XY, XZ, and YZ axes and the plot of the respective merged image (Figure 3A). Additionally, a 2D+ image view is generated for optimal navigation over the 3D images acquired and to adjust proper colour intensities. Single chromophore images are fundamental to set correct colour lookup tables and to enable independent study of the acquired signals.

Optoacoustic reconstruction and Region of Interest (ROI) analysis

After image reconstruction, fluence correction, focusing of speed of sound, unmixing, and adjustment of color balance and saturation of preferred lookup tables, each chromophore signal acquired by the MSOT can be analysed. To overcome signal flattening from signal-to-noise ratio derived from large image analysis, elements of each 3D scan must be selected as Regions-Of-Interest (ROI) before data analysis. ROI analysis (depicted in Figure 4A) follows a microvasculature ROI structure in 9 of all 10 frames acquired. Each frame is of 150 μm of tissue depth in X, Y and Z axes. To acquire data from any ROI, each frame must follow the selected ROI across XZ (yellow bar in depicted frames) and YZ (green bar in depicted frames) while a polygon selection tool (magenta selected area) delineates the ROI in XY (blue frames). On the 2D+ image overview, the 3D area of analysis is built (Figure 4A).

Biomarkers

Through the MSOTview each scanned ROI exported data is provided in bursts of ten images derived from optoacoustic reconstruction. ROI selection of MSOT acquired images allows calculation of ROI volume (mm³), as well as the concentrations of HbO₂ (in arbitrary units a.u.), oxidized Hb (a.u.) and melanin (a.u.) (4,14,18,20).

Overall, the acquisition speed of ten images of three chromophores over a reconstruction of sixse wavelengths (700 nm, 730 nm, 760 nm, 800 nm, 850 nm, and 900 nm) is constant at 2s. The data stability from the selected analysed ROI is depicted by the linearity of the signal recorded for HbO₂, deoxygenated Hb, and melanin (a.u.) (Figure 4B-D). From HbO₂ and

de sinais optoacústicos - a correcção da velocidade do som para calibração do melhor foco, aplicação de correcção de fluência, e cálculo de resolução espectral para os sinais adquiridos de HbO₂, Hb e melanina (Figura 3A). Para melhor aquisição de sinais, o MSOT lê a extinção molar máxima de HbO₂ a 950 nm, Hb a 750 nm e melanina a 680 nm (Figura 3B-D). Imagens representativas de cada um dos sinais adquiridos de HbO₂, Hb e melanina demonstram a perfeita resolução dos sinais adquiridos em todos os eixos XY, XZ, e YZ e a montagem da respectiva imagem fundida (Figura 3A). Além disso, é gerada uma vista de imagem 2D+ para melhor navegação sobre as imagens 3D adquiridas e para ajustar adequadamente as intensidades de cor. As imagens monocromáticas são fundamentais para definir tabelas correctas de procura de cores e para estudar os sinais adquiridos de forma independente.

Reconstrução opto-acústica e análise da Região de Interesse (ROI)

Após reconstrução da imagem, correcção da fluência, ajuste da velocidade do som, resolução espectral, ajuste do equilíbrio da cor e saturação das tabelas de pesquisa preferidas, cada sinal cromóforo adquirido pelo MSOT pode ser analisado. Para superar o achatamento do sinal a partir da relação sinal-ruído resultante da análise de grandes imagens, os elementos de cada varrimento 3D têm de ser seleccionados como Regiões-de-Interesse (ROI) antes da análise dos dados. A análise ROI (representada na Figura 4A) segue a estrutura da microvasculatura em 9 de todos os 10 fotogramas adquiridos. Cada plano é de 150 μm de profundidade de tecido nos eixos X, Y e Z. Para adquirir dados de qualquer ROI, cada plano deve seguir o ROI seleccionado através de XZ (barra amarela em quadros representados) e YZ (barra verde em quadros representados) enquanto que uma ferramenta de selecção de polígono (área seleccionada magenta) delinea o ROI em XY (quadros azuis). Na visão geral da imagem 2D+, a área de análise 3D é construída (Figura 4A).

Biomarcadores

Através do MSOTview cada dado digitalizado de cada ROI exportado é fornecido em grupos de dez imagens resultantes da reconstrução optoacústica. A selecção do ROI das imagens MSOT adquiridas permite o cálculo do volume de ROI (mm³), concentração de HbO₂ (em unidades arbitrárias a.u.), Hb desoxigenada (a.u.) e melanina (a.u.) (4,14,18,20).

Globalmente, a velocidade de aquisição de 10 imagens de 3 cromóforos sobre uma reconstrução de 6 comprimentos

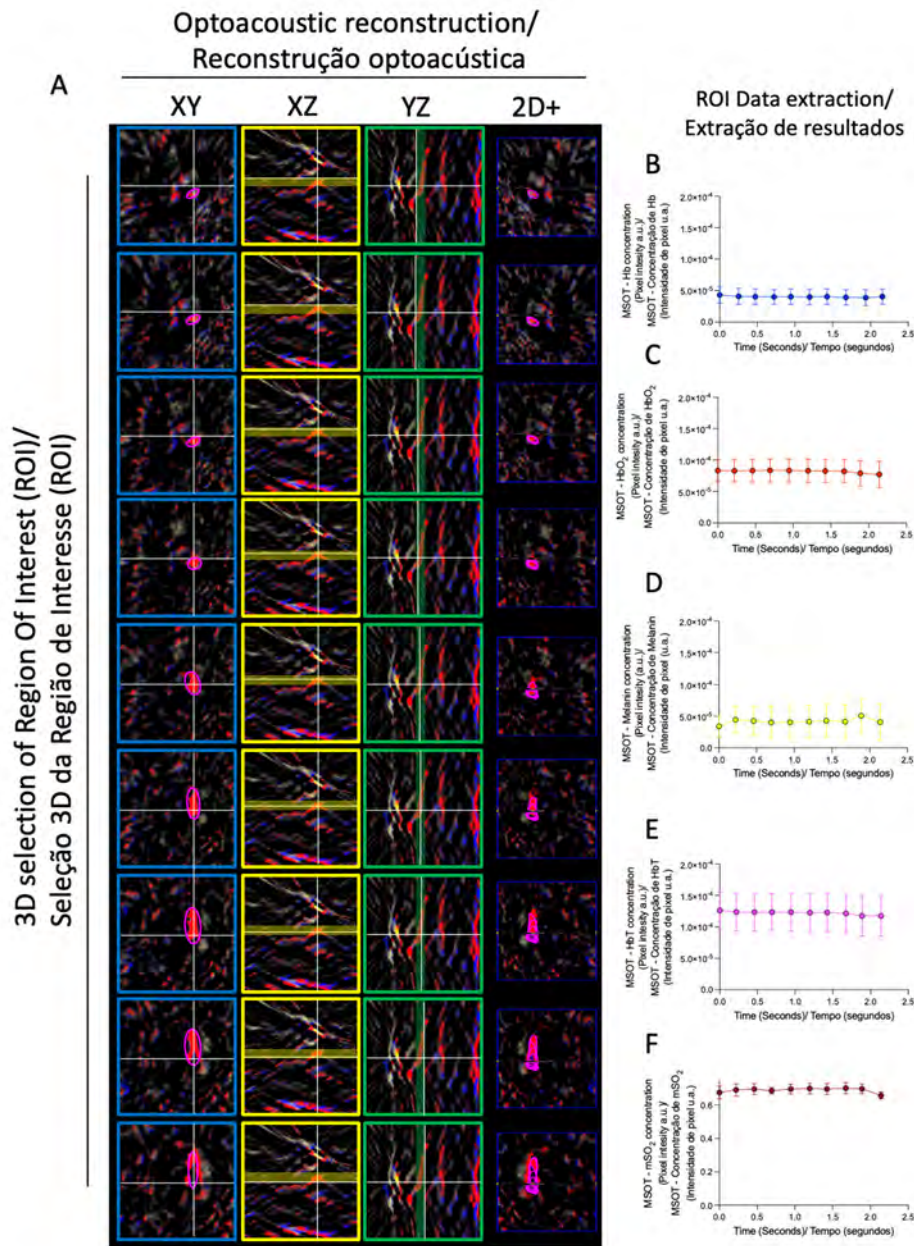


Figure 4 - ROI selection on merged scans after images post-processing.

A) Microvasculature ROI structure is present in all acquired frames. Each frame has 150 μm in depth over X, Y and Z axis. To each frame point in XZ (yellow bar) and YZ (green bar) a polygon selection of the desired ROI is followed in XY (magenta polygon) on blue frames. In the 2D+ column is possible to observe the layering build of the 3D area of analysis. B) Data extraction from a selected Region of Interest (ROI) for hemoglobin Hb over 10 acquisition frames, C) ROI readout of HbO₂, D) ROI data acquisition of melanin, E) ROI calculation of total hemoglobin HbT over ten collected images, F) ROI calculation of oxygen saturation mSO₂.

Figura 4 - Seleção do ROI em varrimentos fundidos após pós-processamento de imagens.

A) A estrutura microcirculatória da ROI está presente em todos os planos de imagem adquiridos. Cada plano tem 150 μm de profundidade nos eixos X, Y e Z. Para cada ponto em XZ (barra amarela) e YZ (barra verde), uma selecção poligonal do ROI seleccionada é seguida em XY (polígono magenta) sobre planos azuis. Na coluna 2D+ é possível observar a construção em camadas da área de análise 3D. B) Extração de dados de uma região de interesse seleccionada (ROI) para hemoglobina Hb sobre 10 planos de aquisição, C) Leitura do ROI de HbO₂, D) Aquisição de dados ROI de melanina, E) Cálculo do ROI da hemoglobina total HbT em dez imagens recolhidas, F) Cálculo do ROI da saturação de oxigénio mSO₂.

Table 2 - Descriptive statistics of acquired data from the MSOT selected ROI (see text). Data from HbT extracted from the MSOT in a.u. equals the addition of acquired HbO₂ and Hb optoacoustic signals. *a.u. -arbitrary units*
Tabela 2- Estatística descritiva dos dados adquirido com o MSOT nas ROI selecionadas (ver texto). Os valores de HbT obtidos do MSOT correspondem á soma dos valores de HbO₂ e Hb adquiridos dos sinais optoacústicos. *a.u. - unidades arbitrárias*

	HbT (a.u.)	HbO ₂ (a.u.)	Hb (a.u.)
number of entries / número de entradas	10	10	10
median / mediana	1.23E-04	8.31E-05	4.00E-05
standard deviation / desvio padrão	2.75E-06	2.21E-06	1.14E-06

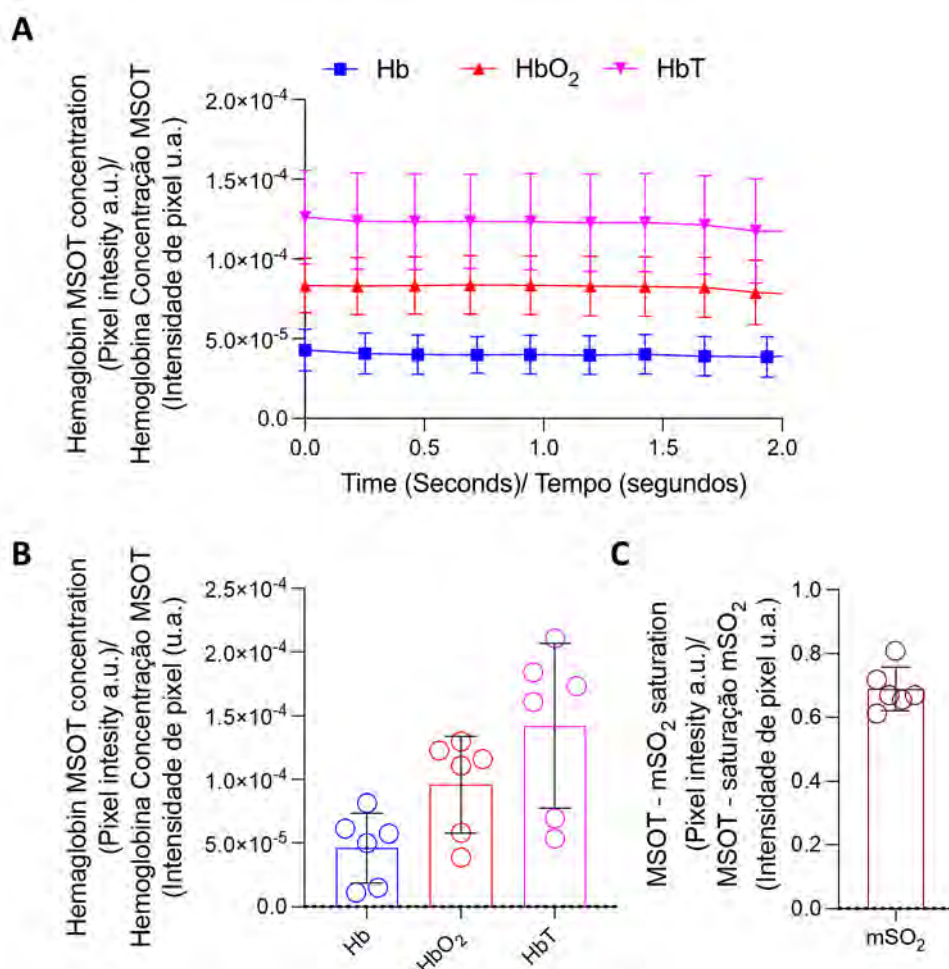


Figure 5 - Hemodynamic parameters Hb, HbO₂ and HbT acquired from a population of six volunteers.

A) Representative graphic over single MSOT readouts (n=10) of hemoglobin oxygenation on ROI data of 6 participants with data distribution (mean and SD) over each reading of the equipment on a single scan, demonstrating its acquisition consistency. B) Whole blood haemoglobin concentration of Hb (blue), HbO₂ (red) and HbT (pink) as arbitrary units (a.u.) at a given ROI. C) Mean oxygen saturation (mSO₂) readout above 0.7 in all volunteers in rest.

Figura 5 - Parâmetros hemodinâmicos Hb, HbO₂ e HbT adquiridos a uma população de seis voluntários.

A) Gráfico representativo de leituras únicas de MSOT (n=10) de oxigenação da hemoglobina sobre dados ROI de 6 participantes com distribuição de dados (média e dp) sobre cada leitura do equipamento num único varrimento, demonstrando a sua consistência de aquisição. B) Concentração de hemoglobina no sangue de Hb (azul), HbO₂ (vermelho) e HbT (rosa) em unidades arbitrárias (a.u.) numa determinada ROI. C) Saturação média de oxigênio (mSO₂) acima de 0,7 em todos os voluntários em repouso.

Hb signals, the MSOTview is able to calculate the total haemoglobin (HbT) and the mean oxygen saturation (mSO₂) (Figure 4E-F) (14).

The MSOT calculated HbT ($1.23E-04 \pm 2.75E-06$ a.u) is therefore given by the addition Hb (of $4.00E-05 \pm 1.14E-06$) and HbO₂ (of $8.31E-05 \pm 2.21E-06$) signal intensities shown in Table 2. Data evaluation plotted in Figure 5A summarizes the scans taken from our six volunteers over a total of ten optoacoustic images in 2s. Data from Hb (line in blue) and HbO₂ (line in red) consistently match consistently their addition as HbT (line in pink) over the course of the optoacoustic acquisitions. We also observe that in resting position, HbO₂ concentration is statistically higher than Hb in all volunteers (Figure 5B), and that value of mSO₂ is consistently above the 0.7 a.u. oxygen saturation signal input cut-off (Figure 5C).

Our approach is in-line with previously published studies showing that that image acquisition with the MSOT system is extremely intuitive (even in 3D mode). Discrimination of the skin microvasculature stratification into upper and lower skin plexus is visualized on demand in different axis (X, Y, Z) at a volume of 15 mm³ (4,14-16). The application of ROI analysis shows high descriptive potential as it enables the MSOT to independently and simultaneously evaluate the blood volume and oxygenation of the different skin plexus with different / multiple selected ROI's. Additionally, MSOT selected pre-set offers the possibility to acquire and unmix (at least) three independent chromophores of interest (Hb, HbO₂, and melanin in our study) simultaneously.

In any case, the complete stabilization of the 3D probe during image acquisition is critical for the acquisition quality and for data analysis, such that the use of a fixed stand to secure the probe is essential.

We recognize that the data processing involved is complex, and requires an experienced operator and analyst. However, the possibilities offered by this new system to bring new perspectives especially to vascular pathophysiology research are immense and can be extended beyond current knowledge.

de onda (700 nm, 730 nm, 760 nm, 800 nm, 850 nm, e 900 nm) é constante a cada 2s. A estabilidade dos dados do ROI seleccionado é representada pela linearidade do sinal registado para HbO₂, Hb desoxigenada e melanina (a.u.) (Figura 4B-D). A partir dos sinais de HbO₂ e Hb, o MSOTview é capaz de calcular a hemoglobina total (HbT) e a saturação média de oxigénio (mSO₂) (Figura 4E-F) (14).

O HbT calculado pelo MSOT ($1.23E-04 \pm 2.75E-06$ a.u) é portanto dado pela adição de Hb (de $4.00E-05 \pm 1.14E-06$) e HbO₂ (de $8.31E-05 \pm 2.21E-06$) cujas intensidades de sinal são mostradas na Tabela 2. A avaliação dos dados presentes na Figura 5A resume os dados dos seis voluntários num total de dez imagens optoacústicas durante 2 s. Os dados de Hb (linha em azul) e HbO₂ (linha em vermelho) correspondem consistentemente à sua adição como HbT (linha em rosa) ao longo das aquisições optoacústicas. Observamos também que em posição de repouso, a concentração de HbO₂ é estatisticamente superior a Hb em todos os voluntários (Figura 5B), e que o valor de mSO₂ está consistentemente a atingir acima do limite mínimo de saturação de oxigénio de 0,7 a.u. (Figura 5C).

A nossa abordagem está em linha com estudos previamente publicados que mostram que a aquisição de imagem com o sistema MSOT é extremamente intuitiva (mesmo em modo 3D). A discriminação da estratificação da microvasculatura da pele no plexo superior e inferior da pele é visualizada em direto em diferentes eixos (X, Y, Z) num volume de 15 mm³ (4,14-16). A aplicação da análise de ROI mostra um elevado potencial descritivo, pois permite ao MSOT avaliar independentemente o volume de sangue e a oxigenação dos diferentes plexos cutâneos em simultâneo com diferentes/ múltiplos ROI seleccionados. Além disso, o MSOT seleccionado oferece a possibilidade de adquirir e distinguir pelo menos três cromóforos independentes (Hb, HbO₂, melanina no nosso estudo) em simultâneo.

Em qualquer caso, a estabilização total da sonda 3D durante a aquisição da imagem é fundamental para a qualidade da aquisição e para a análise dos dados, o que significa que a utilização de um suporte fixo para estabilizar a sonda é altamente recomendável.

Reconhecemos que o processamento de dados envolvido é complexo e requer uma experiência consistente por parte do operador. No entanto, as possibilidades oferecidas por este novo sistema em proporcionar novas perspectivas são imensas em especial na investigação vascular e podem ser alargadas para além do conhecimento actual.

Authors Contributions Statement

LMR, TG conceptualization and study design; TG, SA experimental implementation; TG, data analysis and data curation; TG, LMR, drafting and reviewing; LMR, supervision and final writing.

Funding

This research is funded by ALIES and COFAC principal providers of the technology under study, and by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) through the grant UIDB/04567/2020 to CBIOS.

Conflict of Interests

Editors involved in this manuscripts' authorship had no participation in the review or decision process. All authors have stated that there are no financial and/or personal relationships that could represent a potential conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to CBIOS staff for their effort supplying all the necessary help, and to all the participants involved in the study.

Declaração sobre as contribuições do autor

LMR, TG, conceção e desenho do estudo; TG, SA implementação experimental; TG, análise e curadoria de dados; TG, LMR, redacção e revisão; LMR, supervisão e redacção final.

Financiamento

Esta investigação é financiada pela ALIES e pela COFAC principais provedores da tecnologia em estudo, e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através da bolsa UIDB/04567/2020 à CBIOS.

Conflito de Interesses

Os editores envolvidos na autoria destes manuscritos não tiveram qualquer participação no processo de revisão ou decisão. Todos os autores declararam que não existem relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar os seus agradecimentos ao pessoal da CBIOS pelo seu esforço em fornecer toda a ajuda necessária, e a todos os participantes envolvidos no estudo.

References / Referências

1. Yodh, A., Chance B. (1995). Spectroscopy and imaging with diffusing light *Physics Today* 48, 34–40. doi.org/10.1063/1.881445
2. Ntziachristos, V., Ripoll, J., Wang, L. V., & Weissleder, R. (2005). Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nature biotechnology*, 23(3), 313–320. doi.org/10.1038/nbt1074
3. Rubin G. D. (2014). Computed tomography: revolutionizing the practice of medicine for 40 years. *Radiology*, 273(2 Suppl), S45–S74. doi.org/10.1148/radiol.14141356
4. Karlas, A., Fasoula, N. A., Paul-Yuan, K., Reber, J., Kallmayer, M., Bozhko, D., Seeger, M., Eckstein, H. H., Wildgruber, M., & Ntziachristos, V. (2019). Cardiovascular optoacoustics: From mice to men - A review. *Photoacoustics*, 14, 19–30. doi.org/10.1016/j.pacs.2019.03.001
5. Tan, H., Gu, Y., Yu, H., Hu, P., Zhang, Y., Mao, W., & Shi, H. (2020). Total-Body PET/CT: Current Applications and Future Perspectives. *AJR. American journal of roentgenology*, 215(2), 325–337. doi.org/10.2214/AJR.19.22705
6. Zhang L, Zhang G. (2019) Brief review on learning-based methods for optical tomography. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 12, 1930011. doi: 10.1142/S17935458193001185
7. Hu, S., & Wang, L. V. (2010). Photoacoustic imaging and characterization of the microvasculature. *Journal of biomedical optics*, 15(1), 011101. doi.org/10.1117/1.3281673
8. Zhang, H. F., Maslov, K., Stoica, G., & Wang, L. V. (2006). Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nature biotechnology*, 24(7), 848–851. doi.org/10.1038/nbt1220
9. Merčep, E., Jeng, G., Morscher, S., Li, P. C., & Razansky, D. (2015). Hybrid optoacoustic tomography and pulse-echo ultrasonography using concave arrays. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 62(9), 1651–1661. doi.org/10.1109/TUFFC.2015.007058
10. Wang L. V. (2009). Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography. *Nature photonics*, 3(9), 503–509. doi.org/10.1038/nphoton.2009.157
11. Haedicke, K., Agemy, L., Omar, M., Berezhnoi, A., Roberts, S., Longo-Machado, C., Skubal, M., Nagar, K., Hsu, H. T., Kim, K., Reiner, T., Coleman, J., Ntziachristos, V., Scherz, A., & Grimm, J. (2020). High-resolution optoacoustic imaging of tissue responses to vascular-targeted therapies. *Nature biomedical engineering*, 4(3), 286–297. doi.org/10.1038/s41551-020-0527-8
12. Nitkunanantharajah, S., Haedicke, K., Moore, T. B., Manning, J. B., Dinsdale, G., Berks, M., Taylor, C., Dickinson, M. R., Jüstel, D., Ntziachristos, V., Herrick, A. L., & Murray, A. K. (2020). Three-dimensional optoacoustic imaging of nailfold capillaries in systemic sclerosis and its potential for disease differentiation using deep learning. *Scientific reports*, 10(1), 16444. https://doi.org/10.1038/s41598-020-73319-2.
13. Haedicke, K., Brand, C., Omar, M., Ntziachristos, V., Reiner, T., & Grimm, J. (2017). Sonophore labeled RGD: a targeted contrast agent for optoacoustic imaging. *Photoacoustics*, 6, 1–8. doi.org/10.1016/j.pacs.2017.03.001.
14. Zafar, H., Breathnach, A., Subhash, H. M., & Leahy, M. J. (2015). Linear-array-based photoacoustic imaging of human microcirculation with a range of high frequency transducer probes. *Journal of biomedical optics*, 20(5), 051021. doi.org/10.1117/1.JBO.20.5.051021
15. Yao, J., Xia, J., & Wang, L. V. (2016). Multiscale Functional and Molecular Photoacoustic Tomography. *Ultrasonic imaging*, 38(1), 44–62. doi.org/10.1177/0161734615584312
16. Gujrati, V., Mishra, A., & Ntziachristos, V. (2017). Molecular imaging probes for multi-spectral optoacoustic tomography. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 53(34), 4653–4672. https://doi.org/10.1039/c6cc09421j
17. Luís Dean-Ben, X., & Razansky, D. (2018). Localization optoacoustic tomography. *Light, science & applications*, 7, 18004. doi.org/10.1038/lsa.2018.4
18. Karlas, A., Masthoff, M., Kallmayer, M., Helfen, A., Bariotakis, M., Fasoula, N. A., Schäfers, M., Seidensticker, M., Eckstein, H. H., Ntziachristos, V., & Wildgruber, M. (2021). Multispectral optoacoustic tomography of peripheral arterial disease based on muscle hemoglobin gradients—a pilot clinical study. *Annals of translational medicine*, 9(1), 36. doi.org/10.21037/atm-20-3321
19. World Medical Association. (2013) World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 310(20):2191–2194. doi:10.1001/jama.2013.281053
20. Taruttis, A., Timmermans, A. C., Wouters, P. C., Kacprowicz, M., van Dam, G. M., & Ntziachristos, V. (2016). Optoacoustic Imaging of Human Vasculature: Feasibility by Using a Handheld Probe. *Radiology*, 281(1), 256–263. doi.org/10.1148/radiol.2016152160
21. Kneipp, M., Turner, J., Hambauer, S., Krieg, S. M., Lehmborg, J., Lindauer, U., & Razansky, D. (2014). Functional real-time optoacoustic imaging of middle cerebral artery occlusion in mice. *PLoS one*, 9(4), e96118. doi.org/10.1371/journal.pone.0096118
22. van den Berg, P. J., Daoudi, K., & Steenbergen, W. (2015). Review of photoacoustic flow imaging: its current state and its promises. *Photoacoustics*, 3(3), 89–99. doi.org/10.1016/j.pacs.2015.08.001

An overview of violence and sexual abuse in children: global data, policy responses, and multidisciplinary approaches in health care

Uma perspetiva geral da violência e do abuso sexual em crianças: dados globais, respostas políticas e abordagens multidisciplinares no contexto dos cuidados de saúde

Nuno Coelho^{1,2,3}, Anabela Neves⁴, and João Gregório^{1*}

¹CBIOS – Universidade Lusófona’s Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ²Health Sciences PhD Program -U Alcalá, Madrid, Spain; ³Polícia Judiciária, Lisboa, Portugal; ⁴Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF), I.P., Portugal

*corresponding author / autor para correspondência: joao.gregorio@ulusofona.pt

Abstract

News of sexual abuse against children is increasingly common. This paper aims to describe the historical and social progress of sexual violence against children through a narrative review of the literature, with the goal of understanding how health systems deal with sexual violence against children, as well as to identify the costs to society and to children's personal lives. The history and latest global and national data on sexual abuse against children are presented, revealing that violence against children is emerging as an endemic threat worldwide, resulting in serious social and health problems, with higher prevalence in low- and middle-income countries than in high-income countries. In these higher-resource countries, understanding and detecting what is abuse and what is not abuse in a given situation is supported by a multidisciplinary team, involving professionals from different sectors. Thus, it is important that all actors be enabled to articulate their actions, working with the goal of safeguarding well-being and development of children.

Keywords: Child; Sexual abuse; Violence; Health professionals

Resumo

A sociedade é frequentemente confrontada com notícias de abuso sexual contra crianças. Através de uma revisão narrativa da literatura, este artigo pretende descrever o tema e o percurso histórico e social da violência sexual contra crianças, com objetivo de compreender como os sistemas de saúde lidam com a violência sexual contra crianças, bem como identificar os custos para a sociedade e para a vida pessoal das crianças. É apresentada a história e os últimos dados globais e nacionais sobre o abuso sexual contra crianças que nos revelam que a violência contra crianças está a emergir como uma ameaça endémica em todo o mundo, resultando em graves problemas sociais e de saúde, tendendo a ser mais elevada nos países de baixo e médio rendimento do que nos países de alto rendimento. Nestes países de maiores recursos, compreender e detetar o que é abuso e o que não é abuso numa dada situação é suportado por uma equipa multidisciplinar, envolvendo profissionais de setores diversos. Assim, é importante que todos os atores sejam capazes de articular as suas ações, de forma a garantir que o bem-estar da criança e o seu desenvolvimento esteja assegurado.

Palavras-chave: Criança; Abuso sexual; Violência; Profissionais de saúde

Introduction

According to the World Health Organization (WHO), child abuse or maltreatment constitutes “all forms of physical and/or emotional maltreatment, sexual abuse, neglect or negligent treatment or commercial or other exploitation, resulting in actual or potential harm to the Child’s health, survival, development or dignity in the context of a relationship of responsibility, trust or power”(1).

To Carder (2), the sexually abused child develops unique physical, mental and behavioral health weaknesses, with implications for their life course, often resulting in post-traumatic stress disorder. Several studies show that traumatic experiences that occur in the early years of life are directly related to future behaviors, correlating childhood violence and leading causes of mortality in adulthood (3). Thus, childhood sexual abuse is possibly the most severe form of abuse or neglect, due to the identity-destroying nature of the child (4).

There are numerous definitions of what constitutes child abuse, with various terminologies used, such as child sexual abuse, child sexual assault, child sexual victimization, child sexual exploitation, adverse sexual experiences, and unwanted sexual experiences (5). Sexual abuse against children is a common form of violence which has endured throughout the ages. Only very recently this form of abuse has been considered a crime. For most of our human existence, these behaviors were not considered criminal, and often were even allowed. While this is not a new phenomenon, its visibility as a social problem is recent. This visibility has helped reveal the sexual abuse of children that occurs in child support institutions such as schools, youth sports institutions, religious institutions, and other youth support organizations (6).

Most victims of child sexual abuse never disclose the abuse, and as a result do not receive the treatment they need (7). Often they may take many years to seek help due to a lack of trust and emotional safety. When reporting does occur, victims disclose to informal sources of support, such as health care professionals and other support services (8,9). Others carry the trauma of their abuse “to the grave”, although reporting of sexual abuse in childhood has been reported in palliative care, weeks to months before death (10).

Introdução

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), constituem abuso ou maus tratos de crianças “todas as formas de maus tratos físicos e/ou emocionais, abuso sexual, negligência ou tratamento negligente ou exploração comercial ou outra, resultando em danos reais ou potenciais para a saúde, sobrevivência, desenvolvimento ou dignidade da criança no contexto de uma relação de responsabilidade, confiança ou poder” (1).

Para Carder (2), a criança abusada sexualmente desenvolve fraquezas únicas de saúde física, mental e comportamental, com implicações no seu curso de vida, resultando frequentemente em distúrbios de stress pós-traumático. Diversos estudos mostram que as experiências traumáticas que ocorrem nos primeiros anos de vida estão diretamente relacionadas com comportamentos futuros, correlacionando a violência infantil e as principais causas de mortalidade na idade adulta (3). Assim, o abuso sexual infantil é possivelmente a forma mais grave de abuso ou negligência, devido à natureza destrutiva da identidade da criança (4).

Existe uma miríade de definições sobre o que constitui abuso de crianças, com diversas terminologias utilizadas, tais como abuso sexual infantil, agressão sexual infantil, vitimização sexual infantil, exploração sexual infantil, experiências sexuais adversas, e experiências sexuais indesejadas (5). O abuso sexual contra crianças é uma forma comum de violência que perdurou ao longo dos tempos. Só muito recentemente é que esta forma de abuso foi considerada um crime. Durante a maior parte da nossa existência humana, estes comportamentos não eram considerados crimes, e muitas vezes eram mesmo permitidos. Embora não se trate de um fenómeno novo, a sua visibilidade como problema social é recente. Esta visibilidade ajudou a revelar o abuso sexual de crianças que ocorre em instituições de apoio à criança tais como escolas, instituições desportivas juvenis, instituições religiosas e outras organizações de apoio à juventude (6).

A maioria das vítimas de abuso sexual infantil nunca o revela, e como resultado não recebe o tratamento necessário (7). Muitas vezes podem levar muitos anos a procurar ajuda devido a falta de confiança e segurança emocional e, quando a denúncia ocorre, revelam a fontes informais de apoio, tais como profissionais de saúde e outros serviços de apoio (8,9). Outras levam o trauma do seu abuso para a sepultura, embora a denúncia do abuso sexual infantil tenha sido relatada nos cuidados paliativos, semanas a meses antes da morte (10).

Sexual abuse crimes adapt and evolve following the development of social norms and standards, finding a place in the present, in new technologies (e.g., the internet) and in the new forms of criminality that may result from them (11), resulting in high mental and social health consequences, and high economic costs to society (12). The reality of the numbers can be visualized as an iceberg, as they remain shrouded in a culture of silence, hidden by shame, guilt, and social stigma. Moreover, the statistical reality is either under-represented in official figures, or these vary depending on the definitions used and how the information is collected.

Health care providers frequently encounter child victims of sexual abuse. Health care systems play a crucial role in the prevention and care of these victims. Some countries have guidelines or protocols that aim to articulate the roles of different health care and other professionals (e.g., police investigation), but, generally, the development and implementation of these protocols have been slow (13). In addition, the role that individual health care providers can play in curbing violence against children is often not recognized or adequately highlighted.

Thus, this article aims to present the problem of child sexual abuse, starting with a historical contextualization to the latest known data on the subject, and to present the solutions that health systems have developed to mitigate this problem.

Historical Perspective

Child sexual abuse has been a problem of all nations and generations. Research of historical sources reveals the existence of child sexual abuse since ancient times and that State efforts to fight it have always been intense and systematic.

Roman law had defined the age of marriage as 12 for girls and 14 for boys. This law was assimilated by the Byzantine state with the premise that the husband should wait until the underage girl was 12 to have sex. Efforts to control child sexual abuse were based on the annulment of the marriage whenever the law was not followed. Rape, pederasty, and incest took the form of early marriages and state alliances as a way to circumvent the established laws (14).

Os crimes de abuso sexual adaptam-se e evoluem seguindo o desenvolvimento de normas e padrões sociais, encontrando um lugar no presente, nas novas tecnologias (por exemplo, na Internet) e nas novas formas de criminalidade que delas podem resultar (11), trazendo elevadas consequências para a saúde mental e social, e elevados custos económicos para a sociedade (12). A realidade dos números pode ser visualizada como um iceberg, uma vez que estes permanecem envoltos numa cultura de silêncio, escondidos pela vergonha, culpa e estigma social. Além disso, a realidade estatística ou está sub-representada nos números oficiais, ou estes variam dependendo das definições utilizadas e da forma como a informação é recolhida.

Os prestadores de cuidados de saúde encontram frequentemente crianças vítimas de abuso sexual. Os sistemas de saúde têm um papel crucial na prevenção e cuidados a estas vítimas. Alguns países têm diretrizes ou protocolos que visam articular os papéis dos diferentes profissionais de saúde e de outras áreas, mas geralmente o desenvolvimento e a implementação desses protocolos têm sido lentos a progredir (13). Além disso, o papel que cada prestador de cuidados de saúde pode desempenhar para combater a violência contra as crianças não é muitas vezes reconhecido ou devidamente realçado.

Assim, este artigo tem como objetivos apresentar o problema do abuso sexual de crianças, desde uma contextualização histórica até aos últimos dados conhecidos sobre o assunto, e apresentar as soluções que os sistemas de saúde desenvolveram para mitigar este problema.

Perspetiva Histórica

A investigação de fontes históricas revela a existência de abuso sexual de crianças desde a antiguidade e que os esforços do Estado para o combater sempre foram intensos e sistemáticos, pelo que o abuso sexual de crianças tem sido um problema de todas as nações e gerações.

A lei romana tinha definido a idade do casamento como 12 anos para as raparigas e 14 anos para os rapazes. Esta lei foi assimilada pelo Estado bizantino com a premissa de que o marido deveria esperar até que a menor tivesse 12 anos para ter relações sexuais. Os esforços para controlar o abuso sexual infantil baseavam-se na anulação do casamento sempre que a

The concern with education, and living a good childhood, emerged with Ariès (15) in his iconographic work on children, profiling their characteristics since the 12th century. With his work, it was possible to verify the role of children in society at that time, as well as the family and social relationships they maintained, revealing their fragility in the social network and their devaluation, and showing a social discourse that accepted situations of abuse against children. Part of this acceptance was related to the moment when children become physically independent, taking their place in the adult environment, being seen as miniature adults for the delight of adults. Until the 17th century, children were associated with adult sex games, and this practice was part of the customs of the time. In front of them, the adults allowed themselves to do everything: crude words, actions and scabrous situations; the children heard and saw everything (15). However, research on the subject has revealed that this medieval religious society, whose State, with its strict legislation, and the Church, with the spiritual pressures at its disposal, developed efforts to restrict child sexual abuse but failed to eradicate the behavior.

Looking at a child as a child was only possible when various movements, including the social movement for citizenship during the French Revolution of 1789, saw their demands recognized, including the acceptance of citizenship in childhood (16). The ideal of Democracy, at the basis of the French and American Revolution, eventually played a determining role in the construction of the standards of acceptable behavior that led to the conceptualization of childhood and adolescence as developmental periods essential for the maturation of personality. In the early 19th century, a group of church workers in New York, USA, resorted to laws written by the Society for the Prevention of Cruelty to Animals (SPCA) to protect a child (named Mary Ellen) from abuse by her foster parents, claiming that the child was a member of the animal kingdom and should be protected under animal protection laws (17). However, with the evolution of thought and the creation of norms and conduct in modern society from the 19th century onward, sexual activity with children became a highly condemnable crime punishable by imprisonment.

lei não fosse cumprida. Como forma de contornar as leis estabelecidas, a violação, a pederastia e o incesto assumiram a forma de casamentos precoces e alianças estatais (14).

A preocupação com a educação, com deixar viver a infância, são ideias que surgiram com Ariès (15), no seu trabalho iconográfico sobre crianças, tendo traçado um perfil das suas características desde o século XII. Com o seu trabalho, foi possível verificar o papel das crianças na sociedade naquela época, bem como as relações familiares e sociais que mantinham, revelando a sua fragilidade na rede social e a sua desvalorização, mostrando um discurso social que aceitava situações de abuso contra crianças. Parte desta aceitação estava relacionada com o momento em que as crianças se tornam fisicamente independentes, tomando o seu lugar no ambiente adulto, sendo vistas como adultos em miniatura para o deleite dos adultos. Até ao século XVII, as crianças eram associadas aos jogos sexuais dos adultos, e esta prática fazia parte dos costumes da época. À sua frente, os adultos permitiam-se fazer tudo: palavras grosseiras, ações e situações escabrosas; as crianças ouviam e viam tudo (15). No entanto, a investigação sobre o tema elucidou que essa sociedade religiosa medieval, cujo Estado, com a sua legislação rigorosa e a Igreja, com as pressões espirituais à sua disposição, desenvolveram esforços para restringir comportamentos de abuso sexual infantil que não conseguiram erradicar este tipo de comportamento.

Olhar para uma criança, como uma criança, só foi possível quando vários movimentos, incluindo o movimento social pela cidadania durante a Revolução Francesa de 1789, viram as suas reivindicações reconhecidas, incluindo a aceitação da cidadania na infância (16). O ideal da Democracia, na base da Revolução Francesa e Americana, acabou por desempenhar um papel determinante na construção dos padrões de comportamentos aceitáveis que levaram à conceptualização da infância e da adolescência como períodos de desenvolvimento imprescindíveis para a maturação da personalidade. No início do século XIX, um grupo de trabalhadores da igreja em Nova Iorque, EUA, teve de recorrer a leis escritas pela *Society for the Prevention of Cruelty to Animals* para proteger a criança Mary Ellen dos abusos dos seus pais adotivos, alegando que a criança era um membro do reino animal e deveria ser protegida ao abrigo das leis de proteção dos animais (17). Contudo, com a evolução do pensamento e a criação de normas e condutas na sociedade moderna a partir do século XIX, a atividade sexual com crianças tornou-se um crime altamente condenável e punível com prisão.

Current Knowledge & Policies

Currently, the WHO defines violence as “the intentional use of physical force or power, actual or threatened, against oneself, another person, or against a group or community, that results in or is likely to result in injury, death, psychological harm, developmental disability or deprivation” (1).

Depending on their age, a child may experience one or more types of violence (Figure 1). It is estimated that one in two children aged 2-17 experience some form of violence each year, and approximately 300 million children aged 2-4 experience regular violence at the hands of their caregivers (12). In addition, it is estimated that by early 2020, one-third of 11- to 15-year-olds worldwide will have been bullied by their peers and that 120 million girls will have experienced some form of forced sexual contact before the age of 20 (12).

Violence against children is emerging as an endemic threat worldwide (18), resulting in severe health and social problems (Figure 2) (19–23). The existence of violence against children can cause traumatic events called Adverse Childhood Experiences, and impact of these events will be reflected in future perpetration of violence and victimization, as well as in health status (24). Some meta-analyses have shown that approximately 23% of children have experienced physical abuse, 36.3% have experienced emotional abuse, and 13% of children worldwide have experienced sexual abuse (25–27). Worldwide, rates of violence against children are highest in Africa, Asia, and North America. In 2015, approximately 50% of children in these continents experienced violence (3). The prevalence of violence tends to be higher in low- and middle-income countries

Conhecimentos e Políticas Atuais

Atualmente, a OMS define violência como “o uso intencional de força ou poder físico, real ou ameaçado, contra si próprio, outra pessoa, ou contra um grupo ou comunidade, que resulta ou é suscetível de resultar em ferimentos, morte, danos psicológicos, incapacidade de desenvolvimento ou privação”(1).

De acordo com a idade, uma criança pode experimentar um ou mais tipos de violência (figura 1). Estima-se que uma em cada duas crianças de 2 a 17 anos sofre alguma forma de violência todos os anos, e cerca de 300 milhões de crianças de 2 a 4 anos sofrem violência regular às mãos dos seus cuidadores (12). Além disso, estima-se que no início de 2020, um terço das crianças de 11 a 15 anos de idade em todo o mundo terá sido intimidado pelos seus pares e que 120 milhões de raparigas tenham experimentado alguma forma de contacto sexual forçado antes dos 20 anos de idade (12).

A violência contra crianças está a emergir como uma ameaça endémica em todo o mundo (18), resultando em graves problemas sociais e de saúde (Figura 2) (19–23). A existência de violência contra crianças pode causar eventos traumáticos chamados Experiências Adversas da Infância, cujo impacto se refletirá na vitimização e perpetração futura de violência, bem como na saúde (24). Algumas meta-análises mostraram que aproximadamente 23% das crianças sofreram abuso físico, 36,3% sofreram abuso emocional e 13% das crianças em todo o mundo sofreram abuso sexual (25–27). A nível mundial, as taxas de violência contra crianças são mais elevadas em África, na Ásia e na América do Norte, com cerca de 50% das crianças em 2015 a serem vítimas de violência (3). A prevalência

Age / Idade (in years / em anos)	<5	5-10	11-17	≥18
Types of violence / Tipo de violência	Child maltreatment / Maus-tratos a crianças			
	Bullying			
	Youth violence / Violência Juvenil			
	Intimate partner violence / Violência infligida por parceiro íntimo			
	Sexual Violence / Violência Sexual			
	Emotional or psychological violence and witnessing violence / Violência emocional ou psicológica e testemunhar violência			

Source: Adapted from INSPIRE: Seven strategies for Ending Violence Against Children. Washington, D.C.: PAHO, 2017 /
Fonte: Adaptado de INSPIRE. Sete estratégias para por fim à violência contra crianças. Washington, D.C.: OPAS, 2017.

Figure 1 - Type of violence by age group affected.

Figura 1 - Tipo de violência por faixa etária.

than in high-income countries (28,29). The highest prevalence of child sexual abuse is found in the African continent (34.4%), while in Europe, the prevalence is much lower (9.2%) (30). More than 80% of children in the world live in low- and middle-income countries (31), with a marked difference in demographic profiles. According to the WHO (32), over 94% of DALYs* due to interpersonal violence against children aged 0-15 years occurred in low- and middle-income countries in 2016. The investment made by these countries in social protection policies for children (0-14 years) is lower than in high-income countries (33). Sociodemographic factors associated with sexual and emotional violence include lower socioeconomic status of the household, being female, and the primary education of mothers and adults in the household (34).

de violência tende a ser mais elevada nos países de baixo e médio rendimento do que nos países de alto rendimento (28,29), sendo observável que a maior taxa de prevalência de abuso sexual de crianças se verifica no continente africano (34,4%), enquanto na Europa, a taxa de prevalência é mais baixa (9,2%)(30). Mais de 80% das crianças no mundo residem em países de baixo e médio rendimento (31), com uma marcada diferença nos perfis demográficos. Segundo a OMS (32), mais de 94% dos DALYs* devido à violência interpessoal contra crianças de 0-15 anos, ocorreu em países de baixo e médio rendimento em 2016. O investimento feito por estes países em políticas de proteção social para crianças (0-14 anos) é mais baixo do que nos países de alto rendimento (33). Entre os fatores sociodemográficos associados à violência sexual e emocional encontra-se o estatuto socioeconómico inferior do agregado familiar, o facto de ser rapariga, e a educação primária das mães e dos adultos do agregado familiar (34).

*DALY (disability-adjusted life years) combines estimates of years of life lost to premature death (YLL, years of life lost) and years of life lost to illness and/or disability (YLD, years of life with disability).

*Este indicador (DALY, anos de vida ajustados por deficiência) combina estimativas de anos de vida perdidos até à morte prematura (YLL, anos de vida perdidos) e anos de vida perdidos por doença e/ou deficiência (YLD, anos de vida com deficiência).

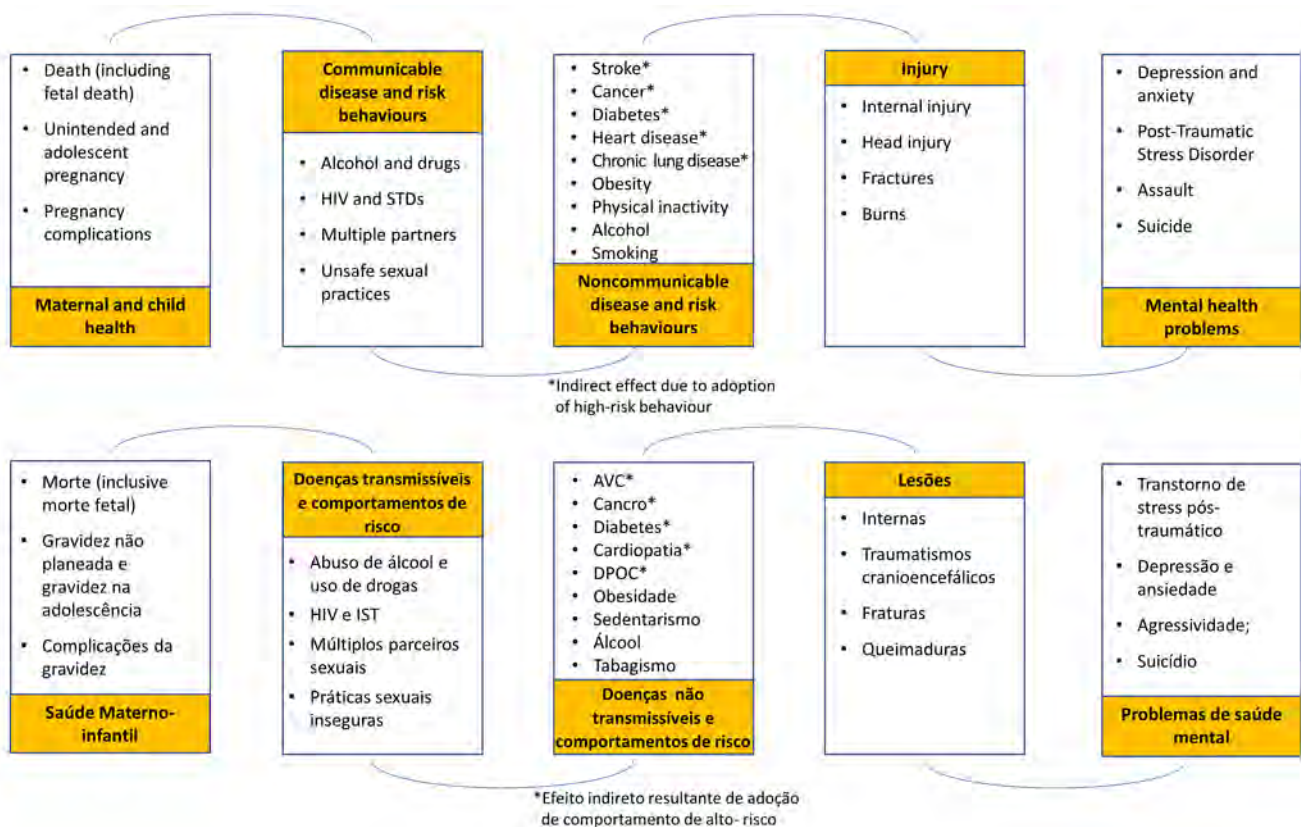


Figure 2 - Potential health consequences of violence against children.
Figura 2 - Possíveis consequências para a saúde da violência contra crianças

The Convention on the Rights of the Child defines in particular that "the child, because of his physical and intellectual immaturity, needs special protection and care, including appropriate legal protection, both before and after birth" and therefore a safe and happy family environment must be ensured for the proper development of their personality (35). It has also been defined in the Convention that a Child is every human below the age of 18 years unless, under the law applicable to them, they reach adulthood earlier. With the publication of the 2002 World Report on Violence and Health, the worldwide visibility of sexual violence crimes against children has increased. It is now recognized that it is the responsibility of the State to protect the child from all forms of maltreatment by parents or others responsible for the child, and to establish social programs for the prevention of abuse and for the treatment of victims (36). Because of its importance, it was recently as (UN) Sustainable Development Goal 16.2, which aims to end all forms of violence against children by 2030 (37).

According to the United Nations Children's Emergency Fund (UNICEF), child protection is done through philosophies, policies, standards, guidelines, and procedures to protect children from intentional and unintentional harm. In that sense, the responses to build the national child protection system are broad and include legislative reforms, strategy development and planning, coordination, mapping of needs and gaps in services, capacity building and development of service structures, acting to change attitudes and behaviors (36).

Another policy to curb violence against children was presented by the WHO in 2016, with the publication of seven strategies with the acronym INSPIRE: **I**mplementation and enforcement of laws; **N**orms and values; **S**afe environments; **P**arent and caregiver support; **I**ncome and economic strengthening; **R**esponse and support services; and **E**ducation and life skills (38).

In 2007, the Council of Europe indicated the importance of the topic with the organization of a convention with special standards to prevent and protect children from sexual exploitation and sexual abuse: the "Council of Europe Convention on the Protection of Children against Sexual Exploitation and Sexual Abuse", which became known as the Lanzarote convention (39).

A Convenção sobre os Direitos da Criança define em particular que "a criança, devido à sua imaturidade física e intelectual, necessita de proteção e cuidados especiais, incluindo proteção jurídica adequada, tanto antes como depois do nascimento", pelo que deve-se assegurar um ambiente familiar seguro e feliz para o desenvolvimento adequado da sua personalidade (35). Foi também definido nesta Convenção que uma Criança é todo o ser humano com menos de 18 anos de idade, a menos que, nos termos da lei que lhe é aplicável, atinja a maioria mais cedo. Com a publicação do Relatório Mundial sobre Violência e Saúde de 2002, a visibilidade mundial dos crimes de violência sexual contra crianças aumentou. Reconhece-se agora que é responsabilidade do Estado proteger a criança de todas as formas de maus-tratos por parte dos pais ou outros responsáveis pela criança, e estabelecer programas sociais para a prevenção de abusos e para o tratamento das vítimas (36). Devido à sua importância, foi recentemente consagrado no Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 16.2, que visa acabar com todas as formas de violência contra crianças até 2030 (37).

De acordo com o Fundo de Emergência das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) a proteção infantil faz-se através de Filosofias, políticas, padrões, diretrizes e procedimentos para proteger crianças de danos intencionais e não intencionais e nesse sentido, as respostas de construção do sistema nacional de proteção à criança são amplas e incluem: reformas legislativas; desenvolvimento e planeamento de estratégias; coordenação; mapeamento de necessidades e lacunas nos serviços; capacitação e desenvolvimento de estruturas dos serviços; atuação para mudar atitudes e comportamentos (36).

Outra política de combate à violência contra crianças foi apresentada pela OMS em 2016, com a publicação de sete estratégias com o acrónimo INSPIRE: **I**mplementação e vigilância do cumprimento das leis; **N**ormas e valores; **S**egurança do ambiente; **P**ais, mães e cuidadores recebem apoio; **I**ncremento de renda e fortalecimento económico; **R**esposta de serviços de atenção e apoio; e **E**ducação e habilidades para a vida (38).

Em 2007 o Conselho da Europa considerou importante elaborar uma convenção com normas especiais para prevenir e proteger as crianças contra a exploração sexual e os abusos sexuais: a "Convenção do Conselho da Europa para a Proteção das Crianças contra a Exploração Sexual e os Abusos Sexuais", que ficou conhecida como a convenção de Lanzarote (39).

The Comparing Sexual Assault Interventions (COSAI) project was also created in Europe with funding from the European Union (EU) through the DAPHNE III program, with the aim of improving services for victims of sexual abuse (40). This project has mapped national strategies in 34 European countries, presenting evidence that of the 34 countries, 11 (33%) have protocols and strategies that address sexual violence, while 7 (20.5%) have no protocols or strategies implemented that address sexual violence against women over 16 (40). This finding is not surprising, since in the Global Report on Preventing Violence Against Children 2020 (12), is reported that although most countries present some kind of law to protect children against violence, about half of these countries declare that those laws are not heavily enforced.

In Portugal, sexual crimes were viewed as crimes against freedom and against the sexual self-determination of the person only after 1995 (41). Currently child protection policies in Portugal are assisted via the Comissão Nacional de Promoção dos Direitos e Proteção das Crianças e Jovens (42) and the health programs of Direção Geral de Saúde (43,44) with the goals of early detection and intervention of children at risk of violence and sexual abuse.

A culture of acceptance of interpersonal violence against family members and other close acquaintances still prevails in some social circles, keeping the rates of this type of crime high (45).

In the first six months of 2018, five children were victims of sexual crimes and more than one rape was reported per 24 hours (46). According to investigative police sources cited by Moreira (46), of the 1,518 cases related to sexual abuse and coercion, pimping, pornography, prostitution, or rape, 885 involved children and adolescents and that most were perpetrated by family members or someone close. After child sexual abuse (665 cases), rape (231 cases) and sexual harassment (97 cases) top the list of the most committed (reported) sexual crimes, followed by sexual acts with teenagers (83 cases). According to data from the Portuguese Association for Victim Support (APAV) (47), in 2018, a total of 46,371 attendances were recorded, a 31% increase compared to 2016. These attendances reflect 11,795 new cases and cases in follow-up, where it was possible to identify 9,344 victims and 20,589 crimes and other forms of violence. These results are not different from the figures on a global scale (48), referring that women, children and the elderly suffer the most physical, psychological and sexual abuse.

Ainda na Europa foi criado o projeto Comparing Sexual Assault Interventions (COSAI), com financiamento da União Europeia (UE) através do programa DAPHNE III, com o objetivo de melhorar os serviços envolvidos com vítimas de abusos sexuais (40). Ainda a mesma fonte e após um mapeamento de estratégias nacionais em 34 países europeus, verifica-se que dos 34 países, 11 (33%) têm protocolos e estratégias que abordam violência sexual e 7 (20,5%) não têm protocolos e estratégias implementadas que abordam a violência sexual contra mulheres com mais de 16 anos (40). Esta descoberta não é surpreendente, uma vez que no Relatório Global sobre a Prevenção da Violência contra Crianças 2020 (12), é já relatado que embora a maioria dos países apresentem algum tipo de lei para proteger as crianças contra a violência, cerca de metade desses países declaram que essas leis não são fortemente aplicadas.

Em Portugal, só a partir de 1995 (41), é que os crimes sexuais são vistos como crimes contra a liberdade e contra a autodeterminação sexual da pessoa. Presentemente assistimos a políticas de proteção à criança como é o caso da Comissão Nacional de Promoção dos Direitos e Proteção das Crianças e Jovens (42), e os Programas de Saúde da Direção Geral de Saúde (43,44), no âmbito da deteção e intervenção de crianças em risco.

Uma cultura de aceitação da violência interpessoal contra familiares e outras pessoas próximas ainda prevalece em alguns círculos sociais, mantendo as taxas deste tipo de crime elevadas (45).

Nos primeiros seis meses de 2018, todos os dias, cinco crianças foram vítimas de crimes sexuais e mais de uma violação por 24 horas era registada (46). Segundo fontes policiais de investigação citadas por Moreira (46), dos 1.518 casos relacionados com abuso sexual e coação, proxenetismo, pornografia, prostituição ou violação, 885 envolveram crianças e adolescentes e a maioria foi perpetrada por membros da família ou por alguém próximo. Após o abuso sexual infantil (665 casos), a violação (231 casos) e o assédio sexual (97 casos) ocupam o pódio da lista dos crimes sexuais mais cometidos, seguido de atos sexuais com adolescentes (83 casos). De acordo com dados da Associação Portuguesa de Apoio à Vítima (APAV)(47), em 2018, foram registados um total de 46.371 atendimentos, o que resultou num aumento de 31% em relação a 2016. Estes atendimentos refletem 11.795 novos casos e casos em acompanhamento, onde foi possível identificar 9.344 vítimas e 20.589 crimes e outras formas de violência. Estes resultados não são diferentes dos números à escala global (48), referindo que as mulheres, as crianças e os idosos são os que mais sofrem abusos físicos, psicológicos e sexuais.

Table 1 - Warning signs to be evaluated by health professionals for the detection of child maltreatment (Source: Direcção-Geral da Saúde) (44)).

Tabela 1 - Sinais de alerta a valorizar profissionais de saúde para deteção de maus tratos em crianças (Fonte: Direcção-Geral da Saúde (44)).

From 0 to 5 years old / Dos 0 aos 5 anos
Feeding disturbances / Perturbações na alimentação
Sleep disturbances / Perturbações do sono
Behavior and relationship disturbances / Perturbações do comportamento e da relação
Psychomotor development disturbances / Perturbações do desenvolvimento psicomotor
Fear and/or phobias of minor intensity / Medo e/ou fobias de pequena intensidade
Children aged > 5 years / Crianças com idade > 5 anos
School difficulties/underachievement / Dificuldades/insucesso escolar
Relationship/communication disorders / Perturbações da relação/comunicação
Behavior disorders / Perturbações do comportamento
Anxiety / Ansiedade
Emotional disorders (sadness, fatigue, aggression) / Perturbações emocionais (tristeza, fadiga, agressividade)
Somatic manifestations / Manifestações somáticas
Eating disorders / Perturbações do comportamento alimentar
Psychotic disorders / Perturbações psicóticas
Adolescent substance abuse / Abuso de substâncias tóxicas nos adolescentes

Health systems and the role of professionals in dealing with victims of child abuse

Health professionals, as frontline health care providers for children, play an extremely important role in the detection of these crimes, and therefore should value the main warning signs for the detection of child maltreatment (Table 1) (44).

The approach, treatment, and care of child victims of sexual abuse begin with the medical intervention for the treatment of injuries, prevention of unwanted pregnancy, diagnosis and treatment of sexually transmitted infections (49) maltreatment and sexual crimes. The victim should be subsequently referred to psychosocial support to help cope with the traumatic episode, ensuring the safety and protection of the victim and with the support of the criminal system in the investigation of the crime, collection of evidence, trial, and punishment of the perpetrator. Collecting trace evidence and recording injuries that may exist is done by forensic medicine experts (50).

Os sistemas de saúde e o papel dos profissionais na abordagem às vítimas de abuso infantil

Os profissionais de saúde, como elementos na linha da frente para prestação de cuidados de saúde a crianças, desempenham um papel de enorme relevância na deteção destes crimes, e por isso devem valorizar os principais sinais de alerta para a deteção de maus tratos em crianças (Tabela 1) (44).

A abordagem, o tratamento e o cuidado a crianças vítimas de abuso sexual inicia-se com a intervenção médica no tratamento de lesões, prevenção de gravidez indesejada, diagnóstico e tratamento de infeções sexualmente transmissíveis (49), maltreatment and sexual crimes. Depois deve a vítima ser encaminhada para o apoio psicossocial para ajudar a lidar com o episódio traumático e garantir a segurança e proteção da vítima e ter o apoio do sistema criminal na investigação do crime, na recolha de vestígios, julgamento e punição do autor. A recolha de vestígios e o registo de possíveis lesões que possam ter existido faz-se pelos peritos forenses da medicina legal (50).

Understanding and detecting what is and is not abuse in a given situation then requires multidisciplinary work. Thus, coordinated action between different family doctors, pediatricians, childhood and adolescent psychiatry doctors, psychologists, family nurses, forensic nurses, the investigative police, and the courts is essential. For this reason, it is important that all actors are able to articulate actions so that the well-being of the child or young person is guaranteed, avoiding interventions that lead to secondary victimization (51). It should also be noted that other professionals can intervene, such as educators and teachers, due to their direct contact with children (52–55).

Historically, the reality of the response of the legal, medical, mental health, and social support teams to victims of sexual assault has been uncoordinated. These systems respond in isolation to survivors of sexual assault, with role confusion and/or conflict between the different actors about who should do what and when to respond to the assault. In order to find solutions to this problem, North American communities have developed Sexual Assault Response Teams (SARTs), a model which was quickly spread around the world, for example, in the United Kingdom, with the creation of the so-called SARCs (Sexual Assault Referral Centres). These teams and centers intervene in the community and aim to build positive professional relationships and increase collaboration between stakeholders in response to sexual violence, improving the procedural effectiveness of sexual assault cases in the courts.

The core team of the SARTs includes police officers, prosecutors, physicians, social workers and Sexual Assault Nurse Examiners (SANE), and in this context, these SANE are usually the first specialized line of contact with sexual assault victims in the health care system (56). SANE are a specialty of forensic nursing. Forensic nursing originated in the United States, later expanding to countries including England, Canada, Australia, and Northern Europe (57). Forensic nurses are at the front line of contact with the victims of sexual abuse. They also have an important role in educating parents, community members, and other healthcare professionals about sexual abuse (58). The goal of the SANE is to protect the sexual assault victim from secondary victimization; intervene in crisis situations; collect documentation and preserve evidence, evaluate and prophylactically treat sexually transmitted diseases (STDs), assess pregnancy risk and offer prevention, evaluate, document and provide care

Compreender e detetar o que é abuso e o que não é abuso numa dada situação requer então um trabalho multidisciplinar. É, assim, fundamental uma ação coordenada entre médicos de família, médicos pediatras, médicos de psiquiatria da infância e adolescência, psicólogos, enfermeiros de família, enfermeiros forenses, a polícia de investigação e os tribunais. Por esta razão, é importante que todos os atores sejam capazes de articular ações para que o bem-estar da criança ou do jovem seja garantido, evitando intervenções que conduzam à vitimização secundária (51). Deve também notar-se que outros profissionais podem intervir, tais como educadores e professores devido ao seu contacto direto com as crianças (52–55).

Historicamente, a realidade da resposta dos sistemas legal, médico e de saúde mental e equipas de apoio às vítimas de agressão sexual têm sido descoordenadas, pois os sistemas respondem isoladamente perante sobreviventes de agressão sexual, bem como a constatação de confusão de papéis e/ou conflitos entre os diferentes sistemas sobre quem deve fazer o quê e quando responder à agressão. Com a intenção de encontrar soluções para este problema, as comunidades norte-Americanas desenvolveram equipas de resposta à agressão sexual (SARTs), cujo modelo foi rapidamente difundido pelo mundo, por exemplo, no Reino Unido, com a criação das denominadas SARCs (Sexual Assault Referral Centre). Estas equipas e centros intervêm na comunidade e pretendem construir relações profissionais positivas e aumentar a colaboração entre os intervenientes na resposta à violência sexual, melhorando a eficácia processual de casos de agressão sexual na justiça.

Da equipa central dos SARTs fazem parte, polícias, procuradores, médicos, assistentes sociais e os Sexual Assault Nurse Examiner (SANE), e nesse contexto, são estes SANE usualmente a primeira linha especializada de contacto com vítimas de abuso sexual no sistema de saúde (56). Os SANE são uma especialidade da enfermagem forense. A enfermagem forense teve a sua origem nos Estados Unidos, expandindo-se mais tarde para países como Inglaterra, Canadá, Austrália e norte da Europa (57). Os enfermeiros forenses estão na linha da frente no contato com a vítima de abuso sexual. Têm também um papel importante na educação dos pais, membros da comunidade, e outros profissionais de saúde relativamente ao abuso sexual (58). O objetivo do SANE é proteger a vítima de agressão sexual de vitimização secundária; intervir em situações de crise; recolher documentação e preservação dos vestígios, avaliar e tratar profilaticamente de doenças sexualmente

for injuries, appropriately refer victims for medical and psychological follow-up, and work to increase conviction success in sexual assault cases. A SANE program provides 24 hour emergency services for all victims of sexual assault or abuse.

In Portugal, the SARTs teams are not yet a reality, despite the existence of the necessary resources for a multidisciplinary approach to the victim, because in the (hospital) emergency department, other professionals are involved along with doctors and nurses, such as social workers, criminal police bodies and experts from the National Institute of Forensic Medicine and Sciences (INMLCF) and psychologists. In fact, it is with the nurse at the triage of the Pediatric Emergency Department (UP) that the first contact with the health professional takes place, and the victim is subsequently referred to the pediatrician in charge of the team (59). Some data from the study of Vasconcelos et al. (59) reveals that in 31% of the cases, the first observation of the genitals was performed by the pediatrician at the UP and in 5.5% of cases by Gynecology; 70% of the cases were sent to the INMLCF for observation. Social Services took charge of the child in most of the cases (89%), studying and guiding the child; the Commission for the Protection of Children and Youngsters at Risk received referral in 63.7% of the cases; only 3% received support from Psychology. Finally, only 41% of the situations were reported to the police.

It is important to highlight the need for specific training for multidisciplinary teams working in this area to properly assess and address child sexual abuse. In fact, it is often the lack of professional training which limits the scope of action of nurses in the detection of sexual abuse preventing a timely intervention in these situations. Furthermore, interaction with police inspector teams also needs to be improved, as practices show that little or nothing is done to meet the needs of the investigation and that police inspectors often face contamination or destruction of evidence due to the procedures performed by emergency medical teams in providing assistance to victims (60).

transmissíveis (DSTs), avaliar o risco de gravidez e oferecer prevenção, avaliar, documentar e prestar cuidados em lesões, encaminhar adequadamente as vítimas para acompanhamento médico e psicológico, aumentar o sucesso de condenações nos casos de agressão sexual. Um programa SANE oferece serviços de urgência 24/24 horas para todas as vítimas de agressão sexual ou abuso.

Em Portugal, as equipas SARTs ainda não são uma realidade, não obstante a existência dos recursos necessários a uma abordagem multidisciplinar à vítima, pois no serviço de urgência, para além de médicos e enfermeiros, outros profissionais estão envolvidos, como os assistentes sociais, os órgãos de polícia criminal e os peritos do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF) e psicólogos. De facto, verifica-se que é com o enfermeiro na triagem da Urgência Pediátrica (UP) que se dá o primeiro contato com o profissional de saúde, sendo posteriormente encaminhado para o pediatra chefe de equipa (59). Alguns dados do estudo realizado por Vasconcelos et al., (59) revelam que em 31% das situações a primeira observação dos genitais foi realizada pelo pediatra da UP e em 5,5% pela Ginecologia; 70% dos casos foram enviados ao INMLCF para observação. O Serviço Social, tomou a seu cargo a criança na maior parte dos casos (89%) estudando e orientando a criança; a Comissão de Proteção de Crianças e Jovens em risco recebeu referência em 63,7% dos casos; apenas 3% receberam apoio da psicologia. Por fim, apenas em 41% das situações houve denuncia junto das entidades policiais.

De realçar a necessidade de formação específica para avaliar e abordar adequadamente o abuso sexual infantil, das equipas multidisciplinares que atuam nesta área. Na realidade, é frequentemente a falta de formação profissional que limita o âmbito de ação dos enfermeiros na deteção do abuso sexual, impedindo uma intervenção atempada nestas situações. Além disso, a interação com as equipas de inspetores policiais também precisa de ser melhorada, pois as práticas mostram que pouco ou nada é feito para satisfazer as necessidades da investigação e que, na maioria das vezes, os inspetores da polícia são confrontados com a contaminação ou destruição de provas, devido aos procedimentos realizados pelas equipas de emergência médica na prestação de assistência às vítimas (60).

The recognition of Forensic Nursing as a differentiated nursing specialty is a very recent reality in Portugal (61). However, it is a topic that most nurses are aware of, even if there are still few nurses who have training in the area (62). Therefore, for the practice of SARTs teams with SANE-type nurses to be implemented in Portugal, it is necessary to provide nurses with forensic skills or knowledge of forensic sciences so that their application in clinical practice can be effective, in order to ensure an effective response to the victims of sexual abuse. Furthermore, it is also necessary to investigate how to best integrate these professionals into the current health care and victim support system in the Portuguese context.

Conclusion

Given the current reality, we conclude that child sexual abuse is a problem that cuts across societies and spills over borders imposed by different cultures. Although over the last few years, much has been done to help the victims, with the review, creation and implementation of different measures aimed at their protection, there is still a long way to go.

The complexity of this situation entails serious short- and long-term consequences, affecting not only children but also their caregivers, with high costs to economies, judicial systems, and societies. Health care systems and health care professionals can play an important role in both the prevention and detection of child sexual abuse. In this sense, further research in this area becomes a priority to make it possible to know which organizational and/or legislative measures should be implemented to improve the interaction between health professionals, social action professionals, and police investigators, in order to ensure an effective response to victims of sexual abuse.

Authors Contributions Statement

NC and JG, conceptualization and study design; NC, data analysis; NC, JG and AN, drafting, editing and reviewing; NC, figures and graphics; JG, supervision and final writing.

O reconhecimento da Enfermagem Forense como especialidade diferenciada de enfermagem é uma realidade muito recente em Portugal (61). No entanto é um tema de que a maioria dos enfermeiros já ouviu falar, mas ainda são poucos os que têm formação na área (62). Por conseguinte, para que a prática de equipas SARTs com enfermeiros tipo SANE possa ser implementada em Portugal, é necessário proporcionar aos enfermeiros competências forenses ou conhecimentos de ciências forenses para que a sua aplicação na prática clínica possa ser eficaz, a fim de assegurar uma resposta eficaz às vítimas de abuso sexual. Além disso, é igualmente necessário investigar qual a melhor forma de integração destes profissionais no atual sistema de cuidados de saúde e de apoio à vítima no contexto português.

Conclusão

Face a esta realidade, concluímos que o abuso sexual infantil é um problema que atravessa as sociedades e transborda as fronteiras impostas pelas diferentes culturas. Embora ao longo dos últimos anos, muito se tenha feito em prol das vítimas, com a revisão, criação e implementação de diferentes medidas que visam a sua proteção, ainda existe um longo caminho para desbravar.

A sua complexidade implica graves consequências a curto e longo prazo, que afetam não só as crianças, mas também os seus cuidadores, com elevados custos para as economias e sistemas judiciais e sociedades. Os sistemas de saúde, e os profissionais de saúde podem desempenhar um papel importante tanto na prevenção como na deteção do abuso sexual infantil, e nesse sentido torna-se prioritário mais investigação nesta área, para permitir conhecer que medidas organizacionais e/ou legislativas devem ser implementadas para melhorar a interação entre profissionais de saúde, de ação social e investigadores policiais, a fim de assegurar uma resposta eficaz às vítimas de abuso sexual.

Declaração sobre as contribuições do autor

NC e JG, conceção e desenho do estudo; NC, análise de dados; NC, JG e AN, redação, edição e revisão; NC, figuras e gráficos; JG, supervisão e redação final.

Funding

This study funded by national funds through FCT - Foundation for Science and Technology, I.P., under the UIDB/04567/2020 and UIDP/ 04567/2020 projects. João Gregório is funded by Foundation for Science and Technology (FCT) Scientific Employment Stimulus contract with the reference number CEEC/CBIOS/EPH/2018

Conflict of Interests

The authors declare there are no financial and/or personal relationships that could present a potential conflict of interests.

Financiamento

Este estudo foi financiado por fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., no âmbito dos projetos UIDB / 04567/2020 e UIDP / 04567/2020. João Gregório é financiado pelo contrato de Estímulo ao Emprego Científico da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) com o número de referência CEEC / CBIOS / EPH / 2018

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não há relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

1. WHO. (2002). *World report on violence and health*. doi:10.1007/bf03405037
2. Carder J. (2019). When a Childhood Sexual Abuse History Influences Patient Trust. *The American journal of nursing*, 119(10), 11. <https://doi.org/10.1097/01.NAJ.0000586088.17746.87>
3. Hillis, S., Mercy, J., Amobi, A., & Kress, H. (2016). Global Prevalence of Past-year Violence Against Children: A Systematic Review and Minimum Estimates. *Pediatrics*, 137(3), e20154079. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-4079>
4. Drury, A. J., Elbert, M. J., & DeLisi, M. (2019). Childhood sexual abuse is significantly associated with subsequent sexual offending: New evidence among federal correctional clients. *Child abuse & neglect*, 95, 104035. <https://doi.org/10.1016/j.chiabu.2019.104035>
5. Mathews, B., & Collin-Vézina, D. (2019). Toward a Conceptual Model and Definition. *Trauma, violence & abuse*, 20(2), 131–148. <https://doi.org/10.1177/1524838017738726>
6. Harris, A. J., & Terry, K. J. (2019). Child Sexual Abuse in Organizational Settings: A Research Framework to Advance Policy and Practice. *Sexual abuse : a journal of research and treatment*, 31(6), 635–642. <https://doi.org/10.1177/1079063219858144>
7. Hornor, G., & Zeno, R. (2018). Child Sexual Abuse Perpetrators: What Forensic Nurses Need to Know. *Journal of forensic nursing*, 14(4), 206–213. <https://doi.org/10.1097/JFN.0000000000000222>
8. Cleary, M., West, S., McLean, L., Kezelman, C., Karacsony, S., & Kornhaber, R. (2018). Connecting past and present: Nurses' role in identifying signs of child sexual abuse in adults and supporting survivors. *International journal of mental health nursing*, 27(6), 1587–1591. <https://doi.org/10.1111/inm.12495>
9. Starzynski, L. L., Ullman, S. E., & Vasquez, A. L. (2017). Sexual Assault Survivors' Experiences with Mental Health Professionals: A Qualitative Study. *Women & therapy*, 40(1-2), 228–246. <https://doi.org/10.1080/02703149.2016.121360>
10. Wygant, C., Hui, D., & Bruera, E. (2011). Childhood sexual abuse in advanced cancer patients in the palliative care setting. *Journal of pain and symptom management*, 42(2), 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2010.11.011>
11. Almeida, A. Abuso sexual de crianças: Crenças sociais e discursos da Psicologia. (2003)
12. WHO. *Global status report on preventing violence against children*. (World Health Organization, 2020).
13. García-Moreno, C., Hegarty, K., d'Oliveira, A. F., Koziol-McLain, J., Colombini, M., & Feder, G. (2015). The health-systems response to violence against women. *Lancet (London, England)*, 385(9977), 1567–1579. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61837-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61837-7)
14. Lascaratos, J., & Poulakou-Rebelakou, E. (2000). Child sexual abuse: historical cases in the Byzantine empire (324-1453 A.D.). *Child abuse & neglect*, 24(8), 1085–1090. [https://doi.org/10.1016/s0145-2134\(00\)00156-3](https://doi.org/10.1016/s0145-2134(00)00156-3)
15. Ariès, P. *História Social da Criança e da Família*. (1986).
16. Minayo, MC de S. (2001). Violência contra crianças e adolescentes: questão social, questão de saúde. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, 1, 91–102
17. Holter J. C. (1979). Child abuse. *The Nursing clinics of North America*, 14(3), 417–427.
18. Veenema, T. G., Thornton, C. P., & Corley, A. (2015). The public health crisis of child sexual abuse in low and middle income countries: an integrative review of the literature. *International journal of nursing studies*, 52(4), 864–881. <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2014.10.017>
19. Anda, R. F., Felitti, V. J., Bremner, J. D., Walker, J. D., Whitfield, C., Perry, B. D., Dube, S. R., & Giles, W. H. (2006). The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood. A convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 256(3), 174–186. <https://doi.org/10.1007/s00406-005-0624-4>
20. Dunn, E. C., McLaughlin, K. A., Slopen, N., Rosand, J., & Smoller, J. W. (2013). Developmental timing of child maltreatment and symptoms of depression and suicidal ideation in young adulthood: results from the National Longitudinal Study of Adolescent Health. *Depression and anxiety*, 30(10), 955–964. <https://doi.org/10.1002/da.22102>
21. Fulu, E., Miedema, S., Roselli, T., McCook, S., Chan, K. L., Haardörfer, R., Jewkes, R., & UN Multi-country Study on Men and Violence study team (2017). Pathways between childhood trauma, intimate partner violence, and harsh parenting: findings from the UN Multi-country Study on Men and Violence in Asia and the Pacific. *The Lancet. Global health*, 5(5), e512–e522. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30103-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30103-1)
22. Hughes, K., Bellis, M. A., Hardcastle, K. A., Sethi, D., Butchart, A., Mikton, C., Jones, L., & Dunne, M. P. (2017). The effect of multiple adverse childhood experiences on health: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Public health*, 2(8), e356–e366. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(17\)30118-4](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(17)30118-4)
23. Jovanovic, T., Vance, L. A., Cross, D., Knight, A. K., Kilaru, V., Michopoulos, V., Klengel, T., & Smith, A. K. (2017). Exposure to Violence Accelerates Epigenetic Aging in Children. *Scientific reports*, 7(1), 8962. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09235-9>
24. Struck, S., Stewart-Tufescu, A., Asmundson, A., Asmundson, G., & Afifi, T. O. (2021). Adverse childhood experiences (ACEs) research: A bibliometric analysis of publication trends over the first 20 years. *Child abuse & neglect*, 112, 104895. <https://doi.org/10.1016/j.chiabu.2020.104895>
25. Stoltenborgh, M., Bakermans-Kranenburg, MJ, Alink, LRA & van IJzendoorn, MH. (2012) The Universality of Childhood Emotional Abuse: A Meta-Analysis of Worldwide Prevalence. *Journal of Aggression Maltreatment & Trauma* 21(8):870-890. <https://doi.org/10.1080/10926771.2012.708014>
26. Stoltenborgh, M., van IJzendoorn, M. H., Euser, E. M., & Bakermans-Kranenburg, M. J. (2011). A global perspective on child sexual abuse: meta-analysis of prevalence around the world. *Child maltreatment*, 16(2), 79–101. <https://doi.org/10.1177/1077559511403920>
27. Stoltenborgh, M., Bakermans-Kranenburg, MJ, Alink, LRA & van IJzendoorn, MH. (2015) The Prevalence of Child Maltreatment across the Globe: Review of a Series of Meta-Analyses, *Child Abuse Review*, 24, 37– 50, <https://doi.org/10.1002/car.2353>
28. Averdijk, M., Müller-johnson, K & Eisner, M. (2011) *Sexual victimization of children and adolescents in Switzerland*. Final report for the UBS Optimus Foundation. Zurich, Switzerland: UBS Optimus Foundation.
29. Ward, C. L., Artz, L., Leoschut, L., Kassinjee, R., & Burton, P. (2018). Sexual violence against children in South Africa: a nationally representative cross-sectional study of prevalence and correlates. *The Lancet. Global health*, 6(4), e460–e468. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30060-3](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30060-3)

30. Pereda, N., Guilera, G., Forns, M., & Gómez-Benito, J. (2009). The prevalence of child sexual abuse in community and student samples: a meta-analysis. *Clinical psychology review*, 29(4), 328–338. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2009.02.007>
31. UNICEF. The state of the world's children 2019 - Statistical tables. (2019). <https://data.unicef.org/resources/dataset/sowc-2019-statistical-tables/>
32. WHO. (2018). *WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2016*. https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalCOD_method_2000-2016.pdf
33. ILO. (2017) *World Social Protection Report 2017–19: Universal Social protection to achieve the Sustainable Development Goals*. https://www.ilo.org/global/publications/books/WCMS_605078/lang--en/index.htm
34. Cerna-Turoff, I., Fang, Z., Meierkord, A., Wu, Z., Yanguela, J., Bangirana, C. A., & Meinck, F. (2021). Factors Associated With Violence Against Children in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-Regression of Nationally Representative Data. *Trauma, violence & abuse*, 22(2), 219–232. <https://doi.org/10.1177/1524838020985532>
35. UNICEF. (1989) *Convention on the Rights of the Child*. 25, 1–23.
36. Comité Português para a UNICEF. (2019) *Convenção Sobre Os Direitos Da Criança*. UNICEF
37. United Nations. (2015) *Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development*. 1–35
38. WHO. *INSPIRE: Seven strategies for Ending Violence Against Children*. (2016). <https://www.who.int/publications/i/item/inspire-seven-strategies-for-ending-violence-against-children>
39. Convenção do Conselho da Europa. (2014) *Convenção do Conselho da Europa Para a Protecção das Crianças contra a Exploração Sexual e os Abusos Sexuais*. http://www.gep.mtsss.gov.pt/documents/10182/107789/convencao_lanzarote.pdf/354cb31c-c3e1-42ec-9e8e-455673485c2a
40. COSAI. (2012) *Policy briefing: Comparing Sexual Assault Interventions across Europe*. https://www.cosai.eu/fileadmin/user_upload/Pdf/COSAI_Policy_brief_FINAL.pdf
41. *Decreto-Lei n.º 48/95*. (Diário da República n.º 63/1995, Série I-A de 1995-03-15, 1995).
42. *Decreto-Lei n.º 159/2015*. (Diário da República n.º 154/2015, Série I de 2015-08-10, 2015).
43. DGS. (2021) *Programas de Saúde Prioritários*. <https://www.sns.gov.pt/institucional/programas-de-saude-prioritarios/>
44. DGS. (2011) *Maus Tratos em Crianças e Jovens - Guia prático de abordagem, diagnóstico e intervenção*.
45. Guerra, P. in *Violência Doméstica. Implicações sociológicas, psicológicas e jurídicas do fenómeno - Man. Pluridiscip.* (eds. Guerra, P. & Lopes, E.) 390–409 (Centros de Estudos Judiciários, 2016).
46. Moreira, RM. (2018) Há cinco crianças por dia vítimas de crimes sexuais. *Journal Notícias* <https://www.jn.pt/justica/ha-cinco-criancas-por-dia-vitimas-de-crimes-sexuais-9833186.html>
47. APAV. (2019) *Relatório Anual de Estatísticas da APAV - 2018*. https://apav.pt/apav_v3/images/pdf/Estatisticas_APAV_Relatorio_Anual_2018.pdf
48. WHO. (2014) *Relatório Mundial Sobre a Prevenção da Violência 2014*
49. Magalhães, T, Ribeiro, CS, Jardim, P & Vieira, DN. (2011) Forensic procedures for interview physical exam and evidence collection in children and young people victims of physical and/or sexual abuse. *Acta Médica Portuguesa*, 24(2), 339-348. <https://actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/1613>
50. *Agressões sexuais: intervenção pericial integrada*. (Sociedade Portuguesa para o Estudo da Criança Abusada e Negligenciada, 2013).
51. Jordan, K. S., Steelman, S. H., Leary, M., Varela-Gonzalez, L., Lassiter, S. L., Montminy, L., & Bellow, E. F. (2019). Pediatric Sexual Abuse: An Interprofessional Approach to Optimizing Emergency Care. *Journal of forensic nursing*, 15(1), 18–25. <https://doi.org/10.1097/JFN.0000000000000232>
52. Magalhães, T. (2010) *Abuso de Crianças e Jovens - da suspeita ao diagnóstico*. LIDEL.
53. Loinaz, I., Bigas, N., & de Sousa, A.M. (2019). Comparing intra and extra-familial child sexual abuse in a forensic context. *Psicothema*, 31(3), 271–276. <https://doi.org/10.7334/psicothema2018.351>
54. Harding, L., Davison-Fischer, J., Bekaert, S., & Appleton, J. V. (2019). The role of the school nurse in protecting children and young people from maltreatment: An integrative review of the literature. *International journal of nursing studies*, 92, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2018.12.017>
55. Gregório, J., Ferreira, R., & Fernandes, A. S. (2021). The Perception of Primary School Teachers Regarding the Pharmacotherapy of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *International journal of environmental research and public health*, 18(12), 6233. <https://doi.org/10.3390/ijerph18126233>.
56. Chandramani, A., Dussault, N., Parameswaran, R., Rodriguez, J., Novack, J., Ahn, J., Oyola, S., & Carter, K. (2020). A Needs Assessment and Educational Intervention Addressing the Care of Sexual Assault Patients in the Emergency Department. *Journal of forensic nursing*, 16(2), 73–82. <https://doi.org/10.1097/JFN.0000000000000290>
57. Lynch, Virginia A.; Duval, JB. *Forensic Nursing Science*. (2006).
58. Ceccucci J. (2018). Evaluating Nurse Practitioners Perceived Knowledge, Competence, and Comfort Level in Caring for the Sexually Abused Child. Ceccucci J. (2018). Evaluating Nurse Practitioners Perceived Knowledge, Competence, and Comfort Level in Caring for the Sexually Abused Child. *Journal of forensic nursing*, 14(1), 42–49. <https://doi.org/10.1097/JFN.000000000000018>
59. Vasconcelos, A, Cardoso, BM, Barros, M & Almeida, H. (2011) Abordagem da criança vítima de maus tratos na Urgência Pediátrica - 5 anos de experiência do Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca. *Acta Pediátrica Portuguesa* 42(1), 8–11.
60. Coelho, N. (2017). *Procedimentos Das Equipas De Emergência Médica Pré-Hospitalar Na Investigação Criminal Do Homicídio*. (Master's Dissertation) UC - Dissertações de Mestrado. <http://hdl.handle.net/10316/81408>
61. Ordem dos Enfermeiros. *Regulamento nº 728/2021 - Regulamento da Competência Acrescida Diferenciada em Enfermagem Forense*. (2021).
62. Santos, C. (2013). *Contributos para a implementação da enfermagem forense em Portugal*. (Master's thesis). FMUC Medicina - Teses de Mestrado <http://hdl.handle.net/10316/26042>

Rapid UV-Vis spectroscopy methods for quantification of ranitidine tablets

Métodos de espectroscopia rápida UV-Vis para quantificação de comprimidos de ranitidina

Patrícia Rijo^{1,2*}, Lara Ribeiro¹, Marisa Nicolai¹, Paula Pereira^{1,3,4}, Célia Faustino^{2*}

¹Center for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal; ²Research Institute for Medicines (iMed.U LISBOA), Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003, Lisbon, Portugal; ³Center for Natural Resources and Environment (CERENA), Instituto Superior Técnico (IST), Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal; ⁴EPCV-ULHT-Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal

*corresponding authors / autores para correspondência: patricia.rijo@ulusofona.pt; cfaustino@ff.ulisboa.pt

Abstract

Ranitidine is a histamine H₂-receptor antagonist that inhibits gastric acid secretion, commonly used in the treatment and prophylaxis of peptic ulcer and gastroesophageal reflux disease. Over-the-counter ranitidine hydrochloride tablets are available in several European countries as well as the US for the relief of indigestion and heartburn. Commercial tablets containing the equivalent of 150 mg of ranitidine were analysed following extraction. Ranitidine is water-soluble, thus avoiding the use of organic solvents. Standard aqueous solutions of ranitidine hydrochloride were used to construct a calibration curve. This graduate laboratory experiment describes a simple, inexpensive, safe, and “green” procedure for the quantification of ranitidine tablets by UV spectrophotometry. The entire procedure provides an pedagogical opportunity to approach a realistic analytical scenario, typical of a quality control laboratory, by designing an attractive and engaging hands-on session. An average content of 148 ± 1 mg of ranitidine was determined using both standard addition and external calibration methods and results are in agreement with Pharmacopoeia.

Keywords: Analytical chemistry, ranitidine, drugs/pharmaceuticals, quantitative analysis, UV-Vis spectroscopy

Resumo

A ranitidina é um antagonista do receptor de histamina H₂ que inibe a secreção de ácido gástrico, normalmente utilizado no tratamento e profilaxia da úlcera péptica e da doença do refluxo gastroesofágico. Os comprimidos de cloridrato de ranitidina estão disponíveis em vários países europeus e também nos EUA para o alívio da indigestão e da azia. Foram analisados comprimidos comerciais de 150 mg de ranitidina que exigiu a extração do fármaco hidrossolúvel, evitando assim a utilização de solventes orgânicos. Foram utilizadas soluções aquosas do padrão de cloridrato de ranitidina para construir as curvas de calibração. Esta experiência descreve um procedimento verde simples, barato e não perigoso para a quantificação de comprimidos de ranitidina por espectrofotometria UV, podendo ser adaptado para o ensino laboratorial. O procedimento proporciona uma oportunidade pedagógica para lidar com um problema analítico real, típico de um laboratório de controlo de qualidade, utilizando uma amostra farmacêutica que transverte uma experiência simples numa sessão laboratorial contextualizada e atrativa. Foi determinado um teor médio de 148 ± 1 mg de ranitidina utilizando tanto o método de adição padrão como o método de calibração externa e os resultados encontram-se em consonância com a Farmacopeia.

Palavras-chave: Química analítica, ranitidina, medicamentos/farmacêuticos, análise quantitativa, Espectroscopia UV-Vis

Received / Recebido: 01/09/2021

Accepted / Aceite: 21/12/2021

Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

UV-Vis spectroscopy is a feasible and straightforward analytical tool routinely used with other assay techniques in the pharmaceutical industry in areas such as quality control and quality assurance (1). Several papers describing the quantification of analytical samples by UV spectrophotometry in the pharmaceutical, biotechnological, and environmental areas, as well as in the field of food and beverage, have been reported in the literature (2-21).

Highly conjugated organic compounds, including many drugs and biological macromolecules (e.g., proteins and nucleic acids) absorb light in the ultraviolet (UV)-visible (vis) region of the electromagnetic spectrum. Quantitative analysis is based on the relationship between the degree of absorption and the concentration of the absorbing species in solution, mathematically described by the Beer-Lambert law, $A = \epsilon lc$, where A is the absorbance at a fixed wavelength, ϵ is the absorption coefficient, l is the path length and c is concentration.

This experiment was conceived to introduce the technique of ultraviolet spectroscopy to undergraduate students in Pharmaceutical Organic Chemistry classes and describes a simple, inexpensive, and environmentally green (organic solvent-free) laboratory procedure for the quantitative assay of ranitidine, a histamine H_2 -receptor antagonist, in commercial 150 mg ranitidine tablets.

Ranitidine is a histamine H_2 -receptor antagonist that inhibits gastric acid secretion induced by histamine, pentagastrin, and other secretagogues. Ranitidine hydrochloride (Figure 1) is a white or pale yellow, water-soluble, crystalline powder.

Ranitidine is commonly used in the treatment and prophylaxis of peptic ulcer and gastroesophageal reflux disease, and also in other conditions where reduction of gastric secretion and acid output is desirable. It can also be administered with nonsteroidal anti-inflammatory

Introdução

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica analítica simples e rápida, utilizada rotineiramente em conjunto com outras técnicas analíticas na indústria farmacêutica, em áreas como controle e garantia de qualidade¹. Diversos trabalhos têm descrito a quantificação de substâncias contidas em amostras, usando a técnica de espectrofotometria UV, nomeadamente nas áreas farmacêutica, biotecnológica e ambiental, bem como no âmbito dos produtos alimentares (2-21).

Compostos orgânicos conjugados, incluindo alguns fármacos e macromoléculas biológicas (por exemplo, proteínas e ácidos nucleicos) absorvem radiação na região do ultravioleta (UV)-visível (vis) do espectro eletromagnético. Esta análise quantitativa baseia-se na relação entre a absorção de radiação e a concentração da espécie absorvente, em solução, que é descrita matematicamente pela lei de Lambert-Beer, $A = \epsilon lc$, sendo A a absorvância num comprimento de onda fixo, ϵ a absorvidade molar, l o percurso ótico e c a concentração.

Esta experiência teve como objetivo a introdução da técnica de espectroscopia ultravioleta-visível a alunos que frequentam aulas de Química Orgânica Farmacêutica e descreve um procedimento laboratorial simples, barato e verde (sem solventes orgânicos) para o ensaio quantitativo de ranitidina, em comprimidos comerciais contendo 150 mg do fármaco.

A ranitidina é um antagonista da histamina H_2 -receptor que inibe a secreção de ácido gástrico induzida pela histamina, pentagastrina e outros secretagogo. O cloridrato de ranitidina (Figura 1) é um pó cristalino, branco ou amarelo-pálido, solúvel em água.

A ranitidina é geralmente utilizada no tratamento e profilaxia da úlcera péptica e da doença do refluxo gastroesofágico, e também quando a redução da secreção gástrica e da produção de ácido é desejável. Também pode ser administrada com anti-inflamatórios

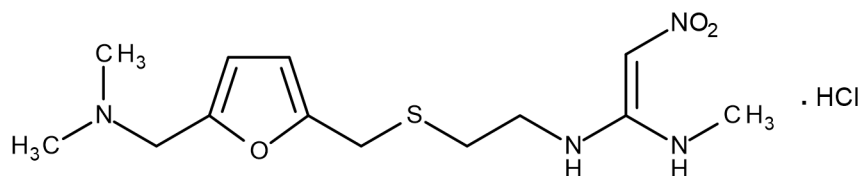


Figure 1 - Ranitidine hydrochloride
Figura 1 - Cloridrato de ranitidina

drugs (NSAIDs) to reduce the risk of ulceration. The usual dose of ranitidine is either 150 mg twice a day or 300 mg once a day, usually at night.

Several preparations of ranitidine hydrochloride are available over the counter (OTC) for the relief of indigestion and heartburn, including 150 mg tablets. Each tablet for oral administration contains 168 mg of ranitidine hydrochloride (equivalent to 150 mg of ranitidine anhydrous free base).

Students are provided with 150 mg ranitidine tablets and a stock solution of ranitidine hydrochloride for the preparation of ranitidine standard solutions to be used in the construction of a calibration curve. The ranitidine tablets must be subjected to pre-analytical treatment for selective extraction and dilution of ranitidine for subsequent quantification.

The mass (mg) of ranitidine in the prescription tablet is determined from the calibration curve obtained, and the value is then compared with the label claim of the manufacturer according to the specifications of the Pharmacopeia. The official monographs of the European Pharmacopoeia (22) (and also the USP (23)) require that ranitidine tablets contain an amount of ranitidine hydrochloride ($C_{13}H_{23}ClN_4O_3S$) equivalent to not less than 90.0 % and not more than 110.0 % of the (package) labelled quantity of ranitidine ($C_{13}H_{22}N_4O_3S$) (24).

The entire laboratory procedure is completed in a three-hour lab session and is ideally performed by students working in group. It provides students with an opportunity to solve an authentic analytical problem with a commercial pharmaceutical sample in a realistic and engaging lab session. Although originally intended for undergraduate Pharmaceutical Organic Chemistry students, the experiment is simple enough to be performed by undergraduate students within a general chemistry course. It is also suited for advanced high school chemistry students, as long as a suitable UV spectrophotometer is available.

Materials and Methods

Reagents

Ranitidine hydrochloride was obtained from Sigma-Aldrich and used as received. OTC ranitidine hydrochloride tablets labelled to contain 150 mg of ranitidine were purchased from a local pharmacy. Absorbance measurements were performed ten times

não esteróides (AINEs) para reduzir o risco de ulceração. A dose habitual de ranitidina é de 150 mg duas vezes por dia ou 300 mg uma vez por dia, geralmente à noite.

Comercialmente, estão disponíveis várias formulações de cloridrato de ranitidina, para o alívio da indigestão e da azia, incluindo os comprimidos de 150 mg. Cada comprimido para administração oral contém 168 mg de cloridrato de ranitidina (equivalente a 150 mg de base livre de ranitidina anidra).

São fornecidos aos estudantes comprimidos de 150 mg de ranitidina e uma solução mãe de cloridrato de ranitidina para a preparação de soluções padrão de ranitidina a serem utilizadas na construção de uma curva de calibração. Os comprimidos de ranitidina devem ser submetidos a tratamento pré-analítico para extração seletiva e diluição, para posterior quantificação.

A massa (mg) de ranitidina no comprimido é determinada, a partir da curva de calibração obtida, e o valor é comparado com o rótulo do fabricante, de acordo com as especificações da Farmacopeia. As monografias oficiais da Farmacopeia Europeia (22) (e também da USP (23)) declaram que os comprimidos de ranitidina contêm uma quantidade de cloridrato de ranitidina ($C_{13}H_{23}ClN_4O_3S$) equivalente a não menos do que 90,0 % e não mais do que 110,0 % da quantidade rotulada de ranitidina ($C_{13}H_{22}N_4O_3S$) (24).

Todo o procedimento laboratorial é executado numa sessão de três horas de laboratório e é idealmente realizado por estudantes que trabalham em grupo. Deste modo, proporciona-se aos estudantes a oportunidade de lidar com um problema analítico real e a possibilidade de utilizar uma amostra farmacêutica, transformando a experiência numa sessão laboratorial atrativa e envolvente. Embora originalmente destinada a estudantes de Química Orgânica Farmacêutica, a experiência é suficientemente simples para ser realizada por estudantes de um curso de química geral e é também adequada para estudantes do ensino secundário, desde que esteja disponível um espectrofotómetro UV.

Materiais e Métodos

Reagentes

O cloridrato de Ranitidina foi obtido de Sigma-Aldrich e utilizado como recebido. Os comprimidos de cloridrato de ranitidina OTC com uma quantidade rotulada de 150 mg de ranitidina foram comprados a uma farmácia local. Foram efetuadas medições de absorvância dez

for blanks and in triplicate for standards and sample at 25 °C with an ultraviolet-visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1603, Kyoto, Japan) using 1 cm length quartz cells. Distilled water (solvent) was used as the reference blank.

Experimental procedure

Standard addition and external calibration methods were performed to quantify ranitidine in commercial tablets.

Firstly, for the external calibration method, ranitidine hydrochloride was dissolved in water in order to prepare a 500.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ stock solution, which was provided to the students. From the stock solution, students performed serial dilutions to prepare 25 mL ranitidine hydrochloride standard solutions with concentrations in the range 1.00–20.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to be used in the construction of a calibration curve.

The preparation of the pharmaceutical sample was based on the assay described in Pharmacopeia (22, 23) for ranitidine tablets. Five 150 mg ranitidine tablets were accurately weighed and crushed with a mortar and pestle. The resulting powder, equivalent to the average mass of one tablet, was dissolved in distilled water, with gentle stirring, to a final volume of 500 mL. The solution was filtered and a 1:100 dilution of the filtrate was performed, leading to the pharmaceutical sample to be analysed, with theoretical ranitidine concentration of 3.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

For the standard addition method, 2.50 mL of the previously prepared sample solution (3.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was added to a 25 mL volumetric flask and the standard solutions were mixed and diluted to (final) ranitidine hydrochloride concentrations in the range of 1.0–20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

The UV absorption spectra of the ranitidine hydrochloride stock solution and pharmaceutical sample were recorded between 400 and 200 nm, using distilled water as the reference blank, to compare the two profiles and determine the wavelength(s) of maximum absorbance. Absorption measurements of ranitidine hydrochloride solutions were performed in triplicate at the wavelengths of maximum absorption.

vezes para os brancos e em triplicado para os padrões e amostra a 25 °C com um espectrofotômetro UV-1603 ultravioleta-visível Shimadzu (Quioto, Japão), utilizando células de quartzo de 1 cm de comprimento e água destilada (solvente) como branco de referência.

Procedimento experimental

Foram efetuados métodos de adição padrão e calibração externa para quantificar a ranitidina em comprimidos comerciais.

Em primeiro lugar, no método de calibração externa, o cloridrato de ranitidina foi dissolvido em água a fim de preparar uma solução de mãe de 500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ que foi fornecida aos estudantes. A partir da solução mãe, os estudantes realizaram diluições em série para preparar soluções padrão de 25 mL de cloridrato de ranitidina com concentrações na gama de 1,00-20,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para serem utilizadas na construção de uma curva de calibração.

A preparação da amostra farmacêutica foi baseada no ensaio descrito na Farmacopeia (22,23) para comprimidos de ranitidina. Cinco comprimidos de ranitidina de 150 mg foram ponderados com precisão e esmagados com um almofariz e pilão. Uma quantidade de pó equivalente ao valor médio da massa de um comprimido foi dissolvida em água destilada, com agitação suave, para um volume final de 500 mL. A solução foi filtrada e foi realizada uma diluição de 1:100 do filtrado, levando a amostra farmacêutica a ser analisada, com concentração teórica de ranitidina de 3,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em segundo lugar, no método de adição padrão, a partir da solução de amostra previamente preparada (3,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$), foram adicionados 2,50 mL ao balão volumétrico de 25 mL e as soluções padrão foram misturadas e diluídas em concentrações de cloridrato de ranitidina na gama de 1,0-20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os espectros de absorção UV da solução mãe de cloridrato de ranitidina e da amostra farmacêutica foram registrados entre 400 e 200 nm, utilizando água destilada como branco de referência, de modo a comparar os dois perfis e determinar o(s) comprimento(s) de onda de absorção máxima. As medições de absorção de soluções de cloridrato de ranitidina foram realizadas em triplicado, nos comprimentos de onda de absorção máxima.

For accurate and precise quantification of the ranitidine content, the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were determined (25). The LOD was determined using Equation 1, and the LOQ by Equation 2:

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{S} \quad (\text{Eq. 2})$$

where σ is the standard deviation of the absorbance readings of the blank and S is the slope of the calibration curve.

Thus, ten absorbance measurements of the blank were performed at the wavelength of maximum absorbance of ranitidine to ensure a relative standard deviation (RSD) of less than 10%, as recommended by IUPAC (26).

Para a quantificação rigorosa e precisa do teor de ranitidina recorreu-se à determinação do limite de detecção (LOD), Equação 1, que corresponde à menor quantidade de analito detetável, e do limite de quantificação (LOQ), Equação 2, que por sua vez corresponde à menor quantidade de analito quantificável (25).

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{S} \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo σ o desvio padrão das leituras de absorvância do branco e S o declive da curva de calibração.

Desta forma foram realizadas dez medições de absorvância do branco, no comprimento de onda de máxima absorção da ranitidina, para garantir um desvio padrão relativo (RSD) inferior a 10%, tal como é recomendado pela IUPAC (26).

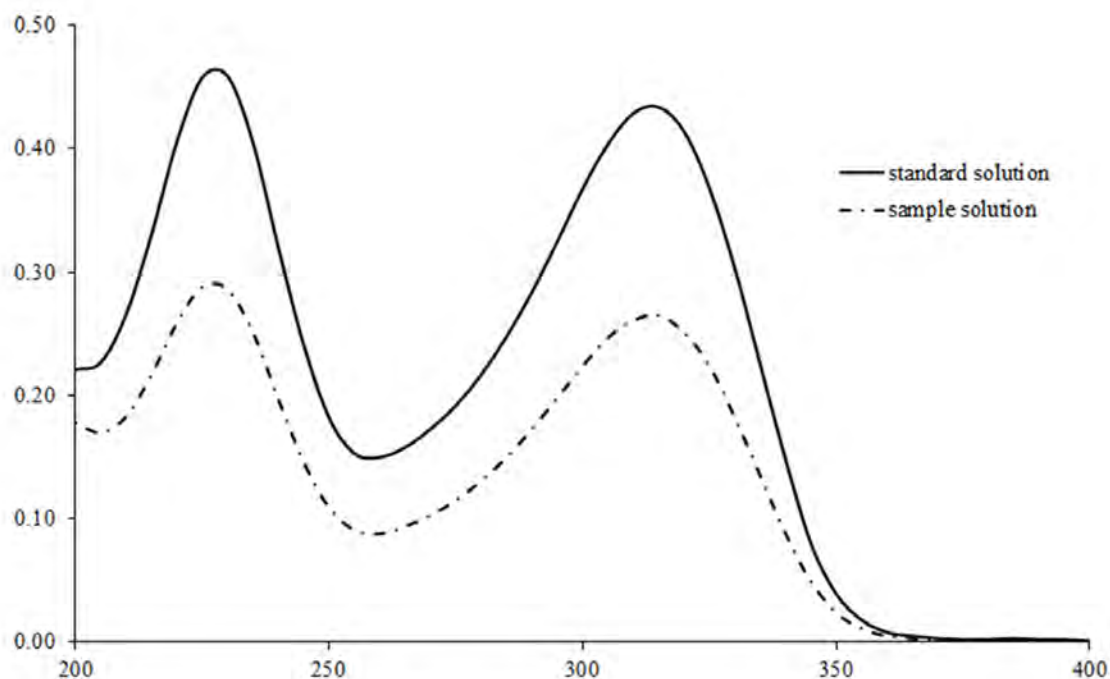


Figure 2 - UV absorption spectrum of a 10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ranitidine hydrochloride stock solution (upper curve) and a solution from a commercial sample (lower curve) registered between 400 and 200 nm.

Figura 2 - Espectro de absorção UV de uma solução mãe de 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cloridrato de ranitidina (curva superior) e uma solução de uma amostra comercial (curva inferior) registada entre 400 e 200 nm.

Table 1 - Average absorbance (Abs), standard deviation (σ) and relative standard deviation (RSD) of ranitidine hydrochloride solutions, at 227 nm and 314 nm, for standard addition and external calibration methods**Tabela 1** - Absorvância média (Abs), desvio padrão (σ) e desvio padrão relativo (RSD) de soluções de cloridrato de ranitidina, a 227 nm e 314 nm, para os métodos de adição padrão e de calibração externa.

Standard Padrão	[Ranitidine HCl] (mg. mL ⁻¹)	[Ranitidine] (mg. mL ⁻¹)	External calibration method Método de calibração externo			Standard addition method Método de adição de padrão								
			λ , 227 nm	σ	RSD (%)	λ , 314 nm	σ	RSD (%)						
S1	1	0.9	0.064	0.006	9.5	0.044	0.002	3.4	0.078	0.009	12.1	0.071	0.009	12.6
S2	2	1.8	0.093	0.008	8.2	0.085	0.004	4.2	0.123	0.01	8.0	0.112	0.006	5.7
S3	5	4.5	0.222	0.005	2.3	0.214	0.001	0.2	0.249	0.009	3.8	0.236	0.007	3.0
S4	10	9.0	0.480	0.029	6.1	0.438	0.034	7.7	0.520	0.042	8.0	0.486	0.024	4.9
S5	15	13.4	0.705	0.059	8.3	0.671	0.053	7.8	0.753	0.024	3.1	0.717	0.019	2.6
S6	20	17.9	0.947	0.059	6.2	0.899	0.053	5.9	1.008	0.011	1.1	0.957	0.011	1.1
Blank/Branco			0.001	0.001	0.1	0.001	0.001	0.1	0.001	0.001	0.1	0.001	0.001	0.1
Sample/Amostra			0.158	0.007	0.7	0.142	0.008	0.8						

Results and Discussion

The UV absorption spectra of the ranitidine hydrochloride stock solution and pharmaceutical sample solution are shown in Figure 2.

Sample and stock aqueous solutions show two absorption peaks at 314 nm and 227 nm. Absorption measurements are then performed at 314 nm and 227 nm against distilled water as the reference blank. In order to quantify ranitidine in tablets, students must convert the amount of ranitidine chloride to the ranitidine free base. In solution, the absorbing species is ranitidine, with hydrogen chloride present (only) to stabilize the ranitidine molecule against oxidation. Typical average absorption values and corrected ranitidine concentrations are shown in Table 1.

From data shown in Table 1, calibration curves were prepared (Figure 3) by plotting absorption values against ranitidine concentration. A linear relationship between absorbance and concentration was observed in the studied concentration range of 0.9–17.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, thus following the Lambert-Beer law.

The equations of this straight line could be obtained from regression analysis using either a computer program or a scientific or graphing calculator in order to determine the ranitidine concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in the sample solution and in the original pharmaceutical tablet, taking into account the dilution factor (Table 2).

The mass of ranitidine (mg) in the prescription tablet was then determined from the concentration of ranitidine (mg/tablet) in the pharmaceutical sample and the value obtained is compared with the label claim of the manufacturer and with the specifications

Resultados e Discussão

Os espectros de absorção UV da solução mãe de cloridrato de ranitidina e da solução de amostra farmacêutica são mostrados na Figura 2.

As soluções aquosas de amostra e de mãe mostram dois picos de absorção a 314 nm e 227 nm. As medições de absorção são então realizadas a 314 nm e 227 nm contra água destilada como branco de referência. Para quantificar a ranitidina em pastilhas, os estudantes têm de converter a quantidade de cloreto de ranitidina para a forma básica da ranitidina. Em solução, a espécie absorvente é a ranitidina, uma vez que a presença de cloreto de hidrogénio é apenas para estabilizar a molécula de ranitidina da oxidação. Os valores típicos de absorção média e concentração retificada de ranitidina são mostrados na Tabela 1.

A partir dos dados da Tabela 1 são obtidas curvas de calibração (Figura 3) traçando os valores de absorção contra a concentração de ranitidina. Os gráficos de calibração da ranitidina obedeceram à lei Lambert-Beer na gama de concentrações estudada de 0,9-17,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, pelo que se observa uma relação linear entre absorção e concentração.

As equações desta linha reta podem ser obtidas a partir da análise de regressão utilizando um programa de computador ou uma calculadora científica ou gráfica, permitindo assim determinar a concentração de ranitidina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) na solução da amostra e no comprimido farmacêutico original, tendo em conta o fator de diluição (Tabela 2).

A massa de ranitidina (mg) no comprimido prescrito é então determinada a partir da concentração de

Table 2 - Quantification range, equation of calibration curve, square of correlation coefficient, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), ranitidine mass, relative error at 227 nm and 314 nm for external calibration and standard addition methods.

Tabela 2 - Gama de quantificação, equação da curva de calibração, quadrado do coeficiente de correlação, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), massa de ranitidina, erro relativo a 227 nm e 314 nm para os métodos de calibração externa e de adição padrão.

	λ (nm)	Quantification range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equation of calibration curve	Correlation coefficient	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ranitidine mass (mg)	Relative error (%)
External calibration method	227	0.9 – 17.9	$y = 0.0525x + 0.0028$	0.9991	0.06	0.19	147.8	-1.46
	314		$y = 0.0503x + 0.0066$	0.9998	0.07	0.22	147.7	-1.52
Standard addition method	227		$y = 0.0523x + 0.0153$	0.9997	0.05	0.19	146.3	-2.49
	314		$y = 0.0523x + 0.0155$	0.9995	0.06	0.20	148.2	-1.21

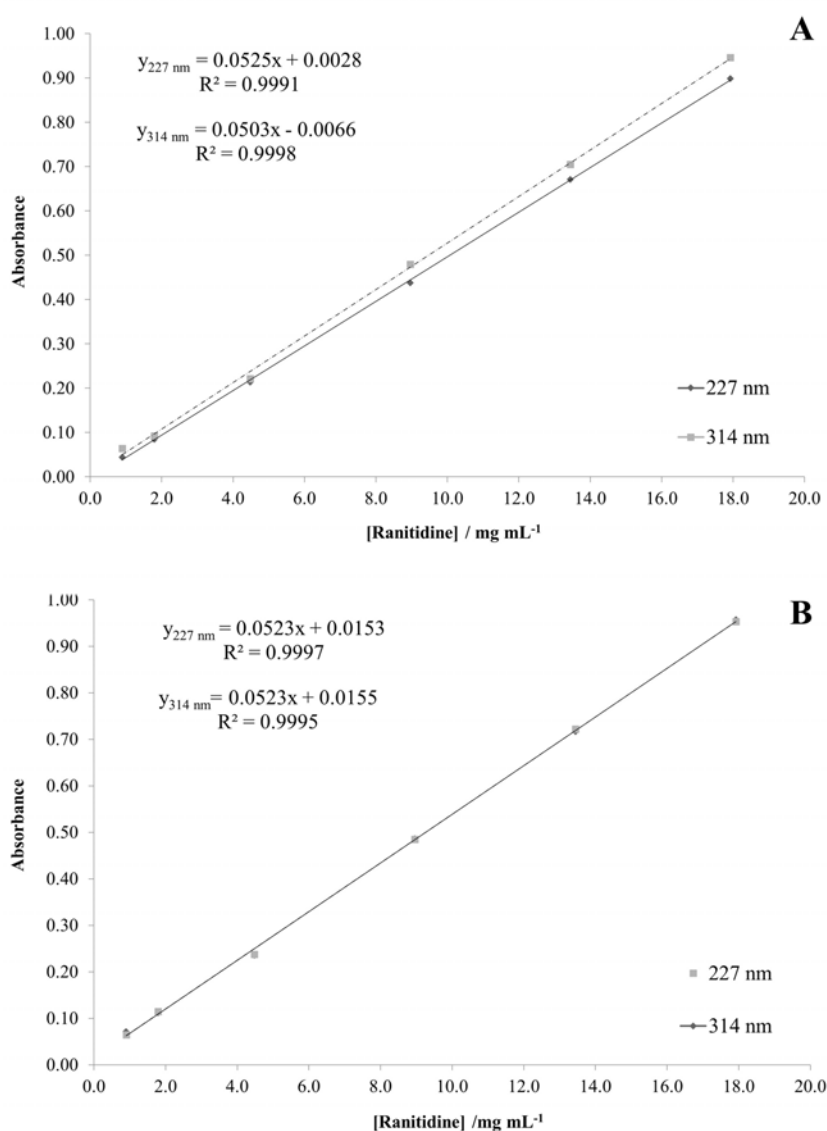


Figure 3 - Standard calibration curves for ranitidine obtained at 227 nm and 314 nm, by external calibration (A) and standard addition (B) methods. Note the overlap of data points/calibration curve in curve B.

Figura 3 - Curvas de calibração padrão para ranitidina obtidas a 227 nm e 314 nm, pelos métodos de calibração externa (A) e adição padrão (B). Notar a sobreposição de pontos de dados/curva de calibração no painel B.

of the European Pharmacopoeia for ranitidine tablets. Students' average results was 148 ± 1 mg of ranitidine, equivalent to a good agreement with the tolerable and expected percentage range of the labelled claim as set forth by Pharmacopoeia (22, 23).

Conclusion

The experimental procedure presented for quantification of the water-soluble drug ranitidine, a histamine H_2 -receptor antagonist, represents a non-hazardous, simple, and reproducible laboratory experiment that can be conducted at an undergraduate level.

The use of UV spectrophotometry allowed for the quantification of ranitidine in the tablets analysed. An average content of 148 ± 1 mg of ranitidine was calculated, in good agreement with the amount claimed on the product label and in accordance with the specifications of the European Pharmacopoeia. The ratio, between the maximum absorbances at 227 nm and 314 nm, were 1.05 and 1.07 for standard stock and sample solutions, respectively, also in conformity to Pharmacopoeia (22,23). The methods used were found to be simple, rapid, accurate, precise, and easily implemented in a three-hour laboratory class. Moreover, the requirement of readily available reagents that are inexpensive and safe to handle makes the analytical method economical and environmentally friendly. The proposed quantitation of ranitidine from commercial tablets can be made at 227 nm and/or at 314 nm using an external standard method and/or the standard addition method, showing relative error in the same order of magnitude.

Authors Contributions Statement

P.R., L.R., M.N., P.P., C.F. - conceptualization and study design; M.N. - experimental implementation; M.N., P.P. - data analysis; M.N., P.P. - drafting, editing and reviewing; M.N- figures and graphics; P.R., L.R., M.N., P.P., C.F - supervision and final writing.

ranitidina (mg/ tablete) na amostra farmacêutica e o valor obtido é comparado com a alegação rotulada do fabricante e com as especificações da Farmacopeia Europeia para comprimidos de ranitidina. Os resultados médios dos estudantes são de 148 ± 1 mg de ranitidina, estando concordante com a gama percentual tolerável e esperada da alegação rotulada, conforme estabelecido pela Farmacopeia (22, 23).

Conclusão

O procedimento experimental apresentado para quantificação do medicamento hidrossolúvel ranitidina, um antagonista do recetor de histamina H_2 , representa uma experiência laboratorial não perigosa, simples e reprodutível que pode ser conduzida a um nível de graduação.

A utilização da espectrofotometria UV permitiu a quantificação da ranitidina nos comprimidos analisados. Foi calculado um teor médio de 148 ± 1 mg de ranitidina, de acordo com as especificações da Farmacopeia Europeia, em concordância com a quantidade pedida pelo rótulo. A relação, entre as absorvâncias máximas a 227 nm e 314 nm, é de 1,05 e 1,07 para as soluções padrão, mãe e amostra, respetivamente, também em conformidade com a Farmacopeia (22,23).

Os métodos utilizados foram considerados simples, rápidos, exatos, precisos e facilmente implementados numa classe laboratorial de três horas. Além disso, a exigência de reagentes facilmente disponíveis que são baratos e seguros de manusear torna o método analítico um método confiável e também económico. A quantificação proposta de ranitidina em comprimido pode ser utilizada tanto a 227 nm e/ou a 314 nm usando os método padrão externo e/ou de adição padrão, mostrando erro relativo na mesma ordem de grandeza.

Declaração sobre as contribuições do autor

P.R., L.R., M.N., P.P., C.F. - concepção e desenho do estudo; - M.N implementação experimental; M.N., P.P. - análise de dados; M.N., P.P - redação, edição e revisão; M.N - figuras e gráficos; P.R., L.R., M.N., P.P., C.F - supervisão e redação final.

Funding

This research was funded by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), through projects UIDP/04567/2020 and UIDB/04567/2020. P.P. Gratefully acknowledges the support of the CERENA strategic project FCT-UID/ECI/04028/2019.

Acknowledgments

The authors acknowledge all the participants.

Conflict of interest

The authors declare that there is no financial or personal relationship that could present a potential conflict of interests.

Financiamento

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia, ao abrigo dos projetos UIDB/04567/2020 e UIDP/04567/2020. P.P. agradece o apoio da CERENA ao abrigo projeto estratégico FCT-UID/ECI/04028/2019.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os participantes.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não existe qualquer relação financeira ou pessoal que possa apresentar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

- Görög, S. (1995). UV-visible spectrophotometry in pharmaceutical analysis. CRC Press, Boca Raton, 1995.
- Egts, H., Durben, D. J., Dixon, J. A., & Zehfus, M. H. (2012). A Multicomponent UV Analysis of α - and β -Acids in Hops. *Journal of Chemical Education*, 89, 117–120.
- Kimaru, I. W., Zhao, F., & Chichester, K. (2010). Spectrophotometric quantification of ibuprofen release in dissolution testing. A pharmaceutical analysis experiment for instrumental analysis laboratory. *The Chemical Educator*, 15, 484–487.
- Mbindyo, J. K. N., & Brown, A. K. (2010). Investigating UV-Blocking Properties of Sunscreens on the Microscale. *J. Chem. Educ.*, 87, 1388.
- Andersen, J. E. T. (2009). Exercise in quality assurance: A laboratory exercise. *Journal of Chemical Education*, 86, 733–737.
- Reid, K. R., Meyerhoff, M. E., & Mitchell-Koch, J. T. (2008). Salicylate detection by complexation with iron(III) and optical absorbance spectroscopy. An undergraduate quantitative analysis experiment. *Journal of Chemical Education*, 85, 1658–1659.
- Dwyer, T. J., Fillo, & J. D. (2006). Assaying α -dicarbonyl compounds in wine: A complementary GC-MS, HPLC and visible spectrophotometric analysis. *Journal of Chemical Education*, 83, 273–276.
- Mouer, H. P., Zanella, A., & Poon, T. (2006). An introduction to UV-Vis spectroscopy using sunscreens. *Journal of Chemical Education*, 83, 769.
- Beckers, J. L. (2004). The determination of caffeine in coffee: Sense or nonsense? *Journal of Chemical Education*, 81, 90–93.
- Patterson, B. M., Danielson, N. D., Lorigan, G. A., & Sommer, A. S. (2003). Analytical spectroscopy using modulator systems. *Journal of Chemical Education*, 80, 1460–1463.
- Byrd, H., & O'Donnell, S. E. (2003). A General Chemistry Laboratory Theme: Spectroscopic Analysis of Aspirin. *J. Chem. Educ.*, 80, 174–176.
- Aberásturi, F., Jiménez, A. I., Jiménez, F., & Arias, J. J. (2001). UV-Visible first-derivative spectrophotometry applied to an analysis of a vitamin mixture. *Journal of Chemical Education*, 78, 793–795.
- Aroti, A., & Leontidis, E. (2001). Simultaneous determination of the ionization constant and the solubility of sparingly soluble drug substances. A physical chemistry experiment. *Journal of Chemical Education*, 78, 786–788.
- Ribone, M. É., Pagani, A. P., Olivieri, A. C., & Goicoechea, H. C. (2000). Determination of the active principle in a syrup by spectrophotometry and principal component regression analysis. An advanced undergraduate experiment involving Chemometrics. *Journal of Chemical Education*, 77, 1330–1333.
- Aurian-Blajeni, B., Sam, J., & Sisak, M. (1999). Sweet chemistry. *Journal of Chemical Education*, 76, 91–92.
- McDevitt, V. L., Rodriguez, A., & Williams, K. R. (1998). Analysis of soft drinks: UV spectrophotometry, liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chemical Education*, 75, 625–628.
- Adams, P. E. (1995). Determining iron content in foods by spectrophotometry. *Journal of Chemical Education*, 72, 649–651.
- Yarnelle, M. K., & West, K. J. (1989). Modification of an ultraviolet spectrophotometric determination of the active ingredients in APC tablets. *Journal of Chemical Education*, 66, 601–602.
- Stolzberg, R. J. (1986). Evaluation of derivative ultraviolet spectrometry for determining saccharin in cola and other matrices: An instrumental methods experiment. *Journal of Chemical Education*, 63, 351–353.
- Van Atta, R. E. (1979). Ultraviolet spectrophotometric determination of caffeine in cola Drinks: An organic analytical experiment. *Journal of Chemical Education*, 56, 666.
- Fernandez, L. T., Mannett, K., & Frederick H. (1978). Experiment for instrumental analysis. The determination of aspirin by ultraviolet absorption. *Journal of Chemical Education*, 55, 266.
- European Pharmacopoeia. (2010). European directorate for the quality of medicines and health care (7th edition), Council of Europe, Strasbourg.
- Pharmacopoeia–National Formulary (USP35 – NF30). (2012). United States pharmacopeial convention, Rockville, USA.
- Under revision, 95-105%, USP Medicines Compendium (USP-MC). available at <https://mc.usp.org> (last accessed 06 June 2013).
- International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. (1994). ICH guideline Q2(R1): Validation of analytical procedures: text and methodology, Geneva, Switzerland.
- Currie, L. A. (1999). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Analytica Chimica Acta*, 391(2), 105-126.

Single versus mixed edge activators in caffeine-loaded transfersomes: physicochemical and cytotoxicity assessment

Ativadores de superfície únicos versus mistos em transferossomas para veicular cafeína: avaliação físico-química e de citotoxicidade

Íris Guerreiro^{1,2#}, Marta Rodrigues^{3#}, Ana Sofia Fernandes¹, Catarina Rosado¹, Catarina Pereira-Leite^{1,4*}

¹CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Av Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ²Department of Biomedical Sciences, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain; ³Escola de Psicologia e Ciências da Vida, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Av Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ⁴LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal

These authors contributed equally to this work.

*corresponding author / autor para correspondência: catarina.leite@ulusofona.pt

Abstract

The performance of transfersomes as nanovesicular systems to enhance the skin permeation of bioactive compounds may be modulated according to their composition of edge activators (EAs). Vesicle size, deformability, and encapsulation efficiency can be altered when using nonionic surfactants as EAs with opposing hydrophilic-lipophilic balance (HLB). Thus, this work aimed to assess the impact on the physicochemical properties and the *in vitro* cytotoxicity profile of transfersomal formulations composed of single or mixed EAs, with opposing HLB values. Transfersomes made of single or mixed nonionic surfactants (Tween[®] 80 and/or Span[®] 80) were prepared in the presence and absence of caffeine, used as a model hydrophilic compound. Single or mixed EAs-containing transfersomes displayed promising physicochemical properties for cutaneous applications and were found to be stable for one month of refrigerated storage. Moreover, all transfersomal formulations were compatible with a keratinocyte cell line upon 24 h treatment. Altogether, these preliminary data suggest that the use of mixed nonionic surfactants as EAs may be further explored to modulate the performance of transfersomes as skin permeation enhancers.

Keywords: Vesicular systems, nanotechnology, nonionic surfactants, caffeine

Resumo

O desempenho dos transferossomas como sistemas nanovesiculares para melhorar a permeação cutânea de compostos bioativos pode ser modulado de acordo com a sua composição em ativadores de superfície (EAs). Segundo a literatura, o tamanho, a deformabilidade e a eficiência de encapsulação destas vesículas dependem do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) dos tensoativos não-iônicos usados como EAs. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto nas propriedades físico-químicas e no perfil de citotoxicidade *in vitro* de formulações transferossomais constituídas por EAs únicos ou mistos, com valores de HLB opostos. Os transferossomas obtidos com tensoativos não-iônicos únicos ou mistos (Tween[®] 80 e/ou Span[®] 80) foram preparados na presença e ausência de cafeína, utilizada como composto modelo hidrofílico. Os transferossomas preparados, independentemente da sua composição em EAs, apresentaram propriedades físico-químicas promissoras para aplicações cutâneas, sendo estáveis durante 1 mês sob armazenamento refrigerado. Além disso, todas as formulações transferossomais foram compatíveis com uma linha celular de queratinócitos após tratamento por 24 h. No conjunto, estes dados preliminares sugerem que a utilização de tensoativos não-iônicos mistos como EAs poderá ser mais explorada para modular o desempenho dos transferossomas como promotores da permeação cutânea.

Palavras-chave: Sistemas vesiculares; nanotecnologia; tensoativos não-iônicos; cafeína

Introduction

Skin is a highly efficient barrier against the external environment, controlling the penetration of xenobiotics and microorganisms to maintain homeostasis. The outermost layer of the epidermis is the stratum corneum (SC), consisting of a matrix of layers of flattened corneocytes, extracellularly surrounded by multiple lipid bilayers (1,2). The unique structure of SC supports its primary function as cutaneous barrier, such that only a limited range of substances can permeate through skin, including substances with low molecular weight (<500 Da), relative lipophilicity (log P 1-3), and water solubility (3). Thus, the number of therapeutic agents amenable to transdermal administration is limited, triggering the development of different vesicular systems, such as liposomes, ethosomes, niosomes, and transfersomes (3-6), to enhance the permeation of bioactive compounds into the skin.

Transfersomes are highly elastic and deformable vesicles, and as such, they have been viewed as the most advantageous vesicular systems to enhance skin permeation (4,5). They were introduced by Cevc and Blume in 1992 (7) and are composed of phospholipids intercalated with edge activators (EAs) (4,5). The incorporation of EAs in the formulation of transfersomes provides their most important characteristic - ultra-deformability - as EAs act as destabilizers of the phospholipid bilayer by reducing interfacial tension (8). The ultra-elasticity of transfersomes allows them to deform and permeate through skin pores 5 to 10 times smaller than their size without losing their structure (3), and thus able to transport bioactive compounds to deeper skin layers. Transfersomes can be loaded with hydro- or lipophilic molecules with a wide range of molecular weights (200-10⁶ Da). Thus, they have been explored for encapsulation of diverse therapeutic agents, including antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, analgesic, anesthetic, antidiabetic, and antimicrobial compounds (5).

The performance of transfersomes as permeation enhancers of bioactive compounds depends on the phospholipid:EA ratio and the chosen EA (4,5). Various EAs have been explored to prepare transfersomes, in particular, nonionic surfactants (Tween® 80 and Span® 80) and bile acids (sodium deoxycholate and sodium cholate) (9-12). The choice of phospholipid:EA ratio is crucial to control the vesicle size and drug loading capacities, as recently reviewed (4,5). In fact, this parameter should be optimized, preferably by quality-by-design strategies, as excessive amounts of EA (>

Introdução

A pele é uma barreira altamente eficaz contra o ambiente externo, controlando a penetração de xenobióticos e de microrganismos para manter a homeostase. A camada mais externa da epiderme é o estrato córneo (SC), constituído por uma matriz de camadas de corneócitos achatados, extracelularmente rodeados por múltiplas bicamadas lipídicas (1,2). A estrutura única do SC está na base da sua função primária - funcionar como barreira cutânea, razão pela qual apenas uma gama limitada de substâncias pode permear através da pele, tais como substâncias com baixo peso molecular (<500 Da), lipofilia relativa (log P 1-3) e solubilidade em água (3). Assim, o número de agentes terapêuticos que são passíveis de administração transdérmica é limitado, o que tem desencadeado o desenvolvimento de vários sistemas vesiculares para melhorar a permeação cutânea de compostos bioativos, tais como lipossomas, etossomas e transferossomas (3-6).

Os transferossomas são vesículas altamente elásticas e deformáveis, razão pela qual parecem ser os sistemas vesiculares mais vantajosos para promover a permeação cutânea (4,5). Foram introduzidos por Cevc e Blume (7) e são compostos por fosfolípidos intercalados com ativadores de superfície (EAs) (4,5). A incorporação de EAs na formulação está na origem da sua característica mais importante - a ultra-deformabilidade, uma vez que os EAs atuam como destabilizadores da camada fosfolipídica ao reduzir a tensão interfacial (8). A ultra-elasticidade dos transferossomas permite-lhes deformar e permear através de poros cutâneos 5 a 10 vezes menores do que o seu tamanho sem perder a sua estrutura (3), sendo capazes de transportar compostos bioativos para as camadas cutâneas mais profundas. Os transferossomas podem veicular moléculas hidro- ou lipofílicas com uma vasta gama de pesos moleculares (200-10⁶ Da). Por isso, têm vindo a ser explorados para encapsular diversos agentes terapêuticos, tais como compostos antioxidantes, anticancerígenos, anti-inflamatórios, analgésicos, anestésicos, antidiabéticos e antimicrobianos (5).

O desempenho dos transferossomas como promotores de permeação de compostos bioativos depende da relação fosfolípido:EA e do EA escolhido (4,5). Vários EAs têm sido explorados para preparar transferossomas, em particular, tensoativos não-iónicos (Tween® 80 e Span® 80) e ácidos biliares (desoxicolato de sódio e colato de sódio) (9-12). A escolha da relação fosfolípido:EA é crucial para controlar o tamanho da vesícula e a sua capacidade de carga, tal como foi recentemente revisto

15%) may lead to vesicle-to-micelle transitions (11). Moreover, the selection of EA in the preparation of transfersomes is a key factor to modulate their vesicle size and encapsulation efficiency. Considering nonionic surfactants, hydrophilic compounds may be more efficiently encapsulated using surfactants with high hydrophilic-lipophilic balance (HLB), while surfactants with low HLB values seem to better encapsulate lipophilic molecules (5). Moreover, the lower the HLB of nonionic surfactants, the higher the vesicle size (9) and the lower the vesicle deformability (10), which may ultimately reduce skin permeation. Altogether, these data indicate that modulating the HLB values by using mixtures of EAs may be a valuable strategy to optimize the performance of transfersomes.

In this context, this preliminary study aimed to evaluate the impact on the physicochemical properties and the *in vitro* cytotoxicity profile of transfersomes composed of single or mixed EAs with opposing HLB values. A pre-optimized formulation, using a quality-by-design approach, made of Tween[®] 80 (HLB=15) was the starting point for this work (13). The present study continued with EAs replaced and/or mixed with Span[®] 80 (HLB=4.3). The bioactive molecule chosen to be encapsulated in the prepared transfersomes was caffeine, as it has been widely used as hydrophilic model compound in dermal safety studies (14). Moreover, its antioxidant and lipolytic activities support its extensive use in cutaneous formulations (15). To our knowledge, this is the first report on the physicochemical characterization and *in vitro* cytotoxicity assessment of transfersomes prepared with mixed EAs with opposing HLB values to load caffeine.

(4,5). De facto, este parâmetro deve ser otimizado, de preferência por estratégias de *quality-by-design*, uma vez que quantidades excessivas de EA (> 15%) podem causar transições vesícula-micela (11). Além disso, a seleção do EA para preparar transferossomas é também um fator-chave para modular o tamanho da vesícula e a sua eficiência de encapsulação. Considerando os tensoativos não-iônicos, os compostos hidrofílicos podem ser encapsulados de forma mais eficiente utilizando tensoativos com elevado equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB), enquanto os tensoativos com valores baixos de HLB parecem encapsular melhor moléculas lipofílicas (5). Além disso, quanto mais baixo o HLB dos tensoativos não-iônicos, maior será o tamanho da vesícula (9) e menor a sua deformabilidade (10), o que pode reduzir a permeação cutânea do composto veiculado. No conjunto, estes dados indicam que a modulação dos valores de HLB através da utilização de misturas de EAs pode ser uma estratégia valiosa para otimizar o desempenho dos transferossomas.

Neste contexto, este estudo preliminar tem como objetivo avaliar o impacto nas propriedades físico-químicas e no perfil de citotoxicidade *in vitro* de transferossomas constituídos por EAs únicos ou mistos, com valores opostos de HLB. Uma formulação pré-otimizada, utilizando uma abordagem de *quality-by-design*, constituída por Tween[®] 80 (HLB=15) foi o ponto de partida para este trabalho (13), sendo o EA substituído e/ou misturado com Span[®] 80 (HLB=4,3) no presente estudo. A cafeína foi o composto bioativo escolhido para ser encapsulado nos transferossomas preparados, uma vez que tem sido amplamente utilizada como composto modelo hidrofílico em estudos de segurança dérmica (14). Mais ainda, as propriedades antioxidantes e lipolíticas da cafeína apoiam o seu uso extensivo em formulações para aplicação cutânea (15). Segundo temos conhecimento, este é o primeiro trabalho quanto à caracterização físico-química e à avaliação *in vitro* da citotoxicidade de transferossomas constituídos por EAs mistos com valores de HLB opostos para veicular a cafeína.

Materials and Methods

Materials

Caffeine was obtained from Fagron Ibérica (Terrassa, Spain). Lecithin from soybean was purchased from Alfa Aesar (Kandel, Germany). Tween[®] 80, potassium chloride, monobasic potassium phosphate, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and trypsin were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Span[®] 80 and DMSO (dimethyl sulfoxide) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Chloroform and disodium hydrogen phosphate dihydrate were purchased from Scharlab S.L. (Sentmenat, Spain). Methanol was purchased from Carlo Erba Reagenti SpA (Rodano, Italy). Sephadex[™] G-25 medium was obtained from GE Healthcare Bio-sciences AB (Uppsala, Sweden). Sodium chloride was purchased from José M. Vaz Pereira SA (Benavente, Portugal). Low glucose DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) and FBS (fetal bovine serum) were purchased from Biowest (Nuaille, France). Penicillin-streptomycin (pen/strep) was obtained from Grisp (Porto, Portugal). Phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 was prepared as previously described (13).

Preparation of transfersomes

Transfersomes were prepared using the lipid-film hydration method followed by sonication, as previously described (13). Seven formulations were prepared, with or without caffeine, consisting of lecithin (PC) and Tween[®] 80 and/or Span[®] 80 as EA, according to Table 1.

EA:PC films were obtained by dissolving the materials in chloroform:methanol (3:1, v/v) before solvent evaporation using a rotary evaporator (Model VV2000/VB2000, Heidolph Instruments, Schwabach, Germany) at 40 °C, 90 rpm, for 30 min. Traces of organic solvents were removed under vacuum for 2 h. The transfersomal formulations were prepared by hydrating the EA:PC films with PBS buffer or a 1% (w/v) caffeine buffered solution with vigorous vortexing. Finally, the formulations were sonicated (model Q125 sonicator, QSonica Sonicators, Newtown, CT, USA) at 50% amplitude for 10 min. .

Materiais e Métodos

Materiais

A cafeína foi obtida a partir da Fagron Ibérica (Terrassa, Espanha), enquanto a lecitina da soja foi adquirida na Alfa Aesar (Kandel, Alemanha). O Tween[®] 80, o cloreto de potássio, o fosfato monobásico de potássio, o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e a tripsina foram obtidos a partir da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). O Span[®] 80 e o DMSO (dimetilsulfóxido) foram adquiridos na Merck (Darmstadt, Alemanha). O clorofórmio e o hidrogenofosfato dissódico di-hidratado foram adquiridos na Scharlab S.L. (Sentmenat, Espanha), enquanto o metanol foi obtido a partir da Carlo Erba Reagenti SpA (Rodano, Itália). O Sephadex[™] G-25 médio foi adquirido na GE Healthcare Bio-sciences AB (Uppsala, Suécia). O cloreto de sódio foi obtido a partir da José M. Vaz Pereira, SA (Benavente, Portugal). O DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e o FBS (soro bovino fetal) foram adquiridos na Biowest (Nuaille, França). A penicilina-estreptomina (pen/strep) foi obtida a partir da Grisp (Porto, Portugal). O tampão fosfato (PBS) a pH 7,4 foi preparado como descrito anteriormente (13).

Preparação dos transferossomas

O método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação foi utilizado para preparar transferossomas, tal como descrito anteriormente (13). Foram preparadas sete formulações, com ou sem cafeína, constituídas por lecitina (PC) e Tween[®] 80 e/ou Span[®] 80 como EAs, tal como descrito na Tabela 1.

Os filmes compostos por EA e PC foram obtidos através da dissolução destes compostos em clorofórmio:metanol (3:1, v/v) seguida da evaporação dos solventes utilizando o evaporador rotativo VV2000/VB2000 (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemanha) a 40 °C, 90 rpm, durante 30 min. Os vestígios de solventes orgânicos foram ainda removidos sob vácuo durante 2 h. As formulações transferossomais foram obtidas, de seguida, através da hidratação dos filmes obtidos anteriormente com tampão PBS ou uma solução tamponada de cafeína (1% (m/v)), seguida de agitação vigorosa. Por fim, as formulações foram sonicadas durante 10 min (50% de amplitude), utilizando o sonicador Q125 (QSonica Sonicators, Newtown, CT, EUA).

Table 1 - Qualitative and quantitative composition of transfersomal formulations.**Tabela 1** - Composição qualitativa e quantitativa das formulações transferossomais.

Formulation / Formulação	PC (% w/v)	Tween® 80:PC (w/w)	Span® 80:PC (w/w)	HLB of EA	CAF (% w/v)
1U	1	15:85	-	15	-
1L	1	15:85	-	15	1
2U	1	7.5:85	7.5:85	9.65	-
2L	1	7.5:85	7.5:85	9.65	1
3U	1	-	15:85	4.3	-
3L	1	-	15:85	4.3	1
PC	1	-	-	-	-

PC: lecithin / lecitina; HLB: hydrophilic-lipophilic balance / equilíbrio hidrofílico-lipofílico; EA: edge activators / ativador(es) de superfície; CAF: caffeine / cafeína; L: loaded with caffeine/presença de cafeína; U: unloaded with caffeine/ausência de cafeína.

Characterization of transfersomes

Immediately after preparation, the transfersomes were characterized according to their hydrodynamic diameter (D_h), polydispersity index (PDI), encapsulation efficiency (EE), and loading capacity (LC). The results were obtained from triplicate analysis of each formulation and reported as mean \pm standard deviation (SD).

The D_h and PDI values of transfersomal formulations, diluted 1:20 with distilled water, were determined at room temperature (25 ± 2 °C) by dynamic light scattering measurements (Delsa™ Nano C equipment, Beckman Coulter, Inc., CA, USA).

The EE and LC of the transfersomes were analyzed using an indirect approach by the determination of the nonencapsulated fraction of caffeine using size exclusion chromatography, as previously described (13), with some modifications. A 500 μ l aliquot of each formulation was applied to prepared Sephadex™ G-25 medium (stationary phase). Following elution of the caffeine-encapsulated fractions (confirmed by visual analysis) with PBS (mobile phase), the nonencapsulated fraction of caffeine was collected for 30 min and the collected volume was recorded for accurate calculation of the dilution factor (collected volume/500 μ l).

Caraterização dos transferossomas

Imediatamente após a preparação, os transferossomas foram caracterizados quanto ao seu diâmetro hidrodinâmico (D_h), índice de polidispersão (PDI), eficiência de encapsulação (EE), e capacidade de carga (LC). Os resultados foram obtidos a partir da análise em triplicado de cada formulação e estão representados como média \pm desvio padrão (SD).

Os valores de D_h e PDI das formulações transferossomais foram determinados por medições espectroscopia de correlação fotônica (equipamento Delsa™ Nano C, Beckman Coulter, Inc., CA, EUA) à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Antes das medições, cada formulação foi diluída com água destilada (1:20).

A EE e LC dos transferossomas foram analisadas utilizando uma abordagem indireta, através da determinação da fração não encapsulada de cafeína utilizando a cromatografia de exclusão de tamanho, tal como anteriormente descrito com algumas modificações (13). O Sephadex™ G-25 médio foi utilizado como fase estacionária e o PBS como fase móvel para eluir uma alíquota de 500 μ l de cada formulação. Após a eluição das frações com cafeína encapsulada (confirmada por análise visual), a fração não encapsulada de cafeína foi recolhida durante 30 min e o volume recolhido foi registado para ser considerado no cálculo do fator de diluição (volume recolhido/500 μ l).

The concentration of caffeine in the nonencapsulated fraction was determined by UV-Vis spectroscopy (Evolution® 300, Thermo Scientific, Hertfordshire, England) using a calibration curve and considering the dilution factor. Six solutions of caffeine over a concentration range of 0-25 µg/ml were prepared in PBS to establish the concentration curve. The absorption spectrum (200-350 nm, 600 nm/min) of each solution was likewise obtained by UV/Vis spectroscopy. The calibration curve of caffeine ($y=0.0539x-0.0077$, $R^2=0.9991$) was then determined considering the absorbance of caffeine at the absorption maximum wavelength (273 nm) as a function of caffeine concentration (µg/ml).

EE and LC values, represented as percentage (%), were calculated according to Equations 1 and 2, respectively:

$$EE = \frac{C_T - C_{NE}}{C_T} \times 100 \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$LC = \frac{C_T - C_{NE}}{C_L} \times 100 \quad \text{(Eq. 2)}$$

where C_T represents the total concentration of caffeine, C_{NE} the concentration of nonencapsulated caffeine, and C_L the total concentration of PC.

Stability studies

The formulations were stored at 5 ± 2 °C for two months. The stability of D_h and PDI values of stored transfersomes was evaluated at different time points (Day 23, 30, and 60) and compared to the values obtained with freshly made formulations (Day 0). These parameters were evaluated as described above.

In vitro cytotoxicity assessment

Cell viability studies were performed using the HaCat cell line, representative of human keratinocytes, which was cultured in low glucose DMEM, supplemented with 10% FBS and 1% pen/strep and was kept at 37 °C under a humidified air atmosphere with 5% CO₂.

The MTT reduction method was used to assess the cytotoxicity of the transfersomal formulations, in line with previous publications (16,17). Briefly, HaCat cells were seeded (6×10^3 cells/well, 200 µl of supplemented DMEM) in 96-well plates and were allowed to incubate for 24 h. After that, cells were treated for 24 h with a)

A concentração de cafeína na fração não encapsulada foi determinada por espectroscopia UV-Vis (Evolution® 300, Thermo Scientific, Hertfordshire, Inglaterra), utilizando um método de curva de calibração e considerando o fator de diluição. Para determinar a curva de calibração da cafeína, seis soluções de cafeína em PBS foram preparadas numa gama de concentração de 0-25 µg/ml. O espectro de absorção (200-350 nm, 600 nm/min) de cada solução foi obtido por espectroscopia UV/Vis (espectrofotômetro Evolution® 300, Thermo Scientific, Hertfordshire, Inglaterra). A curva de calibração da cafeína ($y=0,0539x-0,0077$, $R^2=0,9991$) foi então determinada, considerando a absorvência da cafeína no comprimento de onda máximo de absorção (273 nm) em função da concentração de cafeína (µg/ml).

Os valores de EE e LC, apresentados em percentagem (%), foram calculados de acordo com as Equações 1 e 2, respetivamente:

$$EE = \frac{C_T - C_{NE}}{C_T} \times 100 \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$LC = \frac{C_T - C_{NE}}{C_L} \times 100 \quad \text{(Eq. 2)}$$

onde C_T representa a concentração total de cafeína, C_{NE} a concentração de cafeína não-encapsulada, e C_L a concentração total de PC.

Estudos de estabilidade

As formulações foram armazenadas a 5 ± 2 °C durante 2 meses e a estabilidade dos valores de D_h e PDI dos transferossomas foi avaliada em diferentes momentos (Dia 23, 30 e 60) em comparação com os valores obtidos com as formulações no dia da preparação (Dia 0). Estes parâmetros foram avaliados tal como especificado na seção anterior.

Avaliação in vitro da citotoxicidade

Foram efetuados estudos de viabilidade celular utilizando a linha celular HaCat, representativa de queratinócitos humanos, que foi cultivada em DMEM, suplementada com 10% FBS e 1% pen/strep e mantida a 37 °C sob atmosfera de ar humidificado com 5% de CO₂.

O método de redução MTT foi utilizado para avaliar a citotoxicidade das formulações transferossomais, tal como especificado em publicações anteriores (16,17). Em resumo, as células HaCat foram semeadas (6×10^3

control solutions, namely PBS or DMSO (5%, v/v) as negative and positive control (respectively); b) each transfersomal formulation diluted 1:100 and 1:200 in PBS, corresponding to caffeine concentrations of 515.7 and 257.9 μM (respectively); and c) buffered solutions of each individual component of the formulations, considering the quantitative composition of the formulations and the applied dilution factors. Afterwards, cells were washed with PBS and 200 μl of MTT solutions (0.5 mg/ml) in supplemented DMEM was added to each well, followed by an incubation period of 4 h. After another wash with PBS, 200 μl of DMSO were added to each well to dissolve the formazan crystals. Finally, the absorption values, at 595 nm, of each well were acquired using a microplate photometer (Thermo Scientific™ Multiskan™ FC). The absorption of PBS-treated cells was used as reference, representing 100% cell viability. Results were obtained from quadruplicates of each condition in two independent assays and are presented as mean \pm SD.

Statistical analysis

All data were statistically analyzed using GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Physicochemical characterization and cell viability data were analyzed through unilateral variance analysis test (One-way ANOVA), followed by Turkey's or Dunnett's multiple comparison (respectively). Results regarding the stability studies were analyzed through bilateral variance analysis test (Two-way ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison. Differences were considered as statistically significant for p values under 0.05 ($p < 0.05$).

Results and Discussion

Characterization of transfersomal formulations

The impact of using single or mixed EAs, namely Tween® 80 (1), Tween® 80:Span® 80 1:1 (2) or Span® 80 (3), to prepare transfersomes in the absence (U) and presence of caffeine (L) was evaluated in terms of D_h , PDI, EE, and LC. The results are summarised in Figure 1.

Regarding D_h data, all formulations have average diameters between 93 and 111 nm, which is a suitable range for transcutaneous application. In fact, previous

células/poço, 200 μl de DMEM suplementado) em placas de 96 poços e foram incubadas durante 24 h. Depois disso, as células foram tratadas durante 24 h com: a) soluções controlo, nomeadamente PBS ou DMSO (5%, v/v) como controlo negativo e positivo (respetivamente); b) cada formulação transferossomal após diluições de 1:100 e 1:200 em PBS, correspondendo a concentrações de cafeína de 515,7 e 257,9 μM (respetivamente); e c) soluções tamponadas de cada componente individual das formulações, considerando a composição quantitativa das formulações e os fatores de diluição aplicados. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e adicionaram-se 200 μl de solução de MTT (0,5 mg/ml) em DMEM suplementado a cada poço, seguido de um período de incubação de 4 h. Após outra etapa de lavagem com PBS, adicionaram-se 200 μl de DMSO a cada poço para dissolver os cristais de formazan. Finalmente, os valores de absorvência, a 595 nm, foram analisados em cada poço utilizando o fotómetro de microplaca Thermo Scientific™ Multiskan™ FC. A absorvência obtida com as células tratadas com PBS foi utilizada como referência, representando 100% de viabilidade celular. Os resultados foram obtidos a partir de quadruplicados de cada condição, em dois ensaios independentes, e são apresentados como média \pm SD.

Análise estatística

Todos os dados foram analisados estatisticamente usando o GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia EUA). Os dados de caracterização físico-química e de viabilidade celular foram analisados através de teste de análise de variância unilateral (One-way ANOVA), seguido por comparação múltipla de Turkey ou Dunnett (respetivamente). Os resultados relativos aos estudos de estabilidade foram analisados através do teste de análise de variância bilateral (ANOVA bidirecional), seguido de comparação múltipla de Tukey. As diferenças foram consideradas como estatisticamente significativas para valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Caraterização das formulações transferossomais

O impacto da utilização de EAs únicos ou mistos, nomeadamente Tween® 80 (1), Tween® 80:Span® 80 1:1 (2) ou Span® 80 (3), para preparar transferossomas na ausência (U) e presença (L) de cafeína foi avaliado

studies indicate that transfersomes smaller than 300 nm are highly deformable and able to penetrate to deeper layers of the skin (4) and that the smaller the vesicle size, the greater its penetration into the skin (8, 18).

As shown in Figure 1a, the incorporation of caffeine did not change the size of transfersomes regardless of the type of EA used (1U-1L, 2U-2L, and 3U-3L comparisons). On the other hand, the size of the transfersomes varied according to the type of EA used both in the absence and presence of caffeine. In fact, using Tween® 80 as EA (1U or 1L) yielded smaller transfersomes than those prepared with the mixture of Tween® 80 and Span® 80 (2U or 2L) or with Span® 80 alone (3U or 3L). The significant increase of D_h values caused by the incorporation of Span® 80 was also observed in comparison with the PC formulation (2U-PC and 3U-PC comparisons), prepared in the absence of EAs. These results are in agreement with previously published results (9), as the increase in vesicle size may be related to the affinity of the surfactant for the phospholipid, with Span® 80 (HLB=4.3) having a higher affinity for PC, as it is more hydrophobic than Tween® 80 (HLB=15) (10).

em termos de D_h , PDI, EE e LC. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1.

Em relação aos dados D_h , todas as formulações apresentaram diâmetros médios entre 93 e 111 nm, o que as torna adequadas para aplicação transcutânea. De facto, estudos anteriores indicam que transferossomas inferiores a 300 nm são altamente deformáveis e capazes de penetrar em camadas mais profundas da pele (4) e que quanto menor o tamanho da vesícula, maior a sua penetração na pele (8,18).

Através da análise da Figura 1a, verifica-se que a incorporação de cafeína não alterou o tamanho dos transferossomas, independentemente do tipo de EA utilizado (comparações 1U-1L, 2U-2L, e 3U-3L). Por outro lado, o tamanho dos transferossomas variou de acordo com o tipo de EA utilizado, tanto na ausência como na presença de cafeína. De facto, a utilização de Tween® 80 como EA (1U ou 1L) deu origem a transferossomas menores do que os preparados com a mistura de Tween® 80 e Span® 80 (2U ou 2L) ou apenas com Span® 80 (3U ou 3L). O aumento significativo dos valores de D_h causado pela incorporação de Span® 80 também foi observado em comparação com a formulação PC (comparações 2U-PC e 3U-PC), preparada na ausência de EAs. Estes resultados estão de acordo com a literatura (9), uma vez que o aumento

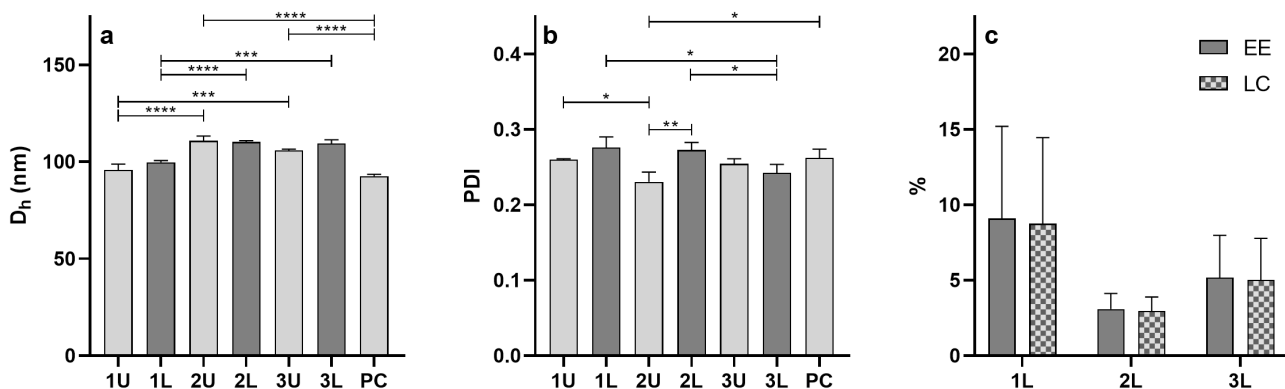


Figure 1 - Physicochemical characterization of transfersomal formulations, in the absence (U) and presence (L) of caffeine, in terms of (a) hydrodynamic diameter (D_h), (b) polydispersity index (PDI), and (c) encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC).

Figura 1 - Caracterização físico-química das formulações transferossomais, na ausência (U) e na presença (L) de cafeína, em termos de (a) diâmetro hidrodinâmico (D_h), (b) índice de polidispersão (PDI), e (c) eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (LC).

The edge activators (EA) used in each formulation are identified as 1 (Tween® 80), 2 (Tween® 80 and Span® 80), 3 (Span® 80), and PC (no EA or caffeine). All data are presented as mean \pm SD ($n=3$) and the data sets with significant differences are identified with * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ or **** $p<0.0001$.

O(s) ativador(es) de superfície (EA) utilizados em cada formulação estão identificados por 1 (Tween® 80), 2 (Tween® 80 e Span® 80), 3 (Span® 80) e PC (sem incorporação de EA e cafeína). Todos os dados estão representados como média \pm SD ($n=3$) e os conjuntos de dados com diferenças significativas estão identificados com * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ou **** $p<0,0001$.

The PDI values of transfersomal formulations was also evaluated (Figure 1b), and the average PDI values ranged between 0.23 and 0.28. It is noteworthy that smaller values of PDI in the absence of caffeine were obtained by preparing transfersomes with a mixture of Tween® 80 and Span® 80 (PDI(2U)=0.23±0.01). In contrast, in the presence of caffeine, the uniformity of size distribution was superior for transfersomes prepared with Span® 80 (PDI(3L)=0.24±0.01). Despite the small differences found in PDI values, the gathered data indicate that all transfersomal formulations are composed of monodisperse populations of vesicles, as PDI values lower than 0.3 are considered acceptable regarding the uniformity of vesicle size (19).

Concerning EE and LC of the prepared transfersomes, the average values ranged between 3% and 9%, with no significant differences according to the type of EAs used (Figure 1c). These results suggest that the amount of caffeine added exceeded the carrying capacity of the vesicles, so a decrease in the caffeine concentration and/or an increase in the concentration of excipients could potentially increase the EE and LC of these transfersomes in future studies. Due to the hydrophilic character of caffeine, its encapsulation will likely depend on the water content of the core of vesicles, which is directly related to number of vesicles in solution, thereby depending on the phospholipid concentration used to prepare the formulations (20). This hypothesis is in line with the results of Colletier *et al.* (21) who reported improvement of the EE of acetylcholinesterase by enhancing the phospholipid concentration used in liposome formulations.

Storage stability of transfersomal formulations

The physicochemical stability of the transfersomal formulations stored at 5 ± 2 °C was evaluated for two months by analyzing D_h and PDI of the transfersomes as a function of time (Figure 2). It is noteworthy that the properties of the formulations remained stable for one month. However, the diameter of the transfersomes significantly increased after two months in all cases, with a concomitant loss of vesicle size homogeneity (increased PDI) in the case of the 1U, 1L, and PC formulations. The increase in D_h values over time may be related to vesicle aggregation, that is more likely

do tamanho da vesícula pode estar relacionado com a afinidade do tensoativo para o fosfolípido, apresentando o Span® 80 (HLB=4,3) uma afinidade maior para o PC, uma vez que é mais hidrofóbico que o Tween® 80 (HLB=15) (10).

Os valores de PDI das formulações transferossomais também foram avaliados (Figura 1b) e os valores médios de PDI variaram entre 0,23 e 0,28. É de notar que foram obtidos valores mais baixos de PDI na ausência de cafeína quando se prepararam transferossomas com uma mistura de Tween® 80 e Span® 80 (PDI(2U)=0,23±0,01). Em contraste, na presença de cafeína, a uniformidade da distribuição do tamanho foi superior para transferossomas preparados com Span® 80 (PDI(3L)=0,24±0,01). Apesar das pequenas diferenças encontradas nos valores de PDI, os dados obtidos indicam que todas as formulações de transferossomas são compostas por populações monodispersas de vesículas, uma vez que valores de PDI inferiores a 0,3 são considerados aceitáveis relativamente à uniformidade do tamanho de vesículas (19).

Relativamente ao EE e LC dos transferossomas preparados, os valores médios variaram entre 3% e 9%, sem diferenças significativas de acordo com o tipo de EAs utilizado(s) (Figura 1c). Estes resultados sugerem que a quantidade de cafeína adicionada excedeu a capacidade de carga das vesículas, pelo que uma diminuição na concentração de cafeína e/ou um aumento na concentração de excipientes poderia possivelmente aumentar o EE e LC destes transferossomas em estudos futuros. Devido ao carácter hidrofílico da cafeína, a sua encapsulação dependerá provavelmente do teor de água do núcleo das vesículas, que está diretamente relacionado com o número de vesículas em solução, dependendo assim da concentração de fosfolípidos utilizada para preparar as formulações (20). Esta hipótese está de acordo com os resultados de Colletier *et al.* (21) que foram capazes de melhorar o EE da acetilcolinesterase através do aumento da concentração de fosfolípidos utilizada nas formulações de lipossomas.

Estabilidade das formulações transferossomais ao longo do armazenamento

A estabilidade físico-química das formulações transferossomais armazenadas a 5 ± 2 °C foi avaliada durante dois meses através da análise de D_h e PDI dos transferossomas em função do tempo (Figura 2). É de salientar que as propriedades das formulações permaneceram estáveis durante um mês. No entanto, o diâmetro dos transferossomas aumentou

to occur when the surface charge of vesicles is close to neutrality (4,22). This may be the case in our study, since the main component of the prepared transfersomes is lecithin, a zwitterionic phospholipid. Thus, it would be of interest to evaluate the zeta potential of these vesicular systems in future studies to better understand the role of superficial charge on the aggregation phenomenon of these formulations.

significativamente após 2 meses em todos os casos, com uma concomitante perda de homogeneidade do tamanho das vesículas (aumento do PDI) no caso das formulações 1U, 1L e PC. O aumento dos valores de D_h ao longo do tempo pode estar relacionado com a agregação de vesículas, o que é mais provável quando a carga superficial das vesículas está próxima da neutralidade (4,22), o que pode ser o caso, uma vez que o componente principal dos transferossomas preparados é a lecitina, um fosfolípido zwitteriônico. Assim, seria interessante avaliar o potencial zeta destes sistemas vesiculares em estudos futuros para melhor compreender o papel da carga superficial das vesículas no fenômeno de agregação destas formulações.

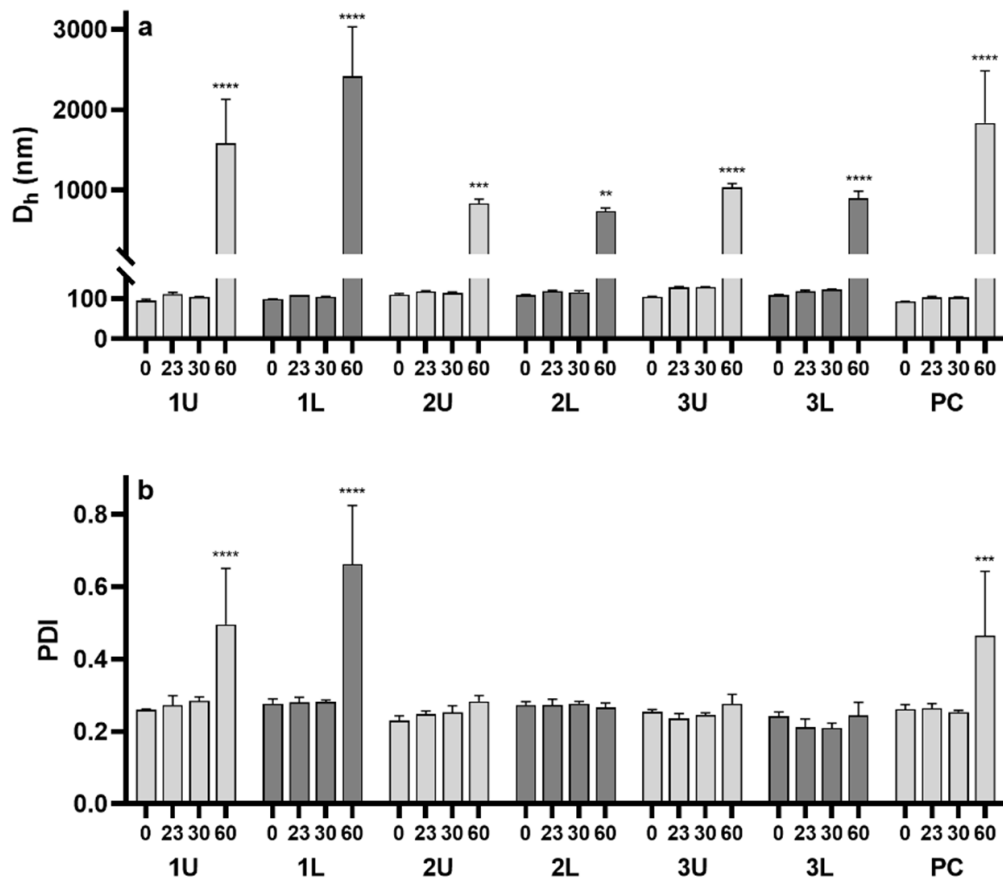


Figure 2 - Stability of transfersomal formulations, in the absence (U) and presence (L) of caffeine, in terms of (a) hydrodynamic diameter (D_h) and (b) polydispersity index (PDI) as a function of time (0, 23, 30, and 60 days) of refrigerated storage.

Figura 2 - Estabilidade das formulações transferossomais, na ausência (U) e na presença (L) de cafeína, em termos de (a) diâmetro hidrodinâmico (D_h) e (b) índice de polidispersão (PDI) em função do tempo (0, 23, 30 e 60 dias) sob armazenamento refrigerado.

The edge activators (EA) used in each formulation are identified as 1 (Tween® 80), 2 (Tween® 80 and Span® 80), 3 (Span® 80), and PC (no addition of EA or caffeine). All data were presented as mean \pm SD ($n=3$) and the data sets with significant differences in relation to $t=0$ are identified with ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ or **** $p < 0.0001$.

O(s) ativador(es) de superfície (EA) utilizados em cada formulação estão identificados por 1 (Tween® 80), 2 (Tween® 80 e Span® 80), 3 (Span® 80) e PC (sem incorporação de EA e cafeína). Todos os dados estão representados como média \pm SD ($n=3$) e os conjuntos de dados com diferenças significativas em relação a $t=0$ estão identificados com ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$.

In vitro cytotoxicity assessment of transfersomal formulations

The cytotoxicity potential of transfersomal formulations prepared with single or mixed EAs, in the absence and presence of caffeine, was evaluated upon treatment of HaCat cells for 24 h using the MTT reduction method. The results collected for all formulations and all individual components of the formulations, after a 1:100 or 1:200 dilution in PBS, are presented in Figure 3. It is noteworthy that the treatment with the positive control (DMSO-treated cells) caused a significant reduction in cell viability compared to control cells (PBS-treated cells), as expected.

Human keratinocytes treated with encapsulated or nonencapsulated caffeine, at both concentrations under study (515.7 and 257.9 μM), did not show significant differences in cell viability when compared to control cells. These data are in agreement with previously reported studies showing that the treatment of HaCat cells with a caffeine concentration below 512 μM for 24 h does not affect the cellular viability (23, 24).

Avaliação *in vitro* da citotoxicidade das formulações transferossomais

O potencial de citotoxicidade das formulações transferossomais preparadas com EAs únicos ou mistos, na ausência e na presença de cafeína, foi avaliado após tratamento de células HaCat durante 24 h através do método de redução MTT. Os resultados obtidos para todas as formulações e para todos os componentes individuais das formulações, após uma diluição de 1:100 ou 1:200 em PBS, estão apresentados na Figura 3. É de salientar que o tratamento com o controlo positivo (células tratadas com DMSO) causou uma redução significativa da viabilidade celular em comparação com o controlo negativo (células tratadas com PBS), tal como esperado.

Os queratinócitos humanos tratados com cafeína encapsulada ou não encapsulada, em ambas as concentrações em estudo (515,7 e 257,9 μM), não apresentaram diferenças significativas quanto à viabilidade celular quando comparados com as células tratadas com PBS (controlo). Estes dados estão de

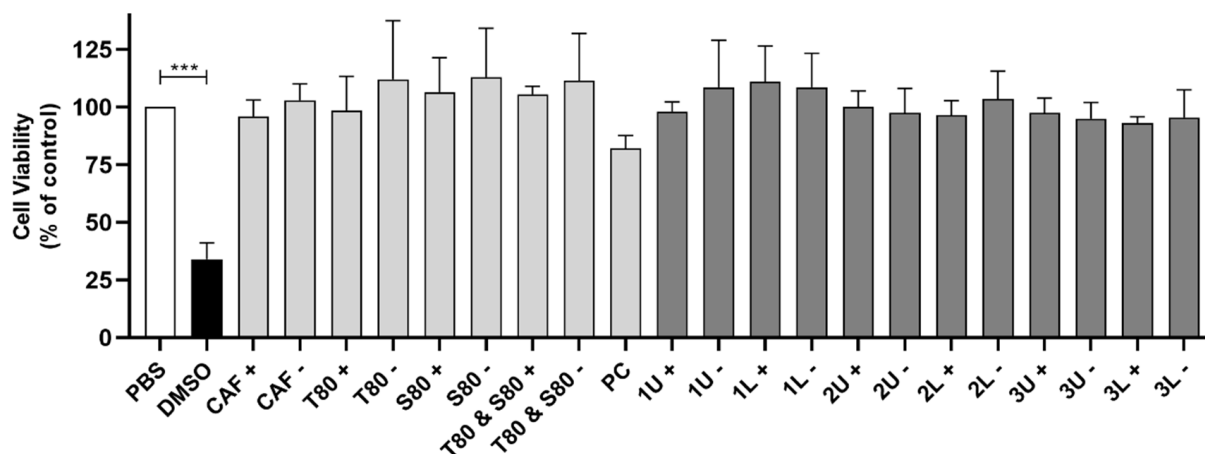


Figure 3 - Cell viability of HaCat cells after treatment for 24 h with the transfersomal formulations in the absence (U) and presence (L) of caffeine or with their individual constituents - caffeine (CAF), Tween[®] 80 (T80), Span[®] 80 (S80) or lecithin (PC).

Figure 3 - Viabilidade celular de células HaCat após tratamento por 24 h com formulações transferossomais na ausência (U) e na presença (L) de cafeína ou com os seus constituintes individuais – cafeína (CAF), Tween[®] 80 (T80), Span[®] 80 (S80) ou lecitina (PC).

The edge activators (EA) used in each formulation are identified as 1 (Tween[®] 80), 2 (Tween[®] 80 and Span[®] 80), 3 (Span[®] 80), and PC (no addition of EA or caffeine). DMSO 5% (v/v) was used as positive control. The + and - symbols indicate the 1:100 and 1:200 dilution (respectively), corresponding to a caffeine concentration of 515.7 and 257.9 μM (respectively). All data were normalized considering PBS-treated cells as reference and are presented as mean \pm SD (n=2). The data sets with significant differences relative to control are identified with ***p<0.001.

O(s) ativador(es) de superfície (EA) utilizados em cada formulação estão identificados por 1 (Tween[®] 80), 2 (Tween[®] 80 e Span[®] 80), 3 (Span[®] 80) e PC (sem incorporação de EA e cafeína). O DMSO 5% (v/v) foi usado como controlo positivo. Os símbolos + e - referem-se à diluição de 1:100 e 1:200 (respetivamente) em solução tampão (PBS), correspondendo a concentrações de cafeína de 515,7 e 257,9 μM (respetivamente). Todos os dados obtidos foram normalizados considerando o controlo negativo (PBS) e estão representados como média \pm SD (n=2). Os conjuntos de dados com diferenças significativas em relação ao controlo negativo estão identificados com ***p<0,001.

The incorporation of Tween® 80, Span® 80, or the mixture of both in transfersomes did not affect the cytotoxicity potential of the formulations. In addition, each component of the formulations (at both concentrations under study) did not significantly reduce the viability of HaCat cells. Once again, these results are in line with previous publications regarding the incorporation of Tween® 80 or Span® 80 in transfersomal formulations. In particular, no cytotoxicity was reported for Span® 80-containing transfersomes after treating HaCat cells up to 48 h (25), as well as for Tween® 80-containing transfersomes after treating mouse melanoma cells for 24 h (12). To our knowledge, this is the first report on the cytocompatibility of transfersomes composed of Tween® 80 and Span® 80, paving the way for the development of innovative transfersomal formulations made of mixed EAs.

Conclusion

In this exploratory work, we demonstrated that transfersomes composed of single or mixed nonionic surfactants as EAs display interesting physicochemical properties for cutaneous compound delivery. Moreover, these vesicular systems were stable for one month during refrigerated storage. Although the EE and LC values of the transfersomes must be further optimized in the future, the cell viability results were also very promising, as all formulations were compatible with human keratinocytes upon 24 h treatment at the studied concentrations. Altogether, this study indicates that the use of mixed nonionic surfactants as EAs may be a valuable strategy to modulate the performance of transfersomes. Further studies are ongoing to determine the best ratio between nonionic surfactants in order to improve the encapsulation efficiency and the skin permeation of these vesicular systems. The later property may be further improved with the incorporation of transfersomes in a semisolid formulation, such as a gel, as it may extend the retention time on the skin.

Authors Contributions Statement

CPL, ASF, and CR, conceptualization and study design; IG, MR, and CPL, experimental implementation; IG and CPL, data analysis; IG, MR, and CPL, drafting, editing and reviewing; IG, MR, and CPL, figures and graphics; CPL, ASF, and CR, supervision and final writing.

acordo com estudos anteriormente publicados que demonstraram que o tratamento de células HaCat com uma concentração de cafeína inferior a 512 µM durante 24 h não afeta a viabilidade celular (23,24).

A incorporação de Tween® 80, Span® 80, ou a mistura de ambos em transferossomas não alterou o potencial de citotoxicidade das formulações. Cada componente das formulações (em ambas as concentrações em estudo) também não reduziu significativamente a viabilidade das células HaCat. Mais uma vez, estes resultados estão em linha com publicações anteriores relativas à incorporação de Tween® 80 ou Span® 80 em formulações transferossomais. Em particular, não foi demonstrada citotoxicidade para transferossomas contendo Span® 80 após o tratamento de células HaCat até 48 h (25), bem como para transferossomas com Tween® 80 após tratamento de células de melanoma de rato durante 24 h (12). Segundo temos conhecimento, este é o primeiro trabalho que demonstra a citocompatibilidade de transferossomas constituídos por Tween® 80 e Span® 80, abrindo caminho para o desenvolvimento de formulações transferossomais inovadoras constituídas por EAs mistos.

Conclusões

Neste trabalho exploratório, demonstrámos que os transferossomas constituídos por tensioativos não-iônicos únicos ou mistos como EAs apresentam propriedades físico-químicas interessantes para veiculação cutânea. Além disso, estes sistemas vesiculares permaneceram estáveis durante 1 mês durante o armazenamento sob refrigeração. Embora os valores de EE e LC dos transferossomas devam ser ainda otimizados no futuro, os resultados de viabilidade celular foram muito promissores, uma vez que todas as formulações mostraram compatibilidade com queratinócitos humanos ao fim de 24 h de tratamento nas concentrações estudadas. No conjunto, este estudo indica que a utilização de tensioativos não-iônicos mistos como EAs pode ser uma estratégia valiosa para modular o desempenho dos transferossomas. Estudos adicionais estão em curso para se estudar qual será o melhor rácio entre os tensioativos não-iônicos, a fim de se otimizar a eficiência de encapsulação e a permeação cutânea destes sistemas vesiculares. Esta última propriedade pode ainda ser melhorada com a incorporação dos transferossomas numa formulação semissólida, tal como um gel, uma vez que este poderá prolongar o tempo de retenção na pele

Funding

This study was supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) through projects UIDB/04567/2020 and UIDP/04567/2020 to CBIOS and PhD grant 2020.07813.BD to I.G.

Conflict of Interests

The authors declare there are no financial and/or personal relationships that could present a potential conflict of interests.

Declaração sobre as contribuições do autor

CPL, ASF e CR, conceção e desenho do estudo; IG, MR e CPL, implementação experimental; IG e CPL, análise de dados; IG, MR e CPL, redação, edição e revisão; IG, MR e CPL, figuras e gráficos; CPL, ASF e CR, supervisão e redação final.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através dos projetos UIDP/04567/2020 e UIDB/04567/2020 atribuídos ao CBIOS e através da bolsa de doutoramento 2020.07813.BD atribuída à I.G.

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não há relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

1. Uche, L. E., Gooris, G. S., Beddoes, C. M., & Bouwstra, J. A. (2019). New insight into phase behavior and permeability of skin lipid models based on sphingosine and phytosphingosine ceramides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1861(7), 1317-1328. doi:10.1016/j.bbmem.2019.04.00
2. van Smeden, J., & Bouwstra, J. A. (2016). Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Current Problems in Dermatology*, 49, 8-26. doi:10.1159/000441540
3. Zhou, X., Hao, Y., Yuan, L., Pradhan, S., Shrestha, K., Pradhan, O., Hongjie, L., Li, W. (2018). Nano-formulations for transdermal drug delivery: A review. *Chinese Chemical Letters* 29(12), 1713-1724. doi:10.1016/j.ccl.2018.10.037
4. Fernández-García, R., Lalatsa, A., Statts, L., Bolás-Fernández, F., Ballesteros, M. P., & Serrano, D. R. (2020). Transfersomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. *International Journal of Pharmaceutics*, 573, 118817. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118817
5. Opatha, S. A. T., Titapiwatanakun, V., & Chutoprapat, R. (2020). Transfersomes: A Promising Nanoencapsulation Technique for Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 12(9), 855. doi:10.3390/pharmaceutics12090855
6. Roberts, M. S., Mohammed, Y., Pastore, M. N., Namjoshi, S., Yousef, S., Alinaghi, A., . . . Grice, J. E. (2017). Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of Controlled Release*, 247, 86-105. doi:10.1016/j.jconrel.2016.12.022
7. Cevc, G., & Blume, G. (1992). Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104(1), 226-232. doi:10.1016/0005-2736(92)90154-e
8. Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schätzlein, A., & Blume, G. (1998). Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1368(2), 201-215. doi:10.1016/s0005-2736(97)00177-6
9. Ahmed, T. A. (2015). Preparation of transfersomes encapsulating sildenafil aimed for transdermal drug delivery: Plackett-Burman design and characterization. *Journal of Liposome Research*, 25(1), 1-10. doi:10.3109/08982104.2014.950276
10. ElZaafarany, G. M., Awad, G. A., Holayel, S. M., & Mortada, N. D. (2010). Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 397(1-2), 164-172. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.06.034
11. Jangdey, M. S., Gupta, A., Saraf, S., & Saraf, S. (2017). Development and optimization of apigenin-loaded transfersomal system for skin cancer delivery: in vitro evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 45(7), 1452-1462. doi:10.1080/21691401.2016.1247850
12. Wu, P. S., Li, Y. S., Kuo, Y. C., Tsai, S. J., & Lin, C. C. (2019). Preparation and Evaluation of Novel Transfersomes Combined with the Natural Antioxidant Resveratrol. *Molecules*, 24(3), 600. doi:10.3390/molecules24030600
13. Pereira-Leite, C., & Ventura, C. (2020). Optimization of gallic acid-loaded transfersomes using a Box-Behnken factorial design. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 17(2), 209-221. doi:10.19277/bbr.17.2.244
14. Luo, L., & Lane, M. E. (2015). Topical and transdermal delivery of caffeine. *International Journal of Pharmaceutics*, 490(1-2), 155-164. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.05.050
15. Herman, A., & Herman, A. P. (2013). Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. *Skin Pharmacology and Physiology*, 26(1), 8-14. doi:10.1159/000343174
16. Caparica, R., Júlio, A., Araújo, M. E. M., Baby, A. R., Fonte, P., Costa, J. G., & Santos de Almeida, T. (2020). Anticancer Activity of Rutin and Its Combination with Ionic Liquids on Renal Cells. *Biomolecules*, 10(2). doi:10.3390/biom10020233
17. Júlio, A., Caparica, R., Costa Lima, S. A., Fernandes, A. S., Rosado, C., Prazeres, D., Reis, S., Santos de Almeida, T., & Fonte, P. (2019). Ionic Liquid-Polymer Nanoparticle Hybrid Systems as New Tools to Deliver Poorly Soluble Drugs. *Nanomaterials (Basel)*, 9(8). doi:10.3390/nano9081148
18. Geusens, B., Van Gele, M., Braat, S., De Smedt, S. C., Stuart, M. C. A., Prow, T. W., Sanchez, W., Roberts, M.S., Sanders, N.N., Lambert, J. (2010). Flexible Nanosomes (SECosomes) Enable Efficient siRNA Delivery in Cultured Primary Skin Cells and in the Viable Epidermis of Ex Vivo Human Skin. *Advanced Functional Materials*, 20(23), 4077-4090. doi:10.1002/adfm.201000484
19. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. doi:10.3390/pharmaceutics10020057
20. Abd, E., Gomes, J., Sales, C. C., Yousef, S., Forouz, F., Telaprolu, K. C., Roberts, M. S., Grice, J. E., Lopes, P. S., Leite-Silva, V. R., & Andréo-Filho, N. (2021). Deformable liposomes as enhancer of caffeine penetration through human skin in a Franz diffusion cell test. *International Journal of Cosmetic Science*, 43(1), 1-10. https://doi.org/10.1111/ics.12659
21. Colletier, J. P., Chaize, B., Winterhalter, M., & Fournier, D. (2002). Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnology*, 2, 9. doi:10.1186/1472-6750-2-9
22. Kapoor, B., Gupta, R., Gulati, M., Singh, S. K., Khursheed, R., & Gupta, M. (2019). The Why, Where, Who, How, and What of the vesicular delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science* 271, 101985. doi:10.1016/j.cis.2019.07.006
23. Ojeh, N., Stojadinovic, O., Pastar, I., Sawaya, A., Yin, N., & Tomic-Canic, M. (2016). The effects of caffeine on wound healing. *International Wound Journal*, 13(5), 605-613. doi:10.1111/iwj.12327
24. Xu, H., Gan, C., Gao, Z., Huang, Y., Wu, S., Zhang, D., . . . Sheng, J. (2020). Caffeine Targets SIRT3 to Enhance SOD2 Activity in Mitochondria. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 822. doi:10.3389/fcell.2020.00822
25. Volkwyn, M. (2017). In Vitro Biocompatibility of Transfersomes, Ethosomes and Transethosomes. North-West University, Potchefstroom Campus, Retrieved from https://books.google.pt/books?id=Thv_ygEACAAJ

Effect of cosmetic films with ascorbic acid and hyaluronic acid on transepidermal water loss

Efeito de filmes cosméticos com ácido ascórbico e ácido hialurônico na perda de água transepidermal

Isadora Marques Garros Brait¹, Mariane Massufero Vergilio², Laura Moretti Aiello¹,
Gislaine Ricci Leonardi^{1*}

¹School of Pharmaceutical Sciences-University of Campinas (UNICAMP), 200, Cândido Portinari St., "Cidade Universitária Zeferino Vaz", 13083-871-Campinas, SP, Brazil; ²Graduate Program in Internal Medicine, School of Medical Sciences - University of Campinas (UNICAMP), 126, Tessália Vieira de Camargo St., "Cidade Universitária Zeferino Vaz", 13083-887-Campinas, SP, Brazil.

*corresponding author / autor para correspondência: gislaine.leonardi@fcf.unicamp.br

Abstract

Cosmetic films are structures made of a polymer capable of forming a continuous matrix. Collagen and hyaluronic acid (HA) are components of the skin extracellular matrix and act to maintain its elasticity and resistance. Ascorbic acid (AA) acts in the formation of collagen fibers, contributing to the maintenance of their firmness and elasticity. This study aimed to evaluate the moisturizing properties of cosmetic films with AA or HA in their composition. It was also investigated whether the presence of caprylyl glycol would interfere with the TEWL of the formulations. The occlusive properties of the films were assessed based on the reduction of transepidermal water loss (TEWL) in 20 healthy participants using a Tewameter probe. At T30, 30 minutes after application, all formulations showed a reduction in TEWL compared to the control. In general, the formulations that included caprylyl glycol presented the best TEWL results after 30 min of application. However, after 60 minutes, the transepidermal water loss began to return to its basal levels. This study showed a significant difference in the TEWL value, suggesting that the topical application of the films can contribute to the improvement and maintenance of skin hydration.

Keywords: cosmetic films; collagen; hyaluronic acid; ascorbic acid; skin barrier

Resumo

Filmes cosméticos são estruturas constituídas de um polímero capaz de formar uma matriz contínua. O colágeno e o ácido hialurônico (AH) são componentes da matriz extracelular da pele e atuam mantendo sua elasticidade e resistência. O ácido ascórbico (AA) atua na formação das fibras de colágeno, contribuindo para a manutenção de sua firmeza e elasticidade. Este estudo teve como objetivo avaliar as propriedades hidratantes de filmes cosméticos com AA, ou AH em sua constituição. Investigou-se também se a presença de caprilil glycol interferiria no TEWL das formulações. As propriedades oclusivas dos filmes foram avaliadas com base na redução da perda de água transepidermica (TEWL) em 20 participantes saudáveis com o auxílio da sonda Tewameter. No T30, todas as formulações apresentaram redução na TEWL após 30 minutos de aplicação em relação ao controle. Entretanto, após 60 minutos, a TEWL começou a retornar aos seus níveis basais. Em geral, as formulações adicionadas com Caprilil Glicol, foram as que apresentaram os melhores resultados de TEWL. Este estudo mostrou uma diferença significativa no valor de TEWL, sugerindo que a aplicação tópica dos filmes podem contribuir para a melhora e manutenção da barreira cutânea.

Palavras-chave: Filmes cosméticos; colágeno; ácido hialurônico; ácido ascórbico; barreira cutânea

Introduction

The presence of water in the skin is essential for all the body metabolic activities, its mechanical properties such as elasticity and turgidity (1), and therefore considered essential to the skin (2). Skin dehydration, in addition to initiating inflammatory processes, can lead to scaling, cracking, tension, redness, bleeding, sagging, and a worsening in the overall appearance of the skin (2).

Healthy skin remains hydrated by regulating the production of intracellular lipids and the natural moisturizing factor (NMF), which work by promoting the maintenance of water in the epidermis and dermis. However, factors such as water intake, hormone levels, metabolism, aging, and stress can affect hydration (1,2,3).

Moisturizing cosmetics can promote skin hydration, increasing the aqueous content of the stratum corneum or promoting the maintenance of water in this layer (2,3,4). This occurs due to humectant components, hygroscopic molecules that operate by attracting water to the upper layers of the skin, emollients, which fill the empty spaces between corneocytes, promoting a soft sensation, as well as occlusive agents, which prevent transepidermal water loss (TEWL) (3,4).

Several types of cosmetic formulations are developed to prevent and reverse skin dryness. Among them, cosmetic films are an innovative topical system, consisting of a polymer capable of forming a continuous matrix with a compact format, which allows the storage and transport of assets, with fewer inconveniences, in addition to being a biodegradable option (5). Currently, this system has also been widely used by the pharmaceutical industry in the production of transdermal drug delivery systems, dressings, and molds for tissue growth for the treatment of burns (6), by the industry of foods in the preservation of their products (7), and by the cosmetic industry to improve the performance of developed products.

Introdução

A presença de água na pele é essencial para todas as atividades metabólicas do organismo suas propriedades mecânicas, como elasticidade e turgidez (1), e, portanto, consideravelmente importante para a saúde da pele (2). A desidratação cutânea, além de iniciar processos inflamatórios, pode gerar descamação, fissuras, tensão, vermelhidão, sangramentos, flacidez e uma piora na aparência geral da pele (2).

A pele saudável se mantém hidratada através da regulação da produção de lipídios intracelulares e do fator de hidratação natural (*Natural moisturizing factor* – NMF), que atuam promovendo a manutenção da água na epiderme e derme. No entanto, fatores como ingestão de água, níveis hormonais, metabolismo, envelhecimento e estresse podem afetar a hidratação (1,2,3).

Cosméticos hidratantes são capazes de promover a hidratação cutânea, aumentando o conteúdo aquoso do estrato córneo ou promovendo a manutenção da água nesta camada (2,3,4). Isto ocorre devido aos componentes umectantes, moléculas higroscópicas que atuam atraindo a água para às camadas superiores da pele, emolientes, que preenchem os espaços vazios entre os corneócitos, promovendo uma sensação de maciez, bem como os agentes oclusivos, que impedem a perda de água transepidermal (3,4).

Neste contexto, diversos tipos de formulações cosméticas são desenvolvidos com o objetivo de prevenir e reverter o ressecamento da pele. Entre eles, os filmes cosméticos são um sistema tópico inovador, constituído por um polímero capaz de formar matriz contínua de formato compacto, que permite o armazenamento e transporte de ativos, com menores inconvenientes, além de ser uma opção biodegradável (5). Atualmente, esse sistema também tem sido bastante utilizado pela indústria farmacêutica na produção de sistemas de liberação transdérmica de fármacos, curativos e moldes para crescimento tecidual, além de auxiliar no tratamento de queimaduras (6), assim como pela indústria de alimentos na conservação de seus produtos (7), e a tecnologia foi transferida para a indústria cosmética para melhorar a performance de produtos desenvolvidos.

O colágeno é um biopolímero estrutural responsável pela constituição da pele, ossos, vasos sanguíneos, matriz extracelular, dentes e cartilagens (8). Na pele ele é responsável pela elasticidade e resistência, como um dos principais constituintes da matriz extracelular, sua

Collagen is a structural biopolymer responsible for the constitution of skin, bones, blood vessels, extracellular matrix, teeth, and cartilage (8). In the skin, it is responsible for elasticity and resistance. As one of the main constituents of the extracellular matrix, its loss or reduction results in aging is signaled by the appearance of wrinkles and expression lines (9,10). Molecules or fibers of collagen protein can form hydrogels, films, or sponges that can be used as hemostatic agents, dressings, grafts, and molds for surgery and tissue growth (6).

Like collagen, hyaluronic acid (HA) is a component of the skin's extracellular matrix (11), responsible for its firmness, turgor, and hydration, due to its ability to attract water molecules to this skin layer (10,12). During the aging process, levels of HA in the skin decrease (10,12). Its topical use is proven to be beneficial in healing processes, promoting faster and more uniform healing without causing deformities in the damaged skin (11,12,13,14).

Ascorbic acid (AA), or vitamin C, is an antioxidant and water-soluble molecule obtained through food or topical application (9). The latter has been shown to have more expressive effect in reducing spots on the skin than food supplementation, as observed in a study by Imai *et al.* (15). This vitamin also acts in the formation of collagen fibers in almost all structures, promoting the renewal of the skin barrier and thus contributing to the maintenance of its firmness and elasticity (9).

Caprylyl glycol is a diol that can act as an antimicrobial agent in cosmetic formulations due to its ability to destabilize the bacterial cell membrane. In the skin, it acts as a conditioning, emollient agent, filling the spaces between the corneocytes and making the skin softer, and as a humectant, attracting water molecules to the upper layers of the skin without generating hypersensitivity or irritation in humans (2,3,4,16,17).

To quantitatively assess the *in vivo* efficacy of cosmetic formulations and raw materials when applied to the skin, several important skin bioengineering techniques are used, including the measurement of the TEWL. TEWL is a natural process that occurs due to the gradient of water concentration between the layers of the skin, causing water to migrate from the deeper layers to the stratum corneum, where it is lost through evaporation (18). This property is one of the most important indicators of the integrity and functionality of the skin barrier, as the value of TEWL increases in damaged or destabilized skin (18).

perda ou diminuição resulta no envelhecimento sinalizado pelo surgimento de rugas e linhas de expressão (9,10). Moléculas ou fibras desta proteína podem formar hidrogéis, filmes ou esponjas que podem ser utilizados como agentes hemostáticos, curativos, enxertos e moldes para cirurgias e crescimento tecidual (6).

Assim como o colágeno, o ácido hialurônico (AH) também é um componente da matriz extracelular da pele (11), sendo é responsável por sua firmeza, turgor e hidratação, o que ocorre devido a sua capacidade de atrair as moléculas de água para esta camada (10,12). Durante o processo de envelhecimento a quantidade de AH presente na pele diminui (10,12). Seu uso tópico é comprovadamente benéfico em processos de cicatrização, os quais acontecem mais rápido e de maneira mais uniforme sem causar deformações na pele lesada (11,12,13, 14).

O ácido ascórbico (AA), ou vitamina C, é uma molécula antioxidante e hidrossolúvel, que é obtida através da alimentação ou aplicação tópica (9), sendo que este último apresenta um efeito mais expressivo na redução de manchas na pele do que a complementação alimentar, como observado no estudo realizado por Imai *et al.* (15). Esta vitamina também atua na formação das fibras de colágeno em quase todas as estruturas, promovendo renovação da barreira cutânea e, assim, contribuindo com a manutenção de sua firmeza e elasticidade (9).

O caprilil glicol é um diol que nos cosméticos pode atuar como antimicrobiano, devido a sua capacidade de desestabilizar a membrana celular bacteriana, e na pele age como agente condicionador, emoliente, preenchendo os espaços entre os corneócitos e tornando a pele mais macia, e umectante, atraindo as moléculas de água para as camadas superiores da pele, sem gerar hipersensibilidade ou irritação em humanos (2,3,4,16,17).

Para realizar a avaliação da eficácia *in vivo* de formulações e matérias-primas cosméticas, são utilizadas diversas técnicas de bioengenharia cutânea importantes para mensurar quantitativamente a performance do cosmético quando aplicado na pele. A mensuração da perda de água transepidermal (em inglês, transepidermal water loss – TEWL) é um deles. O TEWL é um processo natural que ocorre devido ao gradiente de concentração de água entre as camadas da pele, fazendo com que a água migre das camadas mais profundas para o estrato córneo, onde é perdida por evaporação (18). Esta propriedade é um dos indicadores mais importantes da integridade e funcionalidade da barreira cutânea, visto que o valor deste parâmetro aumenta em uma pele lesionada ou desestabilizada (18).

Table 1 - Cosmetic formulations components and concentrations.

Tabela 1 - Componentes e concentração das formulações desenvolvidas.

Components / Componentes	FcB ₁ (%)	FcAA ₁ (%)	FcB ₂ (%)	FcAH ₁ (%)
Collagen / Colágeno	20.00	20.00	20.00	20.00
Citric Acid / Ácido cítrico	0.75	0.75	--	--
Ascorbic acid / Ácido ascórbico	--	0.50	--	--
Hyaluronic acid / Ácido hialurônico	--	--	--	0.50
Caprylyl glycol / Caprilil glicol	1.00	1.00	--	--
Glycerin / Glicerina	8.00	8.00	8.00	8.00
Sodium metabisulfite / Metabissulfito de sódio	1.00	1.00	--	--
Water / Água	qs*	qs*	qs*	qs*

*quantum satis



Therefore, this study aimed to evaluate the moisturizing properties of cosmetic films composed of collagen, ascorbic acid, and hyaluronic acid by measuring TEWL with the aid of the skin bioengineering technique using a Tewameter® TW 210 probe (Courage-Khazaka electronic GmbH, Germany), coupled with the Multi Probe Adapter MPA 5 software.

Materials and Methods

Materials

In the development of cosmetic films, collagen (Gelita, Sao Paulo, BR), citric acid (Synth, Diadema, BR), ascorbic acid (Synth, Diadema, BR), hyaluronic acid (DSM, Sao Paulo, BR), caprylyl glycol (Fagron, São Paulo, BR), glycerin (Fagron, Sao Paulo, BR) and sodium metabisulfite (Synth, Diadema, BR) were used.

Development of cosmetic films

The preparation of four cosmetic formulations containing (or not) ascorbic acid and hyaluronic acid is summarized in Table 1. The formulations FcB₁ and FcAA, without and with ascorbic acid, respectively, also contained caprylyl glycol. The cosmetic films (Table 1, inset) were prepared by casting method involving the addition of a filmogenic solution on a silicone surface followed by solvent evaporation at a constant temperature of 40 °C (19).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar as propriedades hidratantes de filmes cosméticos compostos por colágeno, ácido ascórbico e ácido hialurônico, com o auxílio da técnica de bioengenharia cutânea o auxílio da sonda Tewameter TW 210, produzida pela empresa Courage-Khazaka electronic GmbH, Alemanha, acoplada ao software Multi Probe Adapter MPA 5 utilizada para mensurar a perda de água transepidermal (TEWL).

Material e Métodos

Material

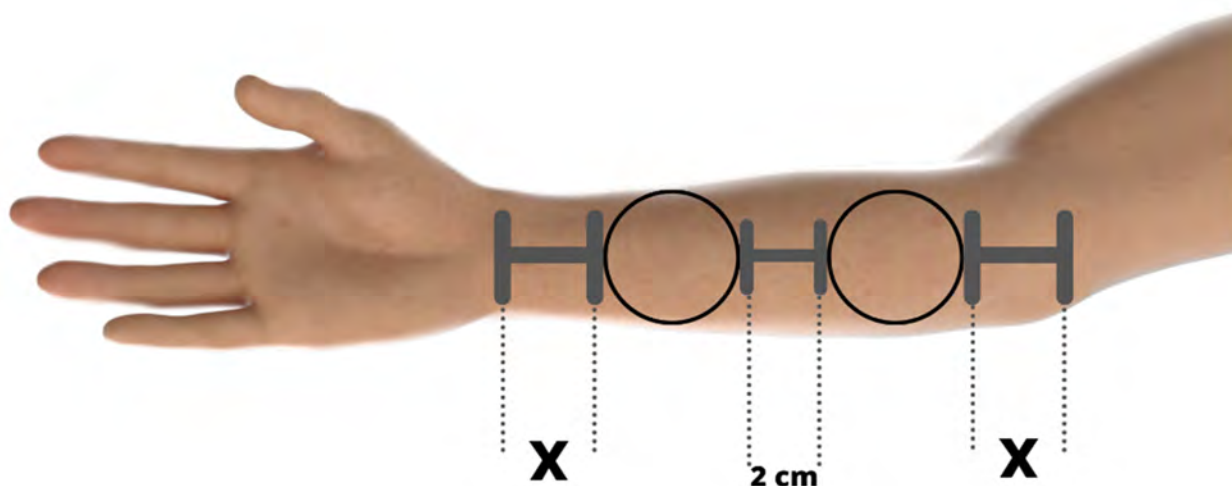
No desenvolvimento dos filmes cosméticos foram utilizados colágeno (Gelita, São Paulo, BR), ácido cítrico (Synth, Diadema, BR), ácido ascórbico (Synth, Diadema, BR), ácido hialurônico (DSM, São Paulo, BR), caprilil glicol (Fagron, São Paulo, BR), glicerina (Fagron, São Paulo, BR) e metabissulfito de sódio (Synth, Diadema, BR).

Desenvolvimento dos filmes cosméticos

Quatro formulações cosméticas contendo ou não ácido ascórbico ou ácido hialurônico, foram preparadas de acordo com a Tabela 1. As formulações FcB₁ e FcAA, respectivamente não adicionada e adicionada de ácido ascórbico, também continham caprilil glicol. Os filmes cosméticos (Tabela 1, inset) foram preparadas de acordo com o método *casting*, que consistiu em adicionar à solução filmogênica a uma superfície de silicone para evaporação do solvente a temperatura constante de 40 °C (19).

Figure 1 - Illustration of a participant's forearm with the markings of the fields used to apply the tested products, in which X represents the distance between the wrist or elbow and the closest field of application. (Source: Envato elementos – modified by author).

Figura 1 - Ilustração do antebraço de um participante com as marcações dos campos utilizados para aplicação dos produtos testados, na qual X representa a distância entre o pulso ou o cotovelo e o campo de aplicação mais próximo. (Fonte: Envato elementos – modificada pelo autor).



In vivo efficacy assessment

Experimental design

This study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Medical Sciences at Unicamp (CAAE: 13367219.5.0000.5404), and all participants signed forms to confirm informed consent. A total of 20 participants were included in the study according to the inclusion criteria, specifically, healthy participants aged between 20 and 60 years with the ability to understand and follow the guidelines, including not washing or applying any cosmetic products to the test region of the skin for at least two hours prior to testing. Exclusion criteria included the lack of understanding of the method to be used or presence of lesions compatible with active infectious diseases. The study was conducted in double-blind manner in a temperature-controlled room. The subjects were acclimated 20 minutes before starting instrumental measurements (20).

Five randomized sites with 16 cm² of area were marked on the volar forearms of each participant. The distance between the sites was 2 cm, as illustrated in Figure 1. As the formulations must be moistened to dissolve and release the active ingredients (5), the marked areas were moistened with ten drops of water before applying the films. The films were then randomly applied to the moistened regions by an independent researcher and removed after 15 minutes. Formulation residues were

Avaliação da eficácia in vivo

Protocolo experimental

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (CAAE: 13367219.5.0000.5404), e todos os participantes assinaram do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Um total de 20 participantes foram incluídos no estudo de acordo com os critérios de inclusão, participantes saudáveis com idade entre 20 e 60 anos com capacidade de compreender e seguir as orientações e não lavar ou aplicar nenhum produto cosmético a região da pele do teste por pelo menos duas horas antes do teste. Os critérios de exclusão incluíam a falta de compreensão do método a utilizar ou a presença de lesões compatíveis com doenças infecciosas activas. O estudo duplo-cego foi realizado em uma sala com temperatura controlada. Os participantes foram acimatados 20 minutos antes do início das medidas instrumentais (20).

De maneira aleatorizada, cinco campos com 16 cm² foram demarcadas no antebraço anterior de cada participante, a distância entre os campos foi de 2 cm (Figura 1). Para que as formulações sejam dissolvidas e possam liberar seus ativos que os filmes devem ser umedecidos (5) assim, antes da aplicação das formulações, as áreas demarcadas foram umedecidas com dez gotas de água. Então, os filmes

moistened with ten drops of water and spread on the skin for 30 seconds to ensure a more effective and uniform product absorption. Instrumental measurements were performed before (T0) and 30 min (T30), 60 min (T60) after application of the films, according to the EEMCO Guidance for the Assessment of TEWL in cosmetics (21).

Transepidermal water loss

Skin barrier effect was evaluated through Transepidermal Water Loss (TEWL). TEWL measurements were performed as illustrated in Figure 2, using Tewameter TW 210 probe (Courage & Khazaka, Köln, Germany), whose function is to measure the transepidermal water loss based on the diffusion principle described by Adolf Fick in 1885, adapted by Capitani et al. (22):

$$dm/dt = -D \times A \times dp/dx$$

Where dm/dt is the diffusion flux, A is the area, dc/dx is the concentration variation per distance, and D is the diffusion coefficient of water vapor in air. TEWL units are stated as $g.m^{-2}.h^{-1}$. The device probe was placed on the center of outlined skin areas and maintained in position to obtain 25 measurements (Figure 2).

foram randomizadamente aplicados por um pesquisador independente nos campos umedecidos e removidos após 15 minutos. Os resíduos das formulações foram então umedecidos com 10 gotas de água e espalhados na pele por 30 segundos para garantir uma absorção mais eficaz e uniforme do produto. As leituras instrumentais foram realizadas antes (controle - T0), 30 min (T30) e 60 min (T60) após a aplicação, de acordo com o EEMCO Guia para a avaliação de TEWL em cosmetologia (21).

Perda transepidermica de água

O efeito de barreira da pele foi avaliado pela perda transepidermica de água (TEWL). Para a determinação deste parâmetro foi utilizada a sonda Tewameter TW 210 (Courage & Khazaka, Köln, Alemanha), ilustrada na Figura 2, cuja função é medir a perda transepidermica de água, baseado no princípio da difusão descrito por Adolf Fick em 1885, adaptado por Capitani et al (22):

$$dm/dt = -D \times A \times dp/dx$$

Onde, dm/dt é o fluxo de difusão, A é a área, dc/dx é a alteração de concentração por distância e D é o coeficiente de difusão do vapor de água no ar. Os valores serão fornecidos em $g.m^{-2}.h^{-1}$. A sonda do aparelho foi colocada sobre a pele no centro dos campos demarcados nos antebraços e mantida pelo tempo necessário para a obtenção de 25 medidas (Figura 2).

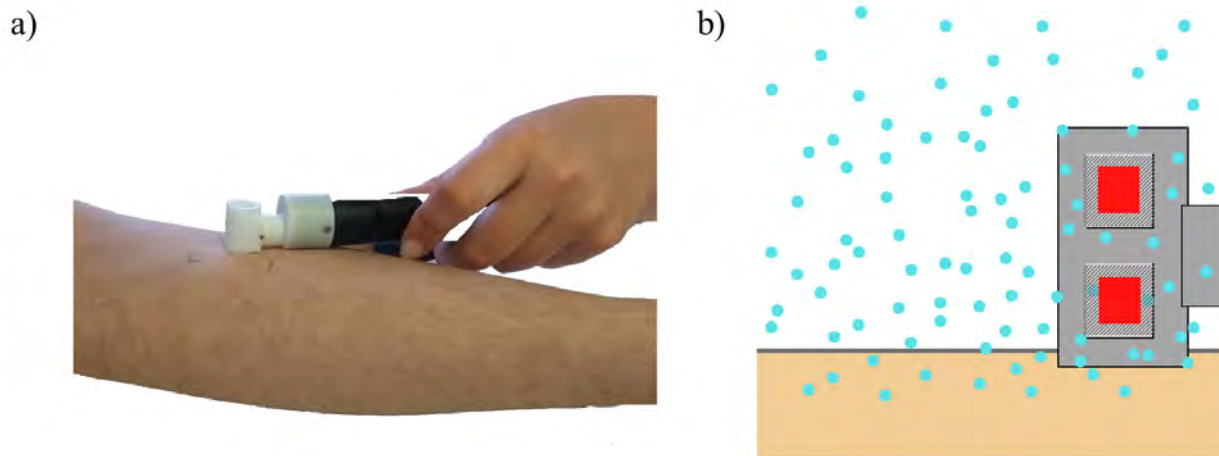


Figure 2 - a) Tewameter TW 210 probe applied to the skin to measure transepidermal water loss. b) Diagram illustrating the capture of transepidermal water loss.

Figura 2 - a) Sonda Tewameter TW 210 aplicada sobre a pele para medida de perda de água transepidermal. b) Diagrama que ilustra a captura da perda de água transepidermal.

Statistical analysis

One-way analyses of variance (ANOVA) were applied to test the differences among the formulations ($\alpha = 0.05$). Tukey's multiple comparison post-test was used to determine the differences among the obtained parameters. A confidence level of 95% was considered. Analyses were performed in GraphPad Prism 9.2.0 software (GraphPad, San Diego, LA, USA)

In order to compare the effects of different formulations on transepidermal water loss, the differences in the TEWL between the areas in which the films were applied and the control areas were calculated (23):

$$[(T_n - T_0) - (NT_n - NT_0)]$$

Where T_n in the TEWL at time n , T30 or T60 T_0 is the measure of TEWL at time T_0 , before application of the formulations, NT_n is the measure of TEWL of the control area at time n and, NT_0 is the measure of TEWL of the control area at time T_0 (23). The differences were then divided by the value of Transepidermal Water Loss in T_0 to obtain the increment percentage.

Análise estatística

Análises de variância unilateral (ANOVA) foram aplicadas para testar as diferenças entre as formulações ($\alpha = 0,05$). O pós-teste de comparação múltipla de Tukey foi usado para determinar as diferenças entre os parâmetros obtidos. Foi considerado um nível de confiança de 95% e as análises foram realizadas no GraphPad Prism 9.2.0 software (GraphPad, San Diego, LA, EUA).

Para comparar os efeitos das diferentes formulações na perda de água transepidermal foi realizado o cálculo da diferença da nos valores de perda de água transepidermal (TEWL) entre as áreas nas quais os filmes foram aplicados e as áreas controle (23):

$$[(T_n - T_0) - (NT_n - NT_0)]$$

Onde, T_n é o valor de TEWL no tempo n , T30 ou T60, T_0 é a medida de TEWL no tempo T_0 , antes da aplicação das formulações, NT_n é a medida de TEWL do campo controle no tempo n e NT_0 é a medida de TEWL do campo controle no tempo T_0 (23). As diferenças foram então divididas pelo valor da perda de água transepidermal em T_0 para obter-se a porcentagem de incremento.

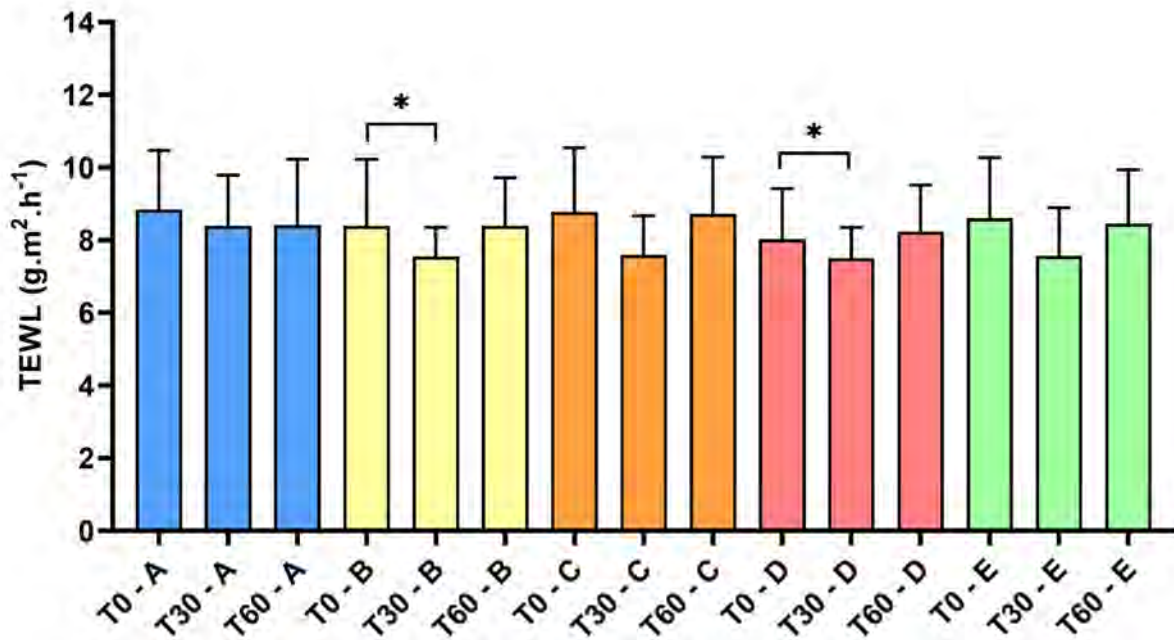


Figure 3 - Mean values of transepidermal water loss (TEWL) of the demarcated areas at times T_0 , before application, T30 minutes after and T60 minutes after application of the films, where A represents the control area, B, C, D and E represent the areas where the formulation FcB1, FcAA, FcB2 and FcAH, respectively, were applied.

Figura 3 - Médias de perda de água transepidermal (TEWL) das áreas demarcadas nos tempos T_0 , antes da aplicação, T30, 30 minutos após e T60, 60 minutos após a aplicação dos filmes, onde A representa a área controle, B, C, D e E, representam respectivamente as áreas onde as formulações FcB1, FcAA, FcB2 and FcAH foram aplicadas.

Results

The graphs shown in Figures 3 and 4 describe the averages of TEWL and the percentage difference of TEWL, respectively, in the evaluation of the cosmetic films at times T0, before application, and at 30 minutes (T30) and 60 minutes (T60) after application of the different films.

All formulations showed a reduction of at least -11% in the range of 0 to 30 minutes compared to the control. After 30 minutes of application, reduced the highest reduction in TEWL was recorded in the FcAA formulation, showing a -23.25 percent difference, followed by the FcB1 formulation, which reduced TEWL by 20.00%. TEWL was reduced 12.5% and 11% in the FcAH and FcB2 formulations, respectively.

Resultados

A perda de água transepidermal (TEWL) foi avaliada com auxílio da sonda Tewameter TW 210, os gráficos apresentados nas Figuras 3 e 4 descrevem as médias de TEWL e a diferença percentual de TEWL, respectivamente na avaliação dos filmes cosméticos nos tempos 0, antes da aplicação, 30 minutos após a aplicação dos filmes e 60 minutos após a aplicação dos filmes.

Todas as formulações mostraram uma redução de no mínimo 11% no intervalo de 0 a 30 minutos com relação ao campo controle. A formulação FcAA, foi a formulação que mais reduziu a TEWL, apresentando uma diferença percentual de 23,25%, seguida pela formulação FcB₁, que reduziu em 20%. As formulações FcAH e FcB₂, reduziram 12,5% e 11% respectivamente, podemos observar que as formulações mais oclusivas apresentaram uma redução no mínimo 60% maior do que as menos oclusivas neste intervalo de 0 a 30 minutos.

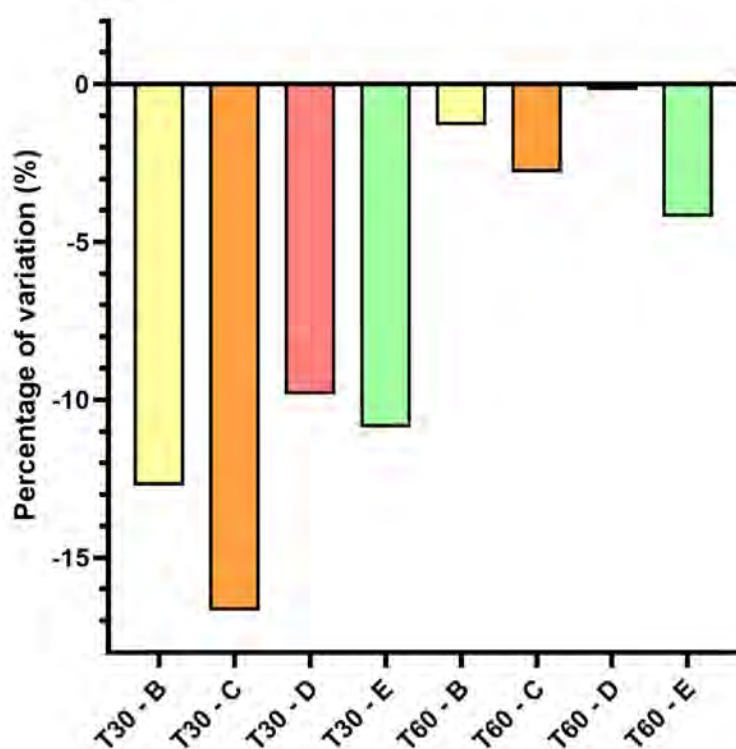


Figure 4 - Percentage difference in transepidermal water loss (TEWL) of the regions where the films were applied in relation to the control region, at times T0, before application, T30, 30 minutes after and T60, 60 minutes after application of the films, where B, C, D and E represent the areas where the formulation FcB1, FcAA, FcB2 and FcAH, respectively, were applied.

Figura 4 - Diferença percentual na perda de água transepidermal (TEWL) das regiões em que foram aplicados os filmes com relação a região controle, nos tempos T0, antes da aplicação, T30, 30 minutos após e T60, 60 minutos após a aplicação dos filmes, onde A representa a área controle, B, C, D e E, representam respectivamente as áreas onde as formulações FcB1, FcAA, FcB2 and FcAH foram aplicadas.

In the interval between 0 to 60 minutes, the FcB₁, FcAA, and FcAH formulations continued to show a reduction in TEWL compared to the control, with values of -5.00, -1.625 and -0.375%, respectively, while the FcB₂ formulation showed an increase of 1.75%.

Discussion

The films developed in this work showed a barrier recovery effect demonstrated by the reduction in TEWL (3,4). Cosmetic films are capable to form a continuous matrix with a compact shape on the skin (5) and inhibit TEWL by occlusion; one of the hydration action mechanisms (24). The occlusive moisturizers decrease TEWL by forming a hydrophobic film on the skin surface and contributing to the corneocytes matrix (24).

The formulations including caprylyl glycol, FcB₁ and FcAA, resulted in a more pronounced reduction in TEWL in both time intervals, showing better results as moisturizers than the formulations which did not include this ingredient. This TEWL decrease occurs because caprylyl glycol brings fatty material to the film-forming formulation, resulting in emollience and contributing to prevent transepidermal water loss on the skin surface (25). In the skin, the factor that most influences water loss is the composition and organization of lipids in the extracellular domains (26).

The decreased TEWL in the areas treated with formulations including caprylyl glycol or hyaluronic acid can also be explained by their humectant activity (10, 12). Those components attract water molecules to the skin surface (3, 4, 10, 12, 16, 17, 27), where they form an emulsion with skin lipids and sweat components, decreasing TEWL (27).

However, after 60 minutes, the TEWL values begin to return to basal levels, possibly due to product absorption. Furthermore, it is known that the reduction in TEWL values by the application of a topical formulation is related to the amount of product, the fatty content, and the lipid type present in the formulation (28). The addition of lipids with carbon chains of longer length provides lower skin barrier permeability and lower TEWL values (29). Thus, given that GC is a fatty alcohol with an intermediate carbon chain length, its emollient effect may have been reduced after a longer period of time (T60).

No intervalo de 0 a 60 minutos, as formulações FcB₁, FcAA e FcAH, continuaram a apresentar redução na TEWL com relação ao campo controle de 5, 1,625 e 0,375%, respectivamente, enquanto a formulação FcB₂, mostrou um aumento de 1,75% na TEWL, com relação ao campo controle no mesmo intervalo.

Discussão

Os filmes desenvolvidos nesse trabalho apresentaram efeito de recuperação da barreira epidérmica, demonstrado pela diminuição da perda de água transepidermal (3,4). Filmes cosméticos são capazes de formar uma matriz contínua de forma compacta na pele (5) e inibir a TEWL por oclusão; um dos mecanismos de hidratação (24). Os hidratantes oclusivos reduzem a TEWL, criando uma barreira hidrofóbica sobre a pele e contribuindo para a matriz entre os corneócitos (24).

As formulações adicionadas de Caprilil Glicol, FcB₁ e FcAA, apresentaram reduções mais pronunciadas na TEWL em ambos os intervalos, mostrando melhores resultados como hidratantes do que as formulações em que este ingrediente não estava presente. Essa diminuição do TEWL em formulações com caprylyl glycol acontece porque este componente traz material graxo para a formulação filmógena, ocasionando emolliencia e contribuindo para a prevenção de perda de água superficial da pele (25). Isso ocorre porque na pele o fator que mais influencia na perda de água é a composição e organização dos lipídios nos domínios extracelulares (26).

A diminuição da TEWL nas áreas em que as formulações adicionadas com caprilil glicol ou ácido hialurônico também pode ser explicada por sua atividade umectante (10, 12). Esses componentes atraem as moléculas de água para a superfície da pele (3, 4, 10, 12, 16, 17, 27), onde essa água forma uma emulsão com os lipídios da pele e componentes do suor, diminuindo a TEWL (27).

No entanto, após 60 minutos, os valores de TEWL começam a retornar aos seus níveis basais devido, possivelmente, à absorção dos produtos. Além disso, sabe-se que a redução dos valores de TEWL pela aplicação de formulação tópica está relacionada à quantidade de produto, ao conteúdo graxo e o tipo de lipídeo presente na formulação (28). A adição de lipídeos com maiores comprimentos de cadeias carbônicas proporciona uma menor permeabilidade da barreira cutânea e menores valores de TEWL (29). Desse modo, dado que o CG trata-se de um álcool graxo com tamanho intermediário

Further studies may explore the effects of cosmetic films added with emollients composed of longer fatty chains and other combinations of humectants in preserving and improving skin barrier function.

Conclusion

According to the observed results, it can be concluded that all the studied cosmetic films presented moisturizing power. Both the presence of caprylyl glycol and the presence of hyaluronic acid influenced the transepidermal water loss. For future studies, the importance of humectant and emollient components, as well as the size of the emollient molecules, must be taken into consideration.

Authors Contributions Statement

IMBG, conceptualization and study design; data analysis; drafting, editing and reviewing; MMV, conceptualization and study design; experimental implementation; drafting, editing and reviewing; LMA, data analysis; drafting, editing and reviewing; GRL, conceptualization and study design; supervision and final writing.

Funding

This study was financed in part by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Acknowledgements

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Finance Code 0001, and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Conflict of Interests

The authors declare there are no financial and/or personal relationships that could present a potential conflict of interests.

de cadeia carbônica, esse pode ter tido seu efeito emoliente reduzido após um maior período de tempo (T60).

Estudos futuros podem explorar os efeitos de filmes cosméticos adicionados de emolientes compostos por cadeias graxas maiores e outras combinações de umectantes na preservação e melhora da função da barreira cutânea.

Conclusões

De acordo com os resultados observados, pode-se concluir que todos os filmes cosméticos estudados apresentaram poder umectante. Tanto a presença de caprilil glicol quanto a presença de ácido hialurônico influenciaram na perda de água transepidermica. Para estudos futuros a importância dos componentes umectantes e emolientes, assim como o tamanho da molécula do emoliente devem ser levados em consideração.

Declaração sobre as contribuições do autores

IMBG, concepção e desenho do estudo; análise de dados, redação, edição e revisão; MMV, concepção e desenho do estudo; implementação experimental; redação, edição e revisão; LMA, análise de dados; redação, edição e revisão; GRL, concepção e desenho do estudo; supervisão e redação final.

Financiamento

Esse estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não há relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

1. Mojumdar, E. H., Pham, Q. D., Topgaard, D., & Sparr, E. (2017). Skin hydration: interplay between molecular dynamics, structure and water uptake in the stratum corneum. *Scientific reports*, 7(1), 15712. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15921-5>
2. Dos Santos, A. K. S. et al. (2019). A importância da hidratação da pele na resposta ao tratamento da flacidez cutânea utilizando radiofrequência. *Científica do Ciesa*, 148.
3. Spada, F., Barnes, T. M., & Greive, K. A. (2018). Skin hydration is significantly increased by a cream formulated to mimic the skin's own natural moisturizing systems. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 11, 491–497. <https://doi.org/10.2147/ccid.s177697>
4. Downie, J. B. (2010). Understanding moisturizers and their clinical benefits. *Practical Dermatology for Pediatrics*, September/October, 19–22.
5. Truiti, M. D. C. T., & Sanfelice, A. M. (2010). Produtos em filme – Inovação na tecnologia de cosméticos. *Acta Scientiarum. Health Science*, 32(1). <https://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v32i1.6987>
6. An, B., Lin, Y. S., & Brodsky, B. (2016). Collagen interactions: Drug design and delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 69–84. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.013>.
7. Lima, J.V., Moreira, M.N., Dos Santos, A.M., Brandão, M.R.S., De Aquino, A.A.(2020). Produção de Filme Ativo Adicionado de Óleo Essencial para Conservação de Queijos. *Revista INGI-Indicação Geográfica e Inovação*, 4 (2), 754-768.
8. Fratzl, P. (2008.). Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction. In Collagen (pp. 1–13). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-73906-9_1
9. Manela-Azulay, M., Mandrim-de-Lacerda, C.; Perez, M.A., Filgueira, A.L.& Cuzzi, T. (2003). Vitamina C / Vitamin C. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 3, 265.
10. Lee, D. H., Oh, I. Y., Koo, K. T., Suk, J. M., Jung, S. W., Park, J. O., Kim, B. J., & Choi, Y. M. (2014). Improvement in skin wrinkles using a preparation containing human growth factors and hyaluronic acid serum. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 17(1), 20–23. <https://doi.org/10.3109/14764172.2014.968577>
11. Belvedere, R., Bizzarro, V., Parente, L., Petrella, F., & Petrella, A. (2018). Effects of Prisma® Skin dermal regeneration device containing glycosaminoglycans on human keratinocytes and fibroblasts. *Cell adhesion & migration*, 12(2), 168–183. <https://doi.org/10.1080/19336918.2017.1340137>
12. Papakonstantinou, E., Roth, M., & Karakiulakis, G. (2012). Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-Endocrinology*, 4(3), 253–258. <https://doi.org/10.4161/derm.21923>
13. Rossi, S., Mori, M., Vigani, B., Bonferoni, M. C., Sandri, G., Riva, F., Caramella, C., & Ferrari, F. (2018). A novel dressing for the combined delivery of platelet lysate and vancomycin hydrochloride to chronic skin ulcers: Hyaluronic acid particles in alginate matrices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 118, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.03.024>
14. Iacopetti, I., Perazzi, A., Martinello, T., Gemignani, F., & Patruno, M. (2020). Hyaluronic acid, Manuka honey and Acemannan gel: Wound-specific applications for skin lesions. *Research in Veterinary Science*, 129, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.01.009>
15. Imai, Y., Usui, T., Matsuzaki, T., Yokotani, H., & Mima, H. (1967). The antiscorbutic activity of L-ascorbic acid phosphate given orally and percutaneously in guinea pigs. *Japanese journal of pharmacology*, 17(2), 317–324. <https://doi.org/10.1254/jjp.17.317>
16. Lawan, K., Kanlayavattanakul, M., Lourith, N. (2009). Antimicrobial efficacy of caprylyl glycol and ethylhexylglycerine in emulsion. *Journal of Health Research*, 23 (1), 1-3.
17. Ziosi, P., Manfredini, S., Vandini, A. & Vertuani, S. (2013). Caprylyl glycol/phenethyl alcohol blend for alternative preservation of cosmetics. *Cosmetics & Toiletries*, 128, 538-551.
18. Jansen van Rensburg, S., Franken, A., & Du Plessis, J. L. (2019). Measurement of transepidermal water loss, stratum corneum hydration and skin surface pH in occupational settings: A review. *Skin Research and Technology*, 25(5), 595–605. <https://doi.org/10.1111/srt.1271>.
19. Roy, S., & Rhim, J.-W. (2020). Preparation of carbohydrate-based functional composite films incorporated with curcumin. *Food Hydrocolloids*, 98, 105302. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105302>
20. Berardesca, E., & European Group for Efficacy Measurements on Cosmetics and Other Topical Products (EEMCO) (1997). EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 3(2), 126–132. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.1997.tb00174.x>
21. Rogiers, V. (2001) EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 14 (2), 117-128.
22. Capitani, R. D., Mercurio, D., Camargo Junior, F. B., & B. G. Maia Campos, P. M. (2012). Stability and Clinical Efficacy of Moisturizing Cosmetic Formulations Containing Vitamins C and E. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 9(2), 215–224. <https://doi.org/10.19277/bbr.9.2.44>
23. Bazin, R., & Fanchon, C. (2006). Equivalence of face and volar forearm for the testing of moisturizing and firming effect of cosmetics in hydration and biomechanical studies. *International journal of cosmetic science*, 28(6), 453–460. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00352.x>.
24. Kraft, J. N., & Lynde, C. W. (2005). Moisturizers: what they are and a practical approach to product selection. *Skin therapy letter*, 10(5), 1–8.
25. Correa, M. (2012) *Cosmetologia: ciência e técnica*. Medfarma, 67.
26. Lodén M. (2003). Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *American journal of clinical dermatology*, 4(11), 771–788. <https://doi.org/10.2165/00128071-200304110-00005>
27. Gil-Castaño, G., & Cardona, R. (2020). Emolientes: beneficios, elementos clave y aplicación clínica. *Revista alergia Mexico*, 67, 128-141. <https://doi.org/10.29262/ram.v67i2.730>.
28. Buraczewska, I., Broström, U., & Lodén, M. (2007). Artificial reduction in transepidermal water loss improves skin barrier function. *British Journal of Dermatology*, 157(1), 82–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.07965.x>
29. Petry, T., Bury, D., Fautz, R., Hauser, M., Huber, B., Markowetz, A., Mishra, S., Rettinger, K., Schuh, W., & Teichert, T. (2017). Review of data on the dermal penetration of mineral oils and waxes used in cosmetic applications. *Toxicology letters*, 280, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.899>

Clinical efficacy of a cosmetic formulation with vitamin B3 for the treatment of oily skin

Eficácia clínica de uma formulação cosmética contendo vitamina B3 para o tratamento da pele oleosa

Marcella Gabarra Almeida Leite & Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café S/N,
Monte Alegre, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brasil

*corresponding author / autor para correspondência: pmcampos@usp.br

Abstract

Oily skin has special needs, as the treatment and prevention of non-inflammatory acne and sebum control, maintaining skin barrier function and hydration. In this context, the importance of the development of specific and innovative cosmetics formulations to fulfill the needs of this type of skin is evident. In this view, the aim of this study was the evaluation of the clinical efficacy of a cosmetic formulation containing Vitamin B3 in the treatment of oily skin using biophysical and skin imaging techniques. Female volunteers (n=40) between 18 to 30 years old with oily skin and/or mild inflammatory acne were recruited and received a formulation containing, or not (vehicle), 3% of Vitamin B3. Stratum corneum water content, transepidermal water loss (TEWL), sebum content and quantity of porphyrins were analyzed before (baseline) and after 28 days of application. Finally, an efficacy perception questionnaire was applied at the study end. The formulation with vitamin B3, showed a significant reduction of sebum and porphyrin content. The study participants in the assessment of perceived efficacy also reported these results. The studied formulation with Vitamin B3 was effective for oily skin care, acting on important parameters, such as controlling oiliness and improving skin appearance.

Keywords: cosmetics, Niacinamide, skin physiology, oily skin, biophysical and skin imaging

Abstracto

A pele oleosa apresenta necessidades especiais, como o tratamento e a prevenção da acne inflamatória e controle do sebo, sem comprometer a integridade da função barreira e hidratação. Assim, a importância do desenvolvimento de formulações cosméticas específicas e inovadoras para esse tipo de pele, adequadas as suas necessidades, é evidente. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi a avaliação da eficácia clínica de formulações contendo vitamina B3 para o tratamento da pele oleosa por meio de técnicas de biofísica e análise de imagem. Participantes do sexo feminino (n=40), idade entre 18 e 30 anos, pele oleosa e/ou acne inflamatória foram selecionadas para o estudo e receberam a formulação contendo ou não (veículo) 3% de vitamina B3. Foram avaliados o conteúdo aquoso do estrato córneo, TEWL, conteúdo de sebo e porfirinas e aplicado um questionário da eficácia percebida. A formulação contendo vitamina B3 mostrou redução significativa no conteúdo de sebo e porfirinas. Esses resultados também foram relatados pelas participantes na avaliação da eficácia percebida. A vitamina B3 foi efetiva para a aplicação em formulações para os cuidados da pele oleosa, atuando em parâmetros importantes, como o controle da oleosidade e melhora da aparência da pele.

Palavras-chave: cosméticos, Niacinamida, fisiologia da pele, pele oleosa, biofísica e análise de imagem da pele

Introduction

Oily skin, also known as seborrhea, is one of the most common skin issues, most common in teenagers and young adults. In this type of skin, the sebaceous glands are characteristically oversized, leading to an excessive production of sebum, which causes a shiny and greasy appearance and can collaborate with the appearance of acne (1). It is also described as a thickening of the skin with the presence of enlarged pores, being more visible on the nose and forehead regions (2). These characteristics are usually esthetically disturbing, and are perceived as a serious cosmetic problem, with a negative influence on quality of life and self-perception (3).

This condition also requires special needs, as well as the treatment and prevention of non-inflammatory acne and control of sebum content, along with the integrity of skin barrier function and hydration. In this way, the application of vitamins in cosmetic formulations is an excellent alternative of treatment for this skin condition, and thus an important topic of interest for dermatological research.

Vitamin B3, also called Niacinamide, is described in the literature due to its many properties on the skin, including antiinflammatory, antipruritic, lightening, sebostatic and antimicrobial effects (4).

A study from Khodaeian and collaborators (2013) compared the use of vitamin B3 with clindamycin, which is extensively used in the dermatological field for the treatment of inflammatory acne and observed great results. This was also described by Shalita et al. (1995), reporting its use as a good alternative to the use of antibiotics and more advantageous due to the other reported benefits to the skin (5,6).

Nicotinamide, which is an amide form of vitamin B3, has the capacity of boosting cellular energy. It also regulates poly-ADP-ribose-polymerase 1, an enzyme with important roles in DNA repair and in the expression of inflammatory cytokines, which are useful for the treatment of a wide range of dermatological conditions, including acne (7).

In this context, vitamin B3 has potential benefits for the treatment of oily skin conditions, controlling the pathogenic factor of acne (*Cutibacterium acnes*) given to Niacinamide's antimicrobial properties as well as controlling the excessive production of sebum.

Introdução

A pele oleosa, também denominada seborreia, é uma das alterações mais comuns, acontecendo principalmente na adolescência e em jovens adultos. Nesse tipo de pele, as glândulas sebáceas se apresentam aumentadas, o que leva a uma produção excessiva de sebo, causando uma aparência brilhante e oleosa, podendo promover a formação de acne (1). É também descrita com um aumento da espessura da pele, com a presença de poros largos, se apresentando mais visíveis nas regiões do nariz e testa (2). Essas características são consideradas esteticamente perturbadoras e são consideradas um sério problema cosmético, apresentando influencia na qualidade de vida e auto percepção de forma negativa (3).

Essa condição apresenta necessidades especiais, assim como o tratamento e a prevenção da acne não inflamatória e o controle do sebo, em conjunto com a manutenção da integridade da função barreira da pele e hidratação. Dessa forma, a aplicação de vitaminas em formulações cosméticas é uma excelente alternativa para o tratamento dessa condição, sendo um tópico de interesse na pesquisa dermatológica.

A vitamina B3, também chamada de Niacinamida, é descrita na literatura devido as suas diversas propriedades no tratamento da pele. Estudos relatam que a vitamina B3 possui propriedades anti-inflamatória, antiprurítica, clareadora, seboestática e antimicrobiana (4).

Um estudo de Khodaeian e colaboradores (2013) comparou o uso da vitamina B3 com o da clindamicina, a qual vem sendo usada extensivamente no campo dermatológico para o tratamento da acne inflamatória e promovendo bons resultados. Essa comparação também foi descrita por Shalita et al (1995), se apresentando como uma boa alternativa para o uso de antibióticos e mais vantajosa, devido aos outros benefícios relatados para a pele (5,6).

Nicotinamida, a forma amida da vitamina B3, apresenta a capacidade de aumentar a energia celular e também regular a poli-ADP-ribose-polimerase 1, uma enzima que apresenta um papel importante no reparo do DNA e expressão de citocinas inflamatórias, o que é de grande importância para o tratamento de uma série de condições dermatológicas, incluindo a acne (7).

Nesse contexto, a vitamina B3 apresenta potenciais benefícios para o tratamento das condições da pele oleosa, controlando o fator patogênico da acne (*Cutibacterium acnes*), devido a função antimicrobiana da Niacinamida, assim como propriedades no controle da secreção de sebo.

Finally, considering that a previous study of our research group showed the benefits of the application of vitamin B3 in association with vitamin B6 and Zinc-PCA in the treatment of oily skin with inflammatory acne (8), the aim of the present study was to evaluate the clinical efficacy of formulations containing vitamin B3 for the treatment of oily skin using biophysical and skin imaging techniques.

Materials and Methods

Studied Formulation

Two topical formulations of gel creams based on xanthan gum, tribehenine esters PEG-20, octyldodecyl myristate, polypropylene and sorbitan PEG-10, added or not (vehicle) with 3% vitamin B3 - nicotinamide (Table 1) were prepared.

Study design

The present study was a monocentric, double-blinded, randomized, placebo-controlled study on the effects of a cosmetic formulation with added Vitamin B3 on oily skin after four weeks of treatment. The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto/SP (CEP / FCFRP 248/2012) and followed current Good Clinical Practice regulations.

All test subjects received detailed information listing every single relevant parameter to the study and all the procedures involved. All subjects gave signed informed consent after written information and a possibility for further questioning. The study was performed in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2013.

Participants

A total of 40 healthy female subjects were enrolled in the study: 20 subjects were randomized to each of two treatment groups using the cosmetic formulations under study, which included or not 3% Vitamin B3 (Nicotinamide). The volunteers were instructed to apply the formulation to the face twice daily for a period of four weeks. Baseline and final measures were done in the frontal (forehead), malar (cheeks) and chin regions.

Por fim, considerando um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa que mostrou os benefícios da aplicação da vitamina B3 em associação com a vitamina B6 e Zn-PCA no tratamento da pele oleosa com acne inflamatória (8), o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia clínica de uma formulação cosmética contendo vitamina B3 para o tratamento da pele oleosa por meio de técnicas de biofísica e análise de imagem da pele.

Material e Métodos

Formulações estudada

Foram elaboradas duas formulações tópica de creme de gel à base de goma xantana, ésteres de tribehenina PEG-20, miristato de octildodecil, polipropileno e sorbitano PEG – 10, adicionada ou não (veículo) com 3% de vitamina B3 – nicotinamida (Tabela 1).

Design de estudo

O presente estudo foi um estudo monocêntrico, duplo-cego, randomizado, controlado, placebo, sobre os efeitos de formulações cosméticas adicionadas com vitamina B3 na pele oleosa após quatro semanas de tratamento. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / SP (CEP / FCFRP 248/2012) e seguiu os regulamentos atuais de Boas Práticas Clínicas.

Todos os sujeitos do teste receberam informações detalhadas listando todos os parâmetros relevantes para o estudo e todos os procedimentos envolvidos. Todos os sujeitos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido após informações por escrito e a possibilidade de mais questionamentos. Este estudo foi realizado de acordo com os padrões éticos da Declaração de Helsinque de 1975, revisada em 2013.

Participantes

Um total de 40 indivíduos saudáveis do sexo feminino foram incluídos no estudo: 20 indivíduos foram randomizados para cada um dos dois grupos de tratamento para usar as formulações cosméticas em estudo que foi adicionada ou não com 3% de vitamina B3 (nicotinamida). Os voluntários foram instruídos a aplicar a formulação na região facial, duas vezes ao dia por um período de quatro semanas. As medidas basais e finais foram realizadas nas regiões frontal (testa), malar (bochechas) e queixo.

Table 1 - Composition of studied formulations
Tabela 1 - Composição das formulações estudadas

Composition / Composição (INCI Name)	Supplier / Fornecedor
Tribehenin Esters PEG-20	(Emulium [®] 22, Gatefossé),
Xanthan gum	CP Kelco [®]
Butylene glycol	Mapric [®]
Propylene glycol	Mapric [®]
Octyldodecyl Myristate	MOD [®] , Gatefossé
PEG - 10 Sorbitan	Tween [®] 20, Mapric
Butylated hydroxytoluene	BHT, Mapric [®]
Cyclopentasiloxane	DC [®] 245, Dow Corning
Water / Aqua	-
Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben and Butylparaben	Chemynol [®] , Chemyunion
Vitamin B3 / Vitamina B3	Niacinamide PC [®] , DSM

The inclusion criteria for this study were healthy females ranging in age from 18-30 years (homogeneous distribution between treatment groups); presenting oily skin and acne, phototype II-IV (Fitzpatrick scale); general good health and mental condition; avoid sun exposure during the study period; personal informed consent to participate in the study; personal presence on the predefined days at the institute, and willingness and capability to follow the study rules and a fixed schedule, know that the data could be used to share the project. The study participants were also instructed not to use other cosmetic products and to maintain their alimentary habits during the study period.

The exclusion criteria was as follows: any deviation from the above-mentioned inclusion criteria: pregnancy (or intention to become pregnant) or in period of breast feeding; skin diseases (e.g., atopic eczema, neurodermatitis or psoriasis) on the test areas or other dermatological disorders (e.g., scars, sunburn or moles), whose therapy could influence the results of the study, such as systemic steroids or antibiotics, steroids or local immunomodulatory topics three months prior to the study; smoking habit; severe disorders within 6 months prior to study start (e.g., cancer, acute cardiac and circularity disorders, severe diabetes, or alcohol or drug abuse); history of medical or surgical events that could significantly affect the outcome of the study, including any cardiovascular disease, skin disease, gastrointestinal diseases, indigestion, hypertension (>160/95 mm Hg on repeated measurements); participation in any other

Os critérios de inclusão para este estudo foram mulheres saudáveis, com idade entre 18 e 30 anos (distribuição homogênea entre os grupos de tratamento), apresentando pele oleosa e acne, fototipo II-IV (escala de Fitzpatrick); boa saúde geral e condição mental; evitar a exposição ao sol durante o período do estudo; consentimento pessoal informado para participar do estudo; presença pessoal nos dias predefinidos no instituto e disposição e capacidade de seguir as regras do estudo e um cronograma fixo, informadas de que os dados podem ser usados para compartilhar o projeto. Também foi instruído aos participantes do estudo que não usassem outros produtos cosméticos e que não mudassem seus hábitos alimentares durante o período do estudo.

Os critérios de exclusão foram os seguintes: qualquer desvio dos critérios de inclusão mencionados acima: gravidez (ou intenção de engravidar) ou no período de amamentação; doenças de pele (por exemplo, eczema atópico, neurodermatite ou psoríase) nas áreas de teste ou outros distúrbios dermatológicos (por exemplo, cicatrizes, queimaduras ou moles), cuja terapia pode influenciar os resultados do estudo, como esteróides sistêmicos ou antibióticos, esteróides ou agentes locais tópicos imunomoduladores três meses antes do estudo; hábito de fumar; distúrbios graves dentro de 6 meses antes do início do estudo (por exemplo, câncer, distúrbios cardíacos e de circularidade agudos, diabetes grave ou abuso de álcool ou drogas); histórico de eventos médicos ou cirúrgicos que podem afetar significativamente o resultado do estudo, incluindo

clinical study; medical treatments on the study area 30 days before the study start; use of tanning beds or self-tanning products a month before or during the study; any other condition that, in the opinion of the investigator, may interfere with the results or involve a risk to the subject (9).

Assessments

The test areas were frontal (forehead), malar (cheeks) and chin regions, with sides randomly chosen. Prior to every measurement, the subjects were required to expose their uncovered test areas to the indoor climate conditions (21.5 ± 1 °C and $50 \pm 5\%$ relative humidity) for 20 min.

Measurements were made immediately before starting the product treatment (baseline values) and after 14 (t14) and 28 days (t28) of study.

The transepidermal water loss (TEWL) measurement was carried out with a Tewameter® TM 210 (Courage Khazaka, Electronic GmbH, Germany), which measures the percentage relative humidity at the skin surface. It uses a sensing electrode encased in a proper probe and is based on the principles described by Adolf Fick in 1885. The values are registered in $g/m^2 \cdot h$. The probe of the device remained in contact with the skin to obtain 45 measurements in three study areas. Three measurements were made in each study area and the average of the obtained values was calculated (10).

The casual sebum level was determined with a photometric device (Sebumeter® SM 815, Courage+Khazaka, Cologne, Germany). A special opaque plastic tape (64 mm^2) was pressed onto the skin for 30 s with a slight pressure to collect the sebum. The resulting increase in the transparency of the tape was measured, where the displayed values correspond to the sebum amount on the skin surface in micrograms of sebum per square centimeter (11).

To count porphyrins in follicular surface, a Visiopor® PP 34 system (Courage+Khazaka, Cologne, Germany) was used. It uses a specific UV-light camera to visualize the lesions of acne fluorescent an area of $8 \times 10 \text{ mm}$. Three images were obtained at the same location in each region (forehead, cheek, and chin) and conducted by counting the number of orange-red fluorescent spots in each image using the device's software. These points are porphyrin's endogenous metabolites of the bacteria *P. acnes*. Statistical analysis was used to average points scored between the three images (12).

qualquer doença cardiovascular, doença de pele, doenças gastrointestinais, indigestão, hipertensão ($> 160/95 \text{ mm Hg}$ em medições repetidas); participação em qualquer outro estudo clínico; tratamentos médicos na área de estudo 30 dias antes do início do estudo; uso de camas de bronzeamento ou produtos de autobronzeamento um mês antes ou durante o estudo; qualquer outra condição que, na opinião do investigador, possa interferir nos resultados ou envolva um risco para o sujeito (9).

Avaliação clínica

As áreas de teste foram as regiões frontal (testa), malar (bochechas) e queixo, com os lados escolhidos aleatoriamente. Em todas as medições, as participantes tiveram que expor suas áreas de teste descobertas às condições climáticas internas ($21,5 \pm 1$ °C e $50 \pm 5\%$ de umidade relativa) por 20 minutos.

Foram realizadas medidas imediatamente antes de iniciar o tratamento (valores basais) e após 14 (t14) e 28 dias (t28) de estudo.

A medição da perda de água transepidermica (TEWL) foi realizada por meio do Tewameter® TM 210 (Courage Khazaka, Electronic GmbH, Alemanha), que mede a porcentagem de umidade relativa na superfície da pele. Utiliza um eletrodo sensor envolto em uma sonda adequada, com base nos princípios descritos por Adolf Fick em 1885. Os valores são registrados em $g / m^2 \cdot h$. A sonda do dispositivo permanece em contato com a pele para obter 45 medidas em três áreas de estudo. Três medidas foram feitas em cada área de estudo e calculou a média dos valores obtidos (10).

O nível de sebo casual foi determinado com um dispositivo fotométrico (Sebumeter® SM 815, Courage + Khazaka, Colônia, Alemanha). Uma fita plástica opaca especial (64 mm^2) foi pressionada sobre a pele por 30 s com uma leve pressão para coletar o sebo. O aumento resultante na transparência da fita foi medido e os valores exibidos correspondem à quantidade de sebo na superfície da pele em microgramas de sebo por centímetros quadrados (11).

Para contagem de porfirinas na superfície folicular foi utilizado o equipamento Visiopor® PP 34. Este equipamento, utiliza uma câmera de luz UV específica para visualizar as lesões da acne fluorescente em uma área de $8 \times 10 \text{ mm}$. Três imagens foram obtidas no mesmo local em cada região e conduzidas contando o número de pontos fluorescentes vermelho-alaranjado em cada imagem através do próprio software do dispositivo. Esses pontos são metabólitos endógenos

Finally, at the end of the study, perception of efficacy was analyzed through a questionnaire that compared and analyzed the skin before and after treatment in terms of reducing oiliness, blackheads, acne and improvement in skin hydration and smoothness.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed according to the data distribution. For the normal distribution, the ANOVA test was applied. For the nonparametric, the Friedman test was performed using the GraphPad Prism 5 software.

Results and Discussion

After statistical analysis of the parameters evaluated in the long-term efficacy study, it was observed that the formulation containing vitamin B3 showed a significant reduction of the amount of sebum after 28 days of application when compared to baseline values (Figure 1). This effect was not observed in the groups utilizing the vehicle.

das porfirinas da bactéria *P. acnes*. A análise estatística foi usada para a média de pontos marcados entre as três imagens (12).

Por fim, foi realizada após o final do estudo uma análise da percepção de eficácia por meio de um questionário que comparava e analisava a pele antes e após o tratamento em termos de redução da oleosidade, cravos, acne e melhora da hidratação e suavidade da pele.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada de acordo com a distribuição dos dados, sendo que para uma distribuição normal aplicou-se o teste paramétrico ANOVA e não normal, o teste não paramétrico, Friedman, realizado pelo software GraphPad Prism 5.

Resultados e Discussão

Após análise estatística dos parâmetros avaliados no estudo de eficácia em longo prazo, observou-se que a formulação contendo vitamina B3 promoveu redução significativa da quantidade de sebo após 28 dias de aplicação em comparação com os valores basais (Figura 1). Este efeito não foi observado no grupo que utilizou a formulação veículo.

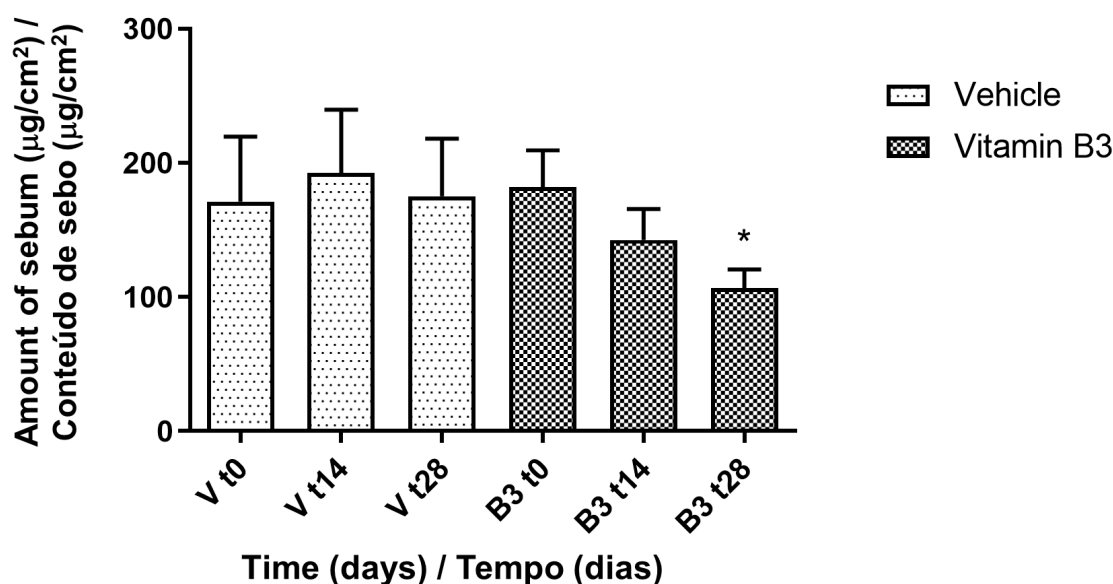


Figure 1 - Sebum content on the frontal region before (baseline values – t0) and after application during 14 (t14) and 28 (t28) days of treatment with the Vehicle – V and with the formulation containing 3% of vitamin B3 – B3. *Significantly different from the baseline values ($p < 0.05$).

Figura 1 - Conteúdo de sebo na região frontal antes (valores basais – t0) e após a aplicação durante 14 (t14) e 28 dias (t28) de tratamento com as formulações Veículo – V e contendo 3% de vitamina B3 – B3. *Significante em relação aos valores basais ($p < 0,05$).

A decrease in the number of spots of porphyrin in the group that utilized the vitamin B3 formulation was also observed (Figure 2). The statistical analysis showed that the results were more pronounced in the frontal region of the face.

No significant alterations were observed in the Transepidermal Water Loss.

In the evaluation of the perception of effectiveness, it was possible to observe that the study participants perceived a reduction in the amount of sebum, blackheads and acne after treatment with the formulation containing vitamin B3. In addition, an improvement in skin hydration and smoothness was reported (Figure 3).

Topical nicotinamide has been shown to be useful in the treatment of acne vulgaris due to its sebo-suppressive, anti-inflammatory, and healing properties. The evaluation of the results showed that the topical application of formulations containing nicotinamide presented a significant reduction in the amount of sebum after and also a significant reduction in the porphyrin count after 28 days of application. This result can be explained by the reported anti-microbiological effect (13).

Também foi observada uma diminuição na contagem de porfirina no grupo que utilizou a formulação de vitamina B3 após 28 dias de tratamento (Figura 2). Além disso, a análise estatística mostrou que os resultados foram mais pronunciados na região frontal da face.

Não foram observadas alterações significativas na perda transepidermica de água.

Na avaliação da percepção de eficácia foi possível observar que as participantes do estudo perceberam uma redução na quantidade de sebo, cravos e acne após o tratamento com a formulação contendo vitamina B3, além de melhora na hidratação e suavidade da pele (Figura 3).

A nicotinamida tópica demonstrou ser efetiva no tratamento da acne vulgar devido ao seu efeito sebo-supressor, propriedades anti-inflamatórias e curativas. A avaliação dos resultados mostrou que a aplicação tópica de formulações contendo nicotinamida apresentou uma redução significativa no conteúdo de sebo após e também uma redução significativa na contagem de porfirinas após 28 dias de aplicação. Esse resultado pode ser explicado devido ao seu efeito antimicrobiano (13).

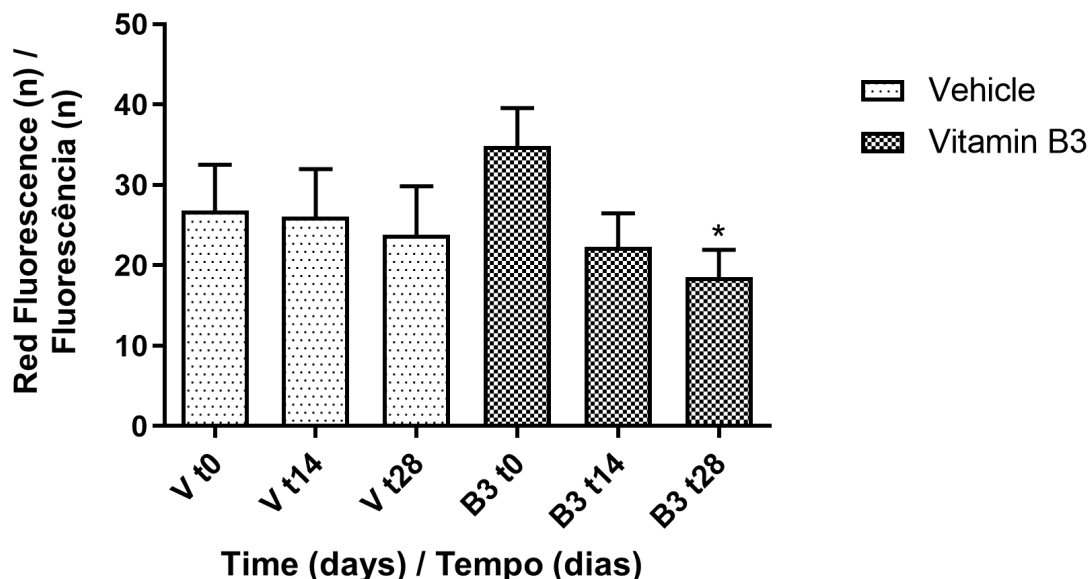


Figure 2 - Porphyrin content on the frontal region before (baseline values – t0) and after application during 14 (t14) and 28 (t28) days of treatment with the Vehicle -V and with the formulation containing 3% of vitamin B3 –B3. *Significantly different from the baseline values (p<0.05).

Figura 2 - Conteúdo de porfirinas - fluorescência na região frontal antes (valores basais – t0) e após a aplicação durante 14 e 28 dias de tratamento com as formulações Veículo –V e contendo 3% de vitamina B3 – B3. *Significante em relação aos valores basais (p<0,05).

A previous study of our research group (12) showed that the presence and amount of porphyrins on the face are related to the secretion of sebum on the skin and a positive correlation among these features was found. In this context, the reduction of sebum along with the secretase of porphyrin count on the skin corroborates with the previous results of our research.

Alterations on the skin microbiome related to skin type have also been reported in the literature, where an increase in *Cutibacterium acnes* bacteria is observed in individuals with oily skin, as the bacteria consume this oil (14).

In this context, the present study showed that the use of 3% vitamin B3 presented a significant reduction in sebum content and porphyrins spots after 28 days of application. In addition, previous studies (15) reported that topical use of nicotinamide has been shown to improve fine lines and wrinkles, hyperpigmented spots, red blotchiness, and sallowness (yellowing), as well as skin elasticity.

An increase of the skin's production of collagen and ceramides, stimulating keratinocyte differentiation, has also been reported, leading to an improvement of barrier function and skin appearance. It is important to highlight that the use of nicotinamide is comparable to topical antibiotic treatment with clindamycin gel (16), with the advantage that the side effects of nicotinamide

Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (12) mostrou que a presença e a quantidade de porfirinas no rosto estão relacionadas à secreção de sebo na pele e foi encontrada uma correlação positiva entre essas características. Nesse contexto, a redução do sebo juntamente com redução da contagem de porfirinas na pele corrobora com os resultados anteriores de nossa pesquisa.

Também foi relatado na literatura que as alterações na microbiota da pele estão relacionadas ao tipo de pele, observando-se que a pele oleosa apresenta um aumento na bactéria *Cutibacterium acnes* devido à quantidade excessiva de óleo consumida por essa bactéria (14).

Nesse contexto, o presente estudo mostrou que o uso de 3% de vitamina B3 apresentou uma redução significativa no conteúdo de sebo e porfirinas após 28 dias de aplicação. Além disso, estudos anteriores (15) relataram que o uso tópico de nicotinamida demonstrou melhorar as linhas finas e rugas, manchas hiperpigmentadas, manchas vermelhas e amarelamento, bem como a elasticidade da pele.

Também foi relatado um aumento da produção de colágeno e ceramidas da pele, que estimula a diferenciação de queratinócitos, levando a uma melhora da função barreira e aparência da pele. É importante destacar que o uso da nicotinamida é comparável ao tratamento antibiótico tópico com gel de clindamicina

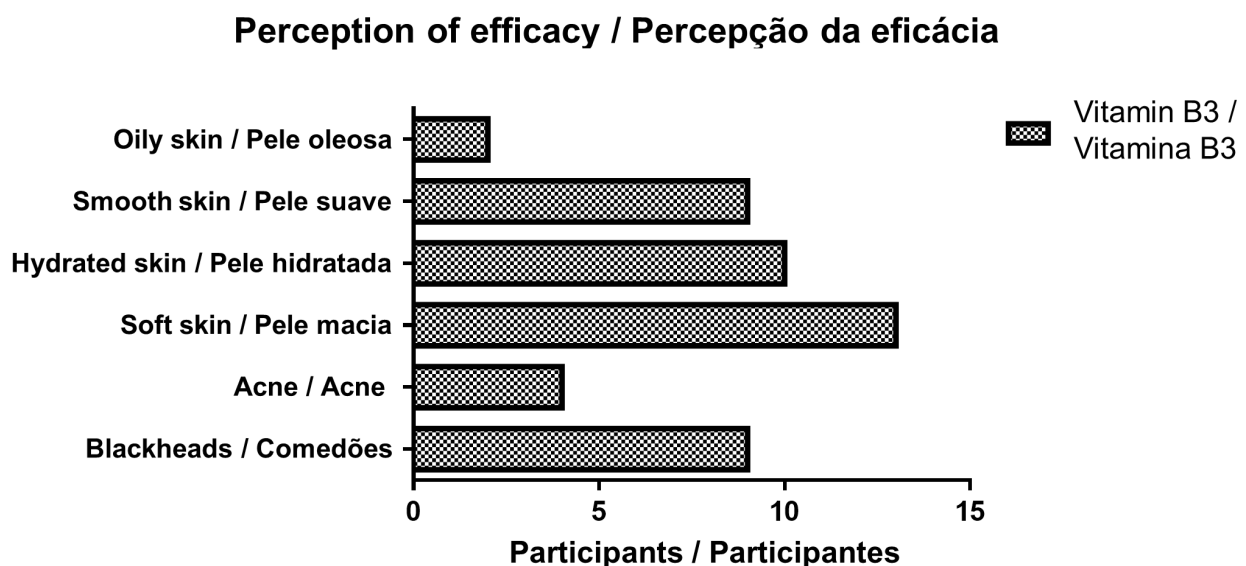


Figure 3 - Efficacy perception analysis after 28 days of treatment with the formulations containing 3% of Vitamin B3.
Figura 3 - Percepção da eficácia após 28 dias de tratamento com as formulações contendo 3% de vitamina B3.

are much safer than those of antibiotics substances and that it does not create antibiotic-resistant pathogens. This way, the use of vitamin B3 can be presented as an excellent alternative for the treatment of oily skin (17).

These effects have a great importance to the dermatological area as it contributes to the treatment of oily skin as a whole, without the use of any of the classical substances for these skin conditions which are usually more aggressive to skin health as a whole. Furthermore, the addition of substances that can improve the skin barrier function, keeping the maintenance of skin layers, is very important, as it does not cause damages while treating the excess of sebum.

At the same time, in the efficacy perception evaluation, the participants reported that their skin did not feel oily and a reduction in the presence of acne and blackheads was observed. Also, the participants also reported that they perceived their skin to be more hydrated, smooth and soft. The perceived efficacy is of great importance, as the observed effects by the participants support adherence to the treatment and consequently the efficacy with the application of the formulation (12).

In summary, after a statistical analysis of the obtained data, the formulation under study containing vitamin B3 showed a significant reduction of the amount of sebum when compared to baseline values. A reduction in the porphyrin count was also observed, with no alterations to the skin barrier. The applied questionnaires showed that the participants felt an improvement in the overall skin appearance and well-being while using the formulation under study.

In conclusion, the vitamin B3 was effective for application within formulations for oily skin care, reducing the amount of sebum and the porphyrin count while improving the appearance of skin and the participants well-being. Formulations containing vitamin B3 may be a excellent alternative for the treatment of oily skin, due to its complementary properties in improving skin conditions and women's quality of life.

Finally, the study has as its contribution the clinical, analytical evidence of the benefits of the topical use of vitamin B3 for the control of oily skin.

(16), com a vantagem de que os efeitos colaterais da nicotinamida são muito mais seguros que os das substâncias antibióticas e que não cria patógenos resistentes a antibióticos. Dessa forma, o uso de vitamina B3 pode ser apresentado como uma ótima alternativa ao tratamento da pele oleosa (17).

Esses efeitos têm uma grande importância para a área dermatológica, pois contribuem para o tratamento da pele oleosa como um todo, sem o uso de qualquer substância clássica para essas condições de pele, que geralmente são mais agressivas à saúde da pele como um todo. Além disso, a adição de substâncias que podem melhorar a função de barreira da pele, mantendo a manutenção das camadas da pele, é muito importante, pois não causa danos ao tratar o excesso de sebo.

Ao mesmo tempo, na avaliação da percepção de eficácia, os participantes relataram não sentir a pele oleosa e observou-se uma redução na presença de acne e cravos. Além disso, os participantes relataram perceber que a pele ficou mais hidratada e macia. A eficácia percebida é de grande importância, uma vez que os resultados obtidos nas medidas instrumentais são observados pelos participantes do estudo (18), o que auxilia na adesão ao tratamento e consequentemente na eficácia com a aplicação da formulação (12).

Em síntese, após a análise estatística dos dados obtidos, a formulação contendo vitamina B3 em estudo mostrou redução significativa da quantidade de sebo quando comparada aos valores basais. Também foi observada uma redução na contagem de porfirinas e não foram observadas alterações na barreira cutânea. Os questionários aplicados mostraram que os participantes sentiram uma melhora na aparência geral e no bem-estar da pele ao usar a formulação em estudo.

Em conclusão, a vitamina B3 foi eficaz para aplicação em formulações oleosas para o cuidado da pele, reduzindo a quantidade de sebo e porfirina, melhorando a aparência da pele e o bem-estar dos participantes, sendo uma ótima alternativa para o tratamento da pele oleosa, devido às suas propriedades complementares na melhora das condições da pele e da qualidade de vida das mulheres.

Por fim, o estudo tem como contribuição a comprovação clínica dos benefícios do uso tópico da vitamina B3 para o controle da oleosidade da pele por medidas instrumentais.

Author Contributions Statement

Study conceptualization: Patricia M.B.G. Maia Campos. Methodology: Patricia M.B.G. Maia Campos and Marcella G.A. Leite. Formal analysis: Patricia M.B.G. Maia Campos and Marcella G.A. Leite. Writing: Patricia M.B.G. Maia Campos and Marcella G.A. Leite. Writing – review and editing: Patricia M.B.G. Maia Campos.

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to Fapesp – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Conflict of Interests

Editors involved in this manuscripts' authorship had no participation in the review or decision process. All authors have stated that there are no financial and/or personal relationships that could represent a potential conflict of interest.

Declaração dos contributos de cada autor

Concepção e desenho do estudo: Patricia M.B.G. Maia Campos. Metodologia: Patricia M.B.G. Maia Campos e Marcella G.A. Leite. Análise formal: Patricia M.B.G. Maia Campos e Marcella G.A. Leite. Redação: Patricia M.B.G. Maia Campos e Marcella G.A. Leite. Redação – revisão e edição: Patricia M.B.G. Maia Campos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar seus agradecimentos à FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Conflito de interesses

O Editor presente na autoria deste manuscrito não participou nos processos de revisão e/ou decisão. Os autores declararam não possuir quaisquer relações financeiras ou que possam configurar um potencial conflito de interesse.

References / Referências

1. Sakuma, T.H., Maibach, H.I. (2012) Oily Skin: An Overview. *Skin pharmacology and physiology*, 25(5), 227–235. <https://doi.org/10.1159/000338978>
2. Nouveau-Richard, S., Zhu, W., Li, Y. H., Zhang, Y. Z., Yang, F. Z., Yang, Z. L., Lian, S., Qian, B. Y., Ran, Y. P., Bouillon, C., Chen, H. D., & de Lacharrière, O. (2007). Oily skin: specific features in Chinese women. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 13(1), 43–48. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2006.00185.x>
3. Wu, Y., Niu, Y., Zhong, S., Liu, H., Zhen, Y., Saint-Leger, D., Verschoore, M. (2013) A preliminary investigation of the impact of oily skin on quality of life and concordance of self-perceived skin oiliness and skin surface lipids (sebum). *International Journal of Cosmetic Science*, 35, 442–447. <https://doi.org/10.1111/ics.12063>
4. Wohlrab, J., Kreft, D. (2014) Niacinamide – Mechanisms of Action and Its Topical Use in Dermatology. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27, 311–315. <https://doi.org/10.1159/000359974>
5. Khodaeiani, E., Fouladi, R.F., Amirnia, M., Majid, S., Karimi, E.R. (2013) Topical 4% nicotinamide vs. 1% clindamycin in moderate inflammatory acne vulgaris. *International Journal of Dermatology*, 2013, 52: 999–1004. <https://doi.org/10.1111/ijd.12002>
6. Shalita, A.R., Smith, J.G., Parish, L.C. (1995) Topical nicotinamide compared with clindamycin gel in the treatment of inflammatory acne vulgaris. *International Journal of Dermatology*, 34, 434–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1995.tb04449.x>
7. Chen, A.C., Damian, D.L. (2014) Nicotinamide and the skin. *Australasian Journal of Dermatology*, 55, 169–175. <https://doi.org/10.1111/ajd.12163>
8. Andrade, J.P., Wagemaker, T.A.L., Mercurio, D.G., Maia Campos, P.M.B.G. (2018) Benefits of a dermocosmetic formulation with vitamins B3 and a B6 derivative combined with zinc-PCA for mild inflammatory acne and acne-prone skin. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 15(2), 214–223. doi: 10.19277/bbr.15.2.188
9. Maia Campos, P.M.B.G., Melo, M.O., Calixto, L.S., Fossa, M.M. (2015) An Oral Supplementation Based on Hydrolyzed Collagen and Vitamins Improves Skin Elasticity and Dermis Echogenicity: A Clinical Placebo-Controlled Study. *Clinical Pharmacology Biopharmaceutic*, 4, 142. doi:10.4172/2167-065X.1000142
10. Rogiers, V., EEMCO Group. (2001) EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacology and Physiology*, 14(2), 117- 128. <https://doi.org/10.1159/000056341>
11. Crowther, J.M. (2015) Method for quantification of oils and sebum levels on skin using the Sebumeter®. *International Journal of Cosmetic Science*, 38, 210–216. <https://doi.org/10.1111/ics.12258>
12. Gabarra Almeida Leite, M., & Maia Campos, P. (2020). Correlations between sebaceous glands activity and porphyrins in the oily skin and hair and immediate effects of dermocosmetic formulations. *Journal of cosmetic dermatology*, 19(11), 3100–3106. <https://doi.org/10.1111/jocd.13370>
13. Rolfe H. M. (2014). A review of nicotinamide: treatment of skin diseases and potential side effects. *Journal of cosmetic dermatology*, 13(4), 324–328. <https://doi.org/10.1111/jocd.12119>
14. Zheng, Y., Liang, H., Zhou, M., Song, L., He, C. (2021) Skin bacterial structure of young females in China: The relationship between skin bacterial structure and facial skin types. *Experimental Dermatology*, 30(10), 1366-1374. <https://doi.org/10.1111/exd.14105>
15. Tran, D., Townley, J.P., Barnes, T.M., Greive, K.A. (2015) An antiaging skin care system containing alpha hydroxy acids and vitamins improves the biomechanical parameters of facial skin. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 8, 9–17. <https://doi.org/10.2147/CCID.S75439>
16. Khodaeiani, E., Fouladi, R.F., Amirnia, M., Saeidi, M., Karimi, E.R. (2013) Topical 4% nicotinamide vs. 1% clindamycin in moderate inflammatory acne vulgaris. *International Journal of Dermatology*, 52, 999–100. <https://doi.org/10.1111/ijd.12002>
17. Wohlrab, J., Kreft, D. (2014) Niacinamide - Mechanisms of Action and Its Topical Use in Dermatology. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27, 311-315. <https://doi.org/10.1159/000359974>
18. Bonilha, G.C., Costa, G.M.D. Maia Campos, P.M.B.G. (2020) Rheological, texture, and sensory analyses and *in vivo* clinical efficacy of cosmetic formulations containing ascorbyl tetraisopalmitate. *Biomedical Biopharmaceutical Research*, 17(1), 1-12. doi: 10.19277/bbr.17.1.228

***Cecropia pachystachya* protection against preproIAPP cytotoxicity is independent of Ca²⁺ homeostasis: lessons learned using a novel yeast model of preproIAPP-induced Ca²⁺ intracellular dysregulation**

Efeito protetor de Cecropia pachystachya contra a citotoxicidade do preproIAPP é independente da homeostasia do Ca²⁺: conhecimento revelado por um modelo de levedura de desregulação de Ca²⁺ mediada pelo preproIAPP

Sofia Ferreira¹, Rejane G. Tavares^{1,2}, Ana F. Raimundo^{3,4,5}, Francieli M. Stefanello⁶, Flavio H. Reginatto⁷, Nuno Saraiva¹, Regina Menezes^{1,3,5*}

¹CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ²Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; ³IBET - Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal; ⁴ITQB-NOVA, Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, 2781-157 Oeiras, Portugal; ⁵CEDOC, NOVA Medical School|Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA de Lisboa, Campo dos Mártires da Pátria, 130, 1169-056 Lisboa, Portugal; ⁶Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; ⁷Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

*corresponding author / autor para correspondência: regina.menezes@ulusofona.pt

Abstract

Despite the progresses in therapeutics, type 2 diabetes is still an epidemic with alarming numbers worldwide. New strategies for prevention and treatments are imperative. A venue of research with potential is the aggregation of Islet Amyloid PolyPeptide (IAPP), a contributor to pancreatic β -cell dysfunction. To address the impact of IAPP on calcium (Ca²⁺) signalling, we developed a dual reporter yeast model independently expressing preproIAPP-GFP (ppIAPP) and encoding the *lacZ* gene under the control of Crz1-recognition elements. In this reporter system, ppIAPP induced Crz1 hyperactivation, a yeast transcription factor activated by the Ca²⁺/calmodulin/calcineurin pathway, which was followed by the increase in β -galactosidase activity. Encouraged by the reported healthy effects of *Urticaceae* plants against metabolic disturbances, we tested the protective potential of *Cecropia pachystachya* against IAPP-induced cytotoxicity using the newly designed yeast model. Although *C. pachystachya* extract exerted no beneficial effects towards the prevention of ppIAPP cytotoxicity, treatment with *C. pachystachya* enriched C-glycosyl flavonoid fraction (EFF-Cp) significantly improved viability of ppIAPP-expressing cells. Potential bioactivities of *C. pachystachya* extract and EFF-Cp towards the restoration of Ca²⁺ homeostasis disrupted by ppIAPP expression were also assessed. Neither prevented Crz1 hyperactivation, suggesting that the EFF-Cp-induced protection against ppIAPP toxicity was mediated by Ca²⁺-independent mechanisms.

Keywords: Amylin, Calcium signaling; *Cecropia pachystachya*; Diabetes; Islet Amyloid Polypeptide (IAPP)

Resumo

Apesar dos avanços na terapêutica, a diabetes tipo 2 é uma epidemia com números alarmantes a nível mundial. Novas estratégias de prevenção e tratamentos são imperativas. Um potencial alvo de investigação é a agregação do Polipéptido Amilóide dos Ilhéus (IAPP), um dos responsáveis pela disfunção das células- β pancreáticas. Para estudar o impacto do IAPP na sinalização do cálcio (Ca²⁺), desenvolvemos um modelo de levedura com um duplo sistema de reporte que, de forma independente, expressa preproIAPP (ppIAPP) e possui o gene *lacZ* sob o controlo da região promotora do Crz1. Neste sistema, o ppIAPP induziu uma ativação exacerbada do Crz1, um fator de transcrição ativado pela via Ca²⁺/calmodulina/calcineurina. Com base nos efeitos medicinais descritos para plantas *Urticaceae*, testámos o potencial protetor de *Cecropia pachystachya* contra a citotoxicidade induzida pelo IAPP no modelo de levedura desenvolvido. Embora o extrato de *C. pachystachya* não tenha atenuado a toxicidade do ppIAPP, o tratamento com a fração enriquecida de *C. pachystachya* (EFF-Cp) melhorou significativamente a viabilidade celular. A bioatividade do extrato e fração de *C. pachystachya* na regulação da homeostasia do Ca²⁺ foi também avaliada. Nenhum dos tratamentos impediu a ativação do Crz1, sugerindo que a proteção conferida pela EFF-Cp contra a toxicidade do ppIAPP é mediada por mecanismos independentes do Ca²⁺.

Palavras-chave: Amilina; *Cecropia pachystachya*; Diabetes; Polipéptido Amilóide dos Ilhéus (IAPP); Sinalização do cálcio

Received / Recebido: 02/12/2021

Accepted / Aceite: 31/12/2021

Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

Diabetes is the most prevalent metabolic disorder representing a major social and economic burden worldwide. Multiple factors contribute to the onset and progression of diabetes. The main pathological features of the disease include high blood glucose levels due to defective insulin sensitivity or insufficient insulin production/secretion by dysfunctional pancreatic β -cells (1). One undeniable contributor to β -cell damage in diabetes is the aggregation of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP), also called amylin, a hormone co-produced with insulin by β -cells in response to blood glucose levels (2). During its synthesis, immature IAPP forms are sequentially processed by hormone convertases to yield the mature and functional 37-amino acid IAPP molecule which acts synergistically with insulin to stabilize glucose homeostasis. In pre-diabetes/diabetes conditions, the boost in insulin production induced by hyperglycaemia is accompanied by an exacerbated production of IAPP. This leads to the overload of β -cell processing machinery and the intracellular accumulation of highly amyloidogenic immature IAPP species (3). Intracellular toxic oligomers of IAPP have been described to impair virtually all β -cell functions. They affect cell proliferation, increase Endoplasmic Reticulum (ER) stress, impair autophagy and mitochondrial function, dysregulate the Unfolded Protein Response (UPR), exacerbate local inflammation, among other effects (4–7). Together, these events culminate in β -cell injury and ultimately contribute to the disease development.

Amyloid peptides have been reported to induce β -cell death through apoptosis, which may be a consequence of disruption of calcium (Ca^{2+}) homeostasis (8-9). IAPP oligomers interfere with cellular membrane structure and dynamics, serving as the origin of ionic pores that allow the uncontrolled entry of Ca^{2+} ions into the intracellular environment, thus leading to the activation of an apoptosis cascade (10-11). Importantly, dysregulation of β -cell Ca^{2+} levels is associated with insulin resistance, a key feature of diabetes (12). Alterations in cytosolic free Ca^{2+} levels play a crucial role in the control of physiological insulin release from pancreatic β -cells. Upon glucose metabolism, ATP levels increase, inducing the inhibition of ATP-regulated potassium channels. Consequently, the plasma membrane depolarizes, producing an electrical change that opens voltage-gated Ca^{2+} channels. The influx of Ca^{2+} ions triggers the release of secretory granules containing insulin which are externalized by exocytosis. Altered steady-state Ca^{2+} levels have been

Introdução

A diabetes é a doença metabólica mais prevalente, apresentando um grande impacto social e económico em todo o mundo. Tendo uma origem multifatorial, vários fatores contribuem para o desenvolvimento e progressão desta doença. A principal característica patológica da diabetes é o elevado nível de glucose no sangue como resultado da resistência à insulina e/ou produção e secreção insuficiente de insulina por parte das células- β pancreáticas disfuncionais (1). Um dos principais contribuintes para o dano das células- β na diabetes é a agregação do Polipéptido Amilóide dos Ilhéus (IAPP), igualmente conhecido por amilina, uma hormona co-produzida com a insulina nas células- β em resposta aos níveis de glucose no sangue (2). Durante a sua síntese, as formas imaturas de IAPP são sequencialmente processadas por enzimas convertases até originarem uma molécula de IAPP madura e funcional, de 37 aminoácidos, que atua em sinergia com a insulina para a homeostasia da glucose. Em condições de pré-diabetes/diabetes, o aumento na produção de insulina induzido pela hiperglicemia é acompanhado por uma produção exacerbada de IAPP. Tal leva à sobrecarga da maquinaria de processamento das células- β e à consequente acumulação intracelular de espécies imaturas de IAPP altamente amiloidogénicas (3). Várias evidências descrevem que os oligómeros intracelulares de IAPP que se formam durante este processo são as entidades tóxicas, prejudicando a maioria das funções vitais das células- β . Entre outros fatores, afetam a proliferação celular, aumentam o stress do Retículo Endoplasmático (ER), prejudicam a autofagia e a função mitocondrial e exacerbam a inflamação local (4-7). Em conjunto, todos estes eventos culminam na lesão das células- β e, em última instância, contribuem para o desenvolvimento da doença.

Segundo algumas evidências, os oligómeros de IAPP interferem com a estrutura e dinâmica da membrana celular, originando poros iónicos que permitem a entrada descontrolada de iões de Ca^{2+} para o interior da célula, levando à ativação da cascata de apoptose (10-11). Por outro lado, a desregulação dos níveis de Ca^{2+} nas células- β tem vindo a ser associada a características importantes da diabetes, nomeadamente, a resistência à insulina (12). Alterações nos níveis citosólicos de Ca^{2+} desempenham um papel crucial no controlo da secreção fisiológica de insulina pelas células- β do pâncreas. Como resultado do metabolismo da glucose, os níveis de ATP intracelular aumentam, induzindo a inibição dos canais de potássio situados na membrana e regulados pelo ATP. Consequentemente, a membrana

observed in a wide range of cell types and tissues (e.g., platelets, cardiomyocytes, β -cells, muscle, kidney, liver, adipocytes, osteoblasts, among others) from Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) patients and animal models, indicating that this serves as a fundamental factor in diabetic state (12-13).

In the last decades, several studies have reported the potential of phytochemicals from natural sources to prevent or control metabolic alterations associated with chronic diseases. Some plants of the genus *Cecropia* (*Urticaceae*), native to Central and South America and known as “embaúba” in popular culture (14), are an example of this case. In particular, *Cecropia pachystachya* leaves have been widely used as hypoglycaemic, diuretic, anti-inflammatory, and antioxidant (14–19). In addition to their properties against metabolic dysfunctions, *in vivo* studies using enriched C-glycosyl flavonoid fractions and/or aqueous extracts from *C. pachystachya* leaves have shown effects within the central nervous system (20-22), whereas *in vitro*, *C. pachystachya* extracts were shown to be cytotoxic for several types of cancer cells (15-19). The pharmacological properties of *C. pachystachya* have been correlated to their content of phenolic compounds, majorly chlorogenic acid, isoorientin, orientin, isovitexin, and isoquercitrin (21-22).

In this study, we further addressed the protective action of *C. pachystachya* extracts and fractions using *Saccharomyces cerevisiae* models of IAPP-induced toxicity (23) as a potential approach to target pathological processes of diabetes.

Materials and Methods

Plant material

Aerial parts of *C. pachystachya* Trécul leaves were collected in Torres, RS, Brazil. A voucher specimen (ICN 150025) was deposited in the Herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. The access to the Brazilian biodiversity was registered in the National System for Genetic Heritage Management and Associated Traditional Knowledge (SISGEN) under protocol AC5A37.

plasmática sofre uma despolarização, alterando o potencial elétrico que induz a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. O influxo de íons Ca^{2+} desencadeia a liberação de grânulos secretores, que transportam insulina, por exocitose. Alterações descontroladas nos níveis de Ca^{2+} têm sido observadas numa vasta gama de células e tecidos (por exemplo, plaquetas, cardiomiócitos, células- β , músculo, rim, fígado, adipócitos, osteoblastos, entre outros) tanto em doentes com diabetes tipo 2, como em modelos animais (12-13).

Nas últimas décadas, diversos estudos descreveram o potencial dos fitoquímicos de origem natural na prevenção e controlo de alterações metabólicas associadas às doenças crónicas. Algumas plantas do género *Cecropia* (*Urticaceae*), nativas da América Central e do Sul e conhecidas como “embaúba” na gíria popular (14), são um exemplo desse caso. Em particular, as folhas de *Cecropia pachystachya* têm sido amplamente reportadas como tendo propriedades hipoglicémicas, diuréticas, anti-inflamatórias e antioxidantes (14–19). Além das suas propriedades contra distúrbios metabólicos, estudos *in vivo* descreveram o efeito de frações enriquecidas de C-glicosil flavonóides e/ou extratos aquosos de folhas de *C. pachystachya* também ao nível do sistema nervoso central (20-22). Por outro lado, estudos *in vitro* demonstraram que extratos de *C. pachystachya* são tóxicos para vários tipos de células cancerígenas (15-19). As propriedades farmacológicas de *C. pachystachya* foram correlacionadas com o seu conteúdo rico em compostos fenólicos, principalmente ácido clorogénico, isoorientina, orientina, isovitexina e isoquercitrina (21-22).

Neste estudo, investigámos a potencial ação protetora de extratos e frações de *C. pachystachya* em modelos de *Saccharomyces cerevisiae* que recapitulam a toxicidade induzida pelo IAPP (23).

Material e Métodos

Material vegetal

Partes aéreas de folhas de *C. pachystachya* Trécul foram recolhidas em Torres, RS, Brasil. A espécie ICN 150025 foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil. O acesso à biodiversidade brasileira está registado no Sistema Nacional de Gestão para o Património Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SISGEN) sob o protocolo AC5A37.

Aqueous extract preparation

The leaves of *C. pachystachya* were air-dried (35–40°C) for three days and then extracted by infusion (1:10, plant/distilled water) for 30 min, filtered, freeze-dried, and stored at –20°C until use (22).

Enriched fractions preparation

The enriched C-glycosyl flavonoid fraction (EFF-Cp) was obtained as previously described by Ortmann et al. (2016) (21). The dried plant material was submitted to extraction with ethanol 20% (5% plant:solvent ratio, w/v; 9500 rpm; 5 min) and the extract was partitioned with n-butanol, yielding the n-butanolic fraction. The butanolic fraction was dried under reduced pressure and stirred with Amberlite® XAD-16 resin (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA). The resin was then stirred again in the presence of methanol for 30 min, yielding the EFF-Cp.

Chemical characterization of extracts and fractions

The extract was chemically analyzed by HPLC/DAD as previously described by Costa et al. (2011) (24) and Ortmann et al (2016) (21), using a Perkin Elmer Series 200 HPLC with a Photo Diode Array Detector (PDA) (PerkinElmer, Shelton, CT, USA).

Yeast strains and plasmids

S. cerevisiae strains used in this study are listed in Table 1. The strain YAA5, which encodes the CDRE-*lacZ* reporter gene, was used for cell viability and β -galactosidase activity assays. The parental strain BY4742 and the strains YAA6 and YAA7 were used as negative controls for the β -galactosidase activity assays. The plasmids used are listed in Table 2. Yeast transformation procedures were carried out as indicated using the lithium acetate standard method (25).

Growth conditions

Synthetic dropout (SD)-2% glucose medium was used for the growth of cells transformed with the plasmids of interest. A pre-inoculum was prepared in SD-raffinose medium, and cultures were incubated overnight at 30°C under orbital shaking. Cultures were diluted in fresh medium and incubated under the same conditions until the optical density at 600 nm (OD_{600}) reached log growth phase. The following equation was used to synchronize the cultures: $OD_i \times V_i = OD_f / [2(t/gt)] \times V_f$, where OD_i is the initial optical density of the culture, V_i is the initial volume of culture, OD_f is the final optical density

Preparação do extrato aquoso

As folhas de *C. pachystachya* foram secas ao ar (35–40°C) durante três dias e depois extraídas por infusão (1:10, planta/água destilada) durante 30 min. Seguidamente, foram filtradas, liofilizadas e armazenadas a -20°C até posterior uso (22).

Preparação das frações enriquecidas

A fração enriquecida de C-glicosil flavonóide (EFF-Cp) foi obtida conforme descrito anteriormente por Ortmann et al. (2016) (21). O material vegetal seco foi submetido ao procedimento de extração com etanol 20% e o extrato foi fracionado com n-butanol, originando a fração n-butanólica. A fração butanólica foi seca sob pressão reduzida e agitada com a resina Amberlite® XAD-16 (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). Em seguida, a resina foi agitada novamente na presença de metanol por 30 min produzindo a EFF-Cp.

Caracterização química do extrato e frações

O extrato foi analisado quimicamente por HPLC/DAD conforme descrito anteriormente por Costa et al. (2011) (24) e Ortmann et al (2016) (21) usando um sistema de HPLC Perkin Elmer Série 200 com um Detetor “Photo Diode Array (PDA) (PerkinElmer, Shelton, CT, EUA).

Estirpes de levedura e plasmídeos

As estirpes de *S. cerevisiae* usadas neste estudo estão listadas na Tabela 1. A estirpe YAA5, que codifica o gene de fusão CDRE-*lacZ*, foi usada para ensaios de viabilidade celular e avaliação da atividade da β -galactosidase. A estirpe parental BY4742 e as estirpes YAA6 e YAA7 foram usadas como controles negativos apenas para os ensaios de atividade da β -galactosidase. Os plasmídeos usados estão listados na Tabela 2. O protocolo de transformação das leveduras foi realizado segundo o método de acetato de lítio (25).

Condições de crescimento

Meio sintético com 2% de glucose foi usado para o crescimento de células transformadas com os plasmídeos de interesse. Um pré-inóculo foi preparado em meio sintético com rafinose e as culturas foram incubadas durante a noite a 30°C sob agitação orbital. As culturas foram diluídas em meio fresco e incubadas nas mesmas condições até que a densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) atingisse a fase de crescimento logarítmico. A seguinte equação foi usada para sincronizar as culturas: $OD_i \times V_i = OD_f / [2(t/gt)] \times V_f$, onde OD_i é a densidade

of the culture, t is the time, gt is the generation time of the strain, and V_f is the final volume of culture. Cell cultures were diluted as indicated for each assay. In all experiments, induction of IAPP expression was carried out in SD-galactose medium. Media composition is detailed in Raimundo *et al.* (2020) (23).

Flow cytometry

Cell cultures were diluted to $OD_{600} 0.1 \pm 0.01$ in SD-galactose and incubated with 0, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of EFF-Cp or *C. pachystachya* aqueous extract, at 30°C for 20 h under orbital agitation. Cells were incubated with propidium iodide (PI) (Merck, Darmstadt, DE) at a final concentration of 2.5 $\mu\text{g/ml}$ for 30 min at 30°C under orbital agitation and protected from light. Flow cytometry was performed using a BD FACS Calibur Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data acquisition and analysis were performed using CellQuest® (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and FlowJo® software (Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA), respectively. A minimum of 50000 events were collected for each experiment. Cell doublets exclusion was performed based on Forward-A and -W scatter parameters.

β -galactosidase activity

The β -galactosidase assays to infer Ca^{2+} homeostasis were carried out as described by Garcia *et al.* (2016) (26). Briefly, cultures at $OD_{600}=0.5\pm0.05$ were diluted in SD-galactose medium to $OD_{600}=0.1\pm0.01$, transferred to a 96-well microplate and incubated with 0 and 50 $\mu\text{g/mL}$ of EFF-Cp or *C. pachystachya* aqueous extract for 20 h at 30°C under orbital agitation. After this period, OD_{600} of cultures were measured by the transfer of 10 μL of cell suspensions to a new 96-well plate followed by addition of 20 μL Y-PER cell lysis reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.–Life Technologies, USA). The plate was incubated for 20 min at 37°C without agitation. 240 μL of *lacZ* buffer [8.5 g/L Na_2HPO_4 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE), 5.5 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, DE), 0.75 g/L KCl (Panreac, Bracelona, ES), 0.246 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, DE) containing 4 mg/L *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA)] was added to each well, and the plate was incubated at 30°C for 2 h. The results were expressed as Miller units (26), applying the following equation, where V =volume of culture assayed in mL and t =reaction time in minutes:

ótica inicial da cultura, V_i é o volume inicial da cultura, OD_f é a densidade ótica final da cultura, t é o tempo, gt é o tempo de geração da estirpe e V_f é o volume final da cultura. As culturas de células foram diluídas conforme indicado para cada ensaio. Em todas as experiências, a indução da expressão do IAPP foi realizada em meio sintético com galactose. A composição de todos os meios encontra-se detalhada em Raimundo *et al.* (2020) (23).

Citometria de fluxo

As culturas de células foram diluídas para uma OD_{600} de $0,1\pm0,01$ em meio sintético com galactose e incubadas com 0, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de EFF-Cp ou extrato aquoso de *C. pachystachya*, a 30°C durante 20 h sob agitação orbital. As células foram incubadas com iodeto de propídio (PI) (Merck, Darmstadt, DE) numa concentração final de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 min, a 30°C sob agitação orbital e protegidas da luz. A citometria de fluxo foi realizada usando um citômetro de fluxo BD FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A aquisição e análise de dados foram realizadas com os programas CellQuest® ((BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e FlowJo® (Tree Star Inc., San Carlos, CA, EUA), respetivamente. Um mínimo de 50000 eventos foi analisado por cada experiência. A exclusão de dupletos celulares foi realizada com base na dispersão dos parâmetros “Forward”-A e -W.

Atividade da β -galactosidase

Os ensaios da β -galactosidase para inferir a homeostasia do Ca^{2+} foram realizados conforme descrito por Garcia *et al.* (2106) (26). Resumidamente, as culturas com uma $OD_{600} = 0,5 \pm 0,05$ foram diluídas em meio sintético com galactose para uma $OD_{600} = 0,1 \pm 0,01$. De seguida, foram transferidas para uma microplaca de 96 poços e incubadas com 0 ou 50 $\mu\text{g/mL}$ de EFF-Cp ou extrato aquoso de *C. pachystachya*, durante 20 h a 30°C sob agitação orbital. Após este período, a OD_{600} das culturas foi medida, 10 μL de cada suspensão de células foram transferidos para uma nova placa de 96 poços seguido pela adição de 20 μL de reagente de lise celular Y-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.–Life Technologies, EUA). A placa foi incubada durante 20 min a 37°C sem agitação. 240 μL de tampão *lacZ* [8,5 g/L Na_2HPO_4 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE), 5,5 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, DE), 0,75 g/L KCl (Panreac, Bracelona, ES), 0,246 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, DE) contendo 4 mg/L *o*-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo (ONPG) (Sigma-Aldrich®)] foram adicionados a cada poço, e a placa foi incubada a 30°C por 2 h. Os resultados foram

$$\text{Miller units} = 1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}) / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

Statistical Analysis

Statistical analysis was expressed using Graphpad Prism 8 software. Data are mean \pm SD of at least three independent biological replicates. One-way ANOVA with Dunnet's multiple comparison test was performed to assess differences between the conditions. The *t*-test was used to access differences between the untreated p426 and ppIAPP-GFP conditions in the flow cytometry analysis. Two-way ANOVA with the Tukey's or Sidak's multiple comparison test was performed to access differences between the β -galactosidase assay conditions.

Results and Discussion

Development of a yeast model to address the effects of ppIAPP on Ca²⁺ signaling

Insulin secretion, β -cell survival, proliferation, and function are tightly controlled by Ca²⁺ dynamics. To determine the deleterious effect of IAPP on Ca²⁺ signaling, we took advantage of a previously described strategy we designed to recapitulate the molecular pathways of IAPP aggregation in the model organism *Saccharomyces cerevisiae* (23).

For this, we used the reporter strain YAA5 encoding the *lacZ* gene under the control of Crz1-recognition elements (Table 1), which is sensitive to Ca²⁺ intracellular levels, as the yeast transcription factor Crz1 is regulated by the calmodulin CaM/calcineurin (CaN) pathway (27). In a similar mechanism to the human orthologue NFAT, Crz1 activation is regulated by Ca²⁺ cytosolic concentrations. Slight oscillations in Ca²⁺ levels trigger CaM/CaN activation leading to Crz1 dephosphorylation, nuclear translocation, and stimulation of calcineurin-dependent response element (CDRE)-driven gene expression. Thus, the degree of Crz1 activation can be monitored through the measurement of β -galactosidase activity. The strains YAA6 and YAA7, devoid of *CRZ1* and *CNBI* (encoding the regulatory subunit of CaN complex), respectively, are used as control strains (Table 1).

expressos como unidades de Miller (26), aplicando-se a seguinte equação, onde V = volume da cultura testada em mL e t = tempo de reação em minutos:

$$\text{Unidades de Miller} = \frac{1000 \times (\text{OD}_{420} - 1,75 \times \text{OD}_{550})}{(t \times V \times \text{OD}_{600})}$$

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa Graphpad Prism 8. Os dados representam a média \pm desvio padrão de pelo menos três réplicas biológicas independentes. A análise ANOVA unilateral com o teste de comparação múltipla de Dunnet foi realizada para avaliar as diferenças entre as condições. O teste *t* foi usado para aferir as diferenças entre as condições p426 e ppIAPP-GFP não tratadas na análise de citometria de fluxo. A análise ANOVA bilateral com o teste de comparação múltipla de Tukey ou Sidak foi realizada para avaliar as diferenças entre as condições nos ensaios da β -galactosidase.

Resultados e Discussão

Desenvolvimento de um modelo de levedura para avaliar os efeitos do ppIAPP na sinalização do Ca²⁺

A secreção de insulina, sobrevivência, proliferação e função das células- β são controladas pela dinâmica do Ca²⁺. Para determinar o efeito do IAPP na sinalização do Ca²⁺, recorreremos a uma estratégia previamente descrita para recapitular as vias moleculares de agregação do IAPP no organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* (23).

Para tal, utilizámos a estirpe YAA5 que codifica o gene *lacZ* sob o controle de elementos de reconhecimento do Crz1 (Tabela 1), o fator de transcrição de levedura que é regulado pela via calmodulina (CaM)/calcineurina (CaN) (27) e que, portanto, é sensível aos níveis intracelulares de Ca²⁺. Através de um mecanismo semelhante ao seu ortólogo humano NFAT, a ativação do Crz1 é regulada pelas concentrações citosólicas de Ca²⁺. Ligeiras oscilações nos níveis deste ião desencadeiam a ativação da CaM/CaN levando à desfosforilação do Crz1, translocação nuclear e estimulação da expressão de genes que se encontrem a jusante da região promotora do Crz1. Com base nesta via, o grau de ativação do Crz1 pode assim ser monitorizado através da atividade da β -galactosidase. As estirpes YAA6 e YAA7, cujos genes *CRZ1* e *CNBI* (que codificam a subunidade reguladora do complexo CaN) foram deletados, respetivamente, foram usadas como estirpes de controlo (Tabela 1).

Table 1 - *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study**Tabela 1** - Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* usadas neste estudo.

Strain / Estirpe	Genotyping Information / Informação Genotípica	Reference / Referência
BY4742	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3</i>	EUROSCARF*
YAA5	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 aur1::AUR1-C-4xCDRE-lacZ</i>	(Araki et al., 2009)
YAA6	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 YNL027W::HIS3MX4 aur1:: AUR1-C-4xCDRE-lacZ</i>	(Araki et al., 2009)
YAA7	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 YKL190W::kanMX4 aur1::AUR1-C-4xCDRE-lacZ</i>	(Araki et al., 2009)
YAA5_ppIAPP-GFP	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 aur1::AUR1-C-4xCDRE-lacZ < p426-ppIAPP_GFP ></i>	This study / Este estudo
YAA6_ppIAPP-GFP	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 YNL027W::HIS3MX4 aur1:: AUR1-C-4xCDRE-lacZ < p426-ppIAPP_GFP ></i>	This study / Este estudo
YAA7_ppIAPP-GFP	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 YKL190W::kanMX4 aur1::AUR1-C-4xCDRE-lacZ < p426-ppIAPP_GFP ></i>	This study / Este estudo

*EUROpean Archive for Functional analysis

Table 2 - Plasmids used in this study**Tabela 2** - Plasmídeos usados neste estudo.

Plasmid / Plasmídeo	Description / Descrição	Reference / Referência
p426*	<i>GAL1_{promoter}, 2μ, URA</i>	ATCC 87341 ^{TM**}
p426-ppIAPP_GFP	<i>GAL1_{promoter}, ppIAPP_GFP, 2μ, URA</i>	Raimundo et al, 2020

*Empty plasmid used as control / Plasmídeo vazio usado como controlo

**American Type Culture Collection

The novel yeast models YAA5_ppIAPP-GFP, YAA6_ppIAPP-GFP and YAA7_ppIAPP-GFP consisted of YAA5, YAA6 and YAA7 strains, respectively, engineered to encode the most immature and toxic form of human IAPP (preproIAPP, ppIAPP) fused to the green fluorescent protein (GFP) and under the transcriptional control of a *GAL1*-inducible promoter (Figure 1A). As previously described by Raimundo et al. (2020) (23), the expression of such construct induces stronger toxic effects on yeast growth and cell viability than fusions of partially and fully processed forms of IAPP. For this reason, proIAPP-GFP and mature IAPP-GFP constructs were not included in the present study.

The expression of ppIAPP-GFP induced a strong activation of the CaM/CaN pathway in the YAA5 strain as indicated by the increase of Crz1-dependent β-galactosidase activity (Figure 1B). This is consistent with the reported effects of amyloid peptide on the

Os novos modelos de levedura YAA5_ppIAPP-GFP, YAA6_ppIAPP-GFP e YAA7_ppIAPP-GFP representam as estirpes YAA5, YAA6 e YAA7, respetivamente, geneticamente modificadas para codificar a forma mais imatura e tóxica do IAPP (pré-pro-IAPP, ppIAPP) fundida com a proteína verde fluorescente (GFP) sob o controlo transcricional do promotor indutível *GAL1* (Figura 1A). Conforme descrito anteriormente por Raimundo et al. (2020) (23), no modelo de levedura desenvolvido, a expressão desta construção induz uma maior toxicidade ao nível do crescimento e viabilidade celular comparativamente às fusões que possuem as formas parcial ou totalmente processadas de IAPP. Por esse motivo, no presente estudo, decidimos não incluir fusões de proIAPP-GFP e IAPP-GFP.

A expressão do ppIAPP-GFP induziu uma forte ativação da via CaM/CaN na estirpe YAA5, conforme indicado

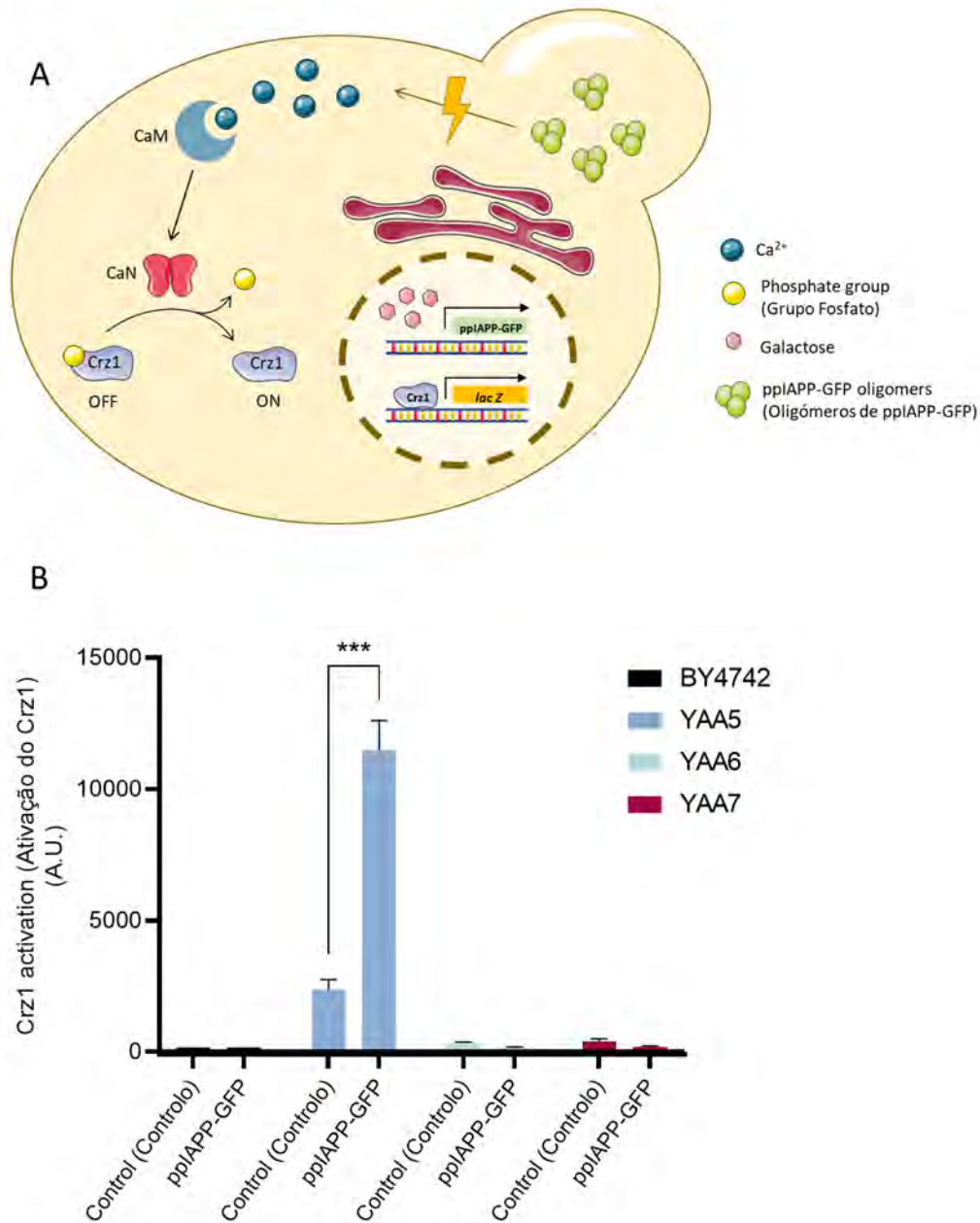


Figure 1 - Novel yeast model to address the effects of ppIAPP on Ca²⁺ signaling. (A) Schematic representation of the model. (B) Expression of ppIAPP-GFP fusion in YAA5 yeast model induces Crz1 hyperactivation. Cells expressing ppIAPP-GFP and the respective control were induced for 20 h with galactose. Crz1 activation was assessed by monitoring β -galactosidase activity. The values represent mean \pm SD from at least three independent experiments. The YAA5 strain encodes the construct *aur1::AUR1-C-4xCDRE-lacZ*. YAA6, YAA7 are isogenic to YAA5 devoid of *CRZ1* and *CNB1* genes, respectively. Statistical differences are denoted as *** $p < 0.001$.

Figura 1 - Novo modelo de levedura para avaliar os efeitos do ppIAPP na sinalização de Ca²⁺. (A) Representação esquemática do modelo. (B) A expressão da fusão ppIAPP-GFP no modelo de levedura YAA5 induz a hiperativação do Crz1. Células que expressam ppIAPP-GFP e o respetivo controlo foram induzidos durante 20 h com galactose. A ativação do Crz1 foi avaliada monitorizando a atividade da β -galactosidase. Os valores representam a média \pm desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. A estirpe YAA5 codifica a construção *aur1::AUR1-C-4xCDRE-lacZ*. As estirpes YAA6 e YAA7 são isogénicas à YAA5, com a deleção dos genes *CRZ1* e *CNB1*, respectivamente. As diferenças estatísticas são identificadas como *** $p < 0,001$.

disruption of Ca^{2+} homeostasis and dysregulated increase in cytosolic Ca^{2+} levels. By comparison, only a residual activity was observed in YAA6 and YAA7 cells. Likewise, in the parental strain BY4742 devoid of the CDRE-*lacZ* reporter construct, β -galactosidase activity was nearly undetectable (Figure 1B). These findings postulate our yeast model as a powerful platform for the bioprospection of compounds with potential to inhibit ppIAPP-induced Crz1 hyperactivation.

Chemical characterization of Cecropia pachystachya extract and fraction

The chromatographic profiles of *C. pachystachya* extract and fraction were similar to those described by Gazal et al. (2014) (22) as confirmed by quality control analysis indicating the presence of similar concentrations of major compounds present in the extract and fraction, namely chlorogenic acid, isoorientin, orientin, isovitexin and isoquercitrin (data not shown).

Cecropia pachystachya EFF-Cp fraction protects YAA5 yeast cells against ppIAPP-induced toxicity

The protective potential of phytochemicals from natural sources has been widely explored as alternative approaches against the metabolic alterations observed in many chronic diseases. More specifically, *C. pachystachya* bioactivity has been associated with the promotion of metabolic health by mechanisms including the regulation of glycaemic control, inflammation, and oxidative stress (14–17, 19).

S. cerevisiae is considered a robust primary drug-screening tool to filter for compounds with cytoprotective activity for further validation in more complex models (28–30). Among other features, this is possible because *S. cerevisiae* shares highly conserved molecular and cellular mechanisms with human counterparts.

The reporter strain YAA5_ppIAPP-GFP was used to investigate further the potential protective action of *C. pachystachya* towards IAPP-induced cytotoxicity. ppIAPP-GFP expression was confirmed by flow cytometry, showing that nearly 30% of the total cell population displayed GFP signals in the control condition (Figure 2A, 2B). Interestingly, incubation with EFF-Cp induced a dose-dependent reduction in the percentage of GFP positive cell population in ppIAPP-

pelo aumento da atividade da β -galactosidase (Figura 1B). Tal resultado é consistente com os estudos que reportam os efeitos dos péptidos amilóides na disrupção da homeostasia do Ca^{2+} e aumento desregulado nos níveis de Ca^{2+} citosólico. Por comparação, em células YAA6 e YAA7 apenas uma atividade residual do Crz1 foi observada. Da mesma forma, na estirpe parental BY4742 desprovida da construção CDRE-*lacZ*, a atividade da β -galactosidase foi quase indetetável (Figura 1B). Estes dados confirmam o nosso modelo de levedura como uma plataforma robusta para a bioprospecção de compostos com potencial para inibir a ativação exacerbada do Crz1 induzida pelo ppIAPP.

Caracterização química do extrato e fração de Cecropia pachystachya

Os perfis cromatográficos do extrato e fração de *C. pachystachya* foram semelhantes aos descritos por Gazal et al. (2014) (22), indicando a presença de concentrações semelhantes dos compostos principais, nomeadamente, ácido clorogénico, isoorientina, orientina, isovitexina e isoquercitrina (dados não mostrados).

A fração de Cecropia pachystachya (EFF-Cp) protege as células YAA5 contra a toxicidade induzida pelo ppIAPP

O potencial protetor dos fitoquímicos provenientes de fontes naturais tem sido amplamente explorado como uma abordagem alternativa no combate a alterações metabólicas observadas em diversas doenças crónicas. Mais especificamente, a bioatividade de *C. pachystachya* foi associada à promoção da saúde metabólica por mecanismos que incluem a regulação do controlo glicémico, inflamação e stress oxidativo (14-17, 19).

A levedura *S. cerevisiae* tem sido considerada uma plataforma robusta para o rastreio inicial de compostos com atividade citoprotetora que, posteriormente, são validados em modelos mais complexos (28-30). Entre outras características, tal é possível porque a *S. cerevisiae* compartilha mecanismos moleculares e celulares altamente conservados com os seus homólogos humanos.

Neste estudo, a estirpe YAA5_ppIAPP-GFP foi usada para investigar a potencial ação protetora de *C. pachystachya* em relação à citotoxicidade induzida pelo IAPP. Primeiramente, a expressão de ppIAPP-GFP foi confirmada por citometria de fluxo, mostrando que quase 30% da população total de células possui sinal de GFP na condição controlo (Figura 2A, 2B).

Figure 2 - Treatment with *Cecropia pachystachya* EFF-Cp fraction reduces the expression of ppIAPP-GFP. YAA5 cells expressing ppIAPP-GFP and the respective control were induced for 20 h with galactose and co-treated with *C. pachystachya* extract or the EFF-Cp fraction at a concentration of 0, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. GFP cells were assessed by flow cytometry. (A) Representative clouds of GFP positive cell population are shown for each condition. (B) Frequency of GFP positive cells in treated P426 and ppIAPP-GFP expressing yeast. The values represent mean \pm SD from at least three independent experiments. Statistical differences are denoted as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

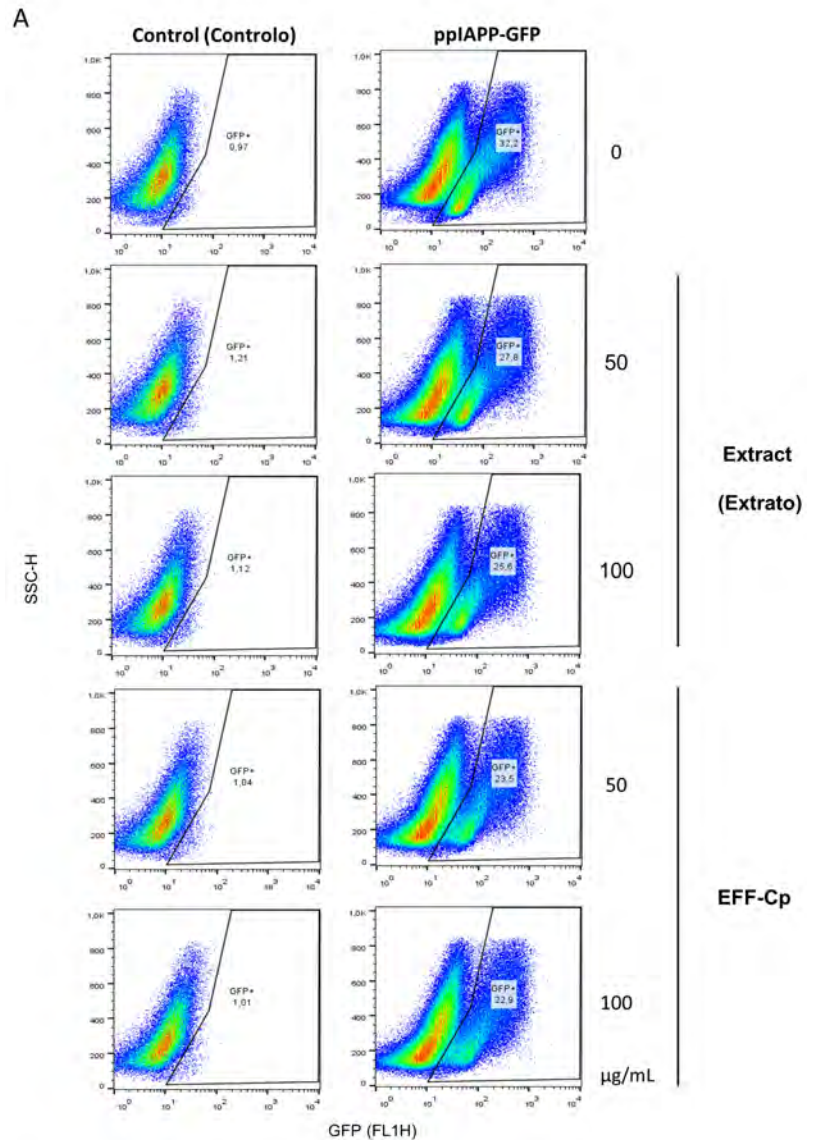
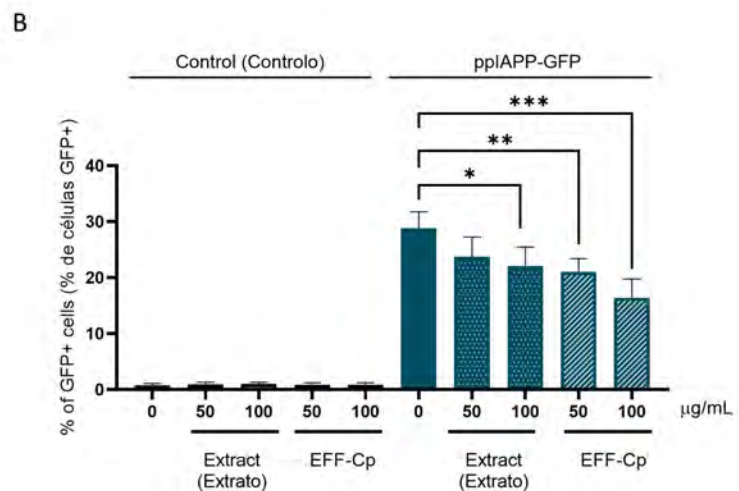


Figura 2 - O tratamento com a fração de *Cecropia pachystachya* (EFF-Cp) reduz a expressão de ppIAPP-GFP. Células YAA5_ppIAPP-GFP e o respetivo controlo foram induzidos durante 20 h com galactose e co-tratadas com o extrato de *C. pachystachya* ou a fração nas concentrações de 0, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As células positivas para GFP foram avaliadas por citometria de fluxo.

(A) Nuvens representativas da população de células positivas para GFP em cada condição.

(B) Frequência de células positivas para GFP em leveduras tratadas que expressam as construções P426 e ppIAPP-GFP. Os valores representam a média \pm desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatísticas são identificadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.



GFP expressing yeast. However, further studies are needed to fully address the impact of EFF-Cp treatment on the expression ppIAPP-GFP fusion peptide.

Next, membrane integrity was determined using PI staining as a measure of cell viability. The ppIAPP-GFP construct induced toxicity after 20 h incubation in the presence of galactose (Figure 3A). *C. pachystachya* extract and EFF-Cp did not affect cell viability in control

Curiosamente, a incubação com a EFF-Cp induziu uma redução dependente da dose na percentagem da população de células positivas para GFP nas leveduras que expressam o ppIAPP-GFP. No entanto, mais estudos serão necessários para desvendar o real impacto do tratamento com a EFF-Cp na expressão do péptido de fusão ppIAPP-GFP.

De seguida, a integridade da membrana foi determinada usando a marcação de PI como medida para inferir a viabilidade celular. A construção ppIAPP-GFP induziu toxicidade após 20 h de incubação na presença de galactose (Figura 3A). Relativamente ao tratamento,

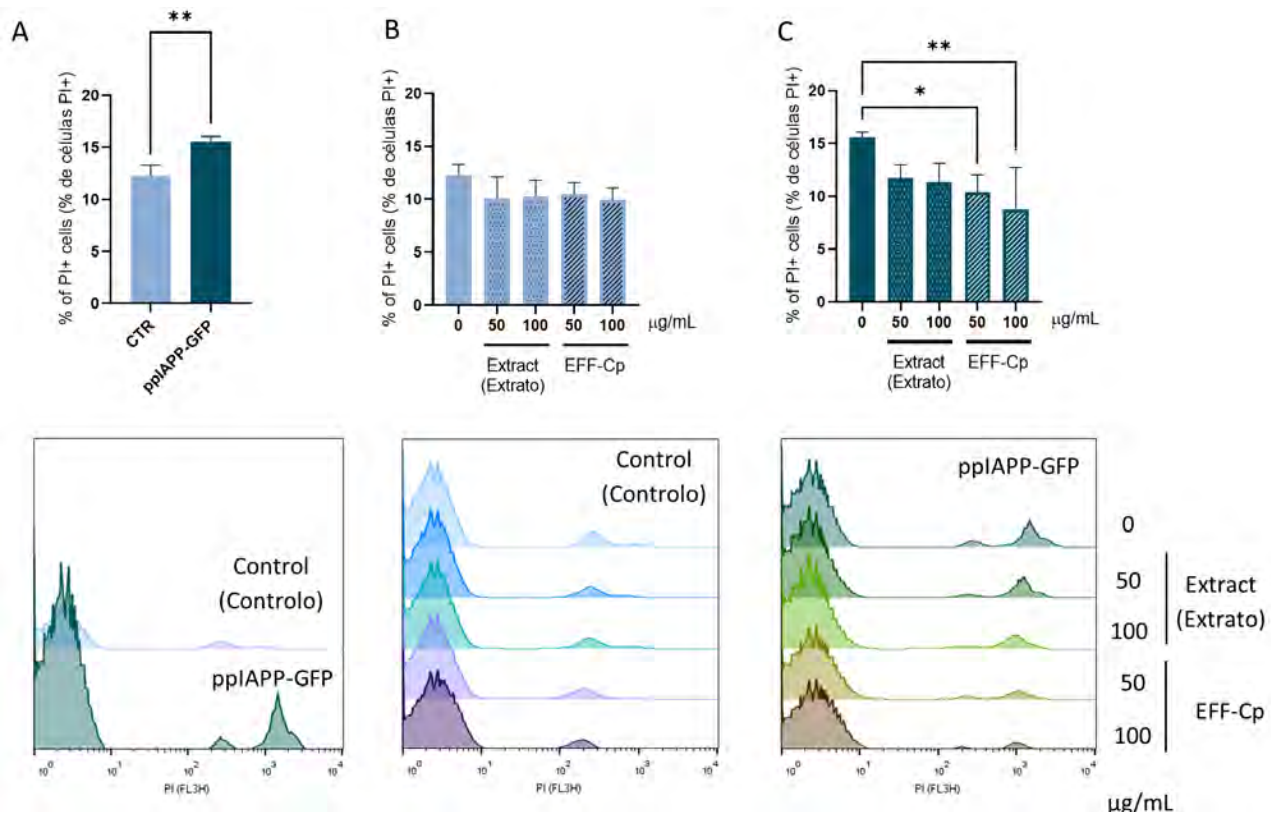


Figure 3 - EFF-Cp treatment ameliorates cytotoxicity induced by ppIAPP-GFP expression in YAA5 yeast cells. YAA5 cells expressing ppIAPP-GFP fusion and the respective control were induced for 20h with galactose and co-treated with EFF-Cp or *C. pachystachya* extract at a concentration of 0, 50 and 100 µg/mL. (A) The frequency of propidium iodide (PI) positive cells assessed by flow cytometry in untreated yeast. (B) Frequency of PI positive cells in treated p426 and (C) ppIAPP-GFP expressing yeast. Representative PI negative and positive cells histograms are shown for each condition. The values represent mean ± SD from at least three independent experiments. Statistical differences are denoted as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Figura 3 - O tratamento com a fração (EFF-Cp) melhora a citotoxicidade induzida pela expressão de ppIAPP-GFP nas células YAA5. Células YAA5 que expressam o ppIAPP-GFP e o respetivo controlo foram induzidos durante 20h com galactose e co-tratadas com EFF-Cp ou extrato de *C. pachystachya* a uma concentração de 0, 50 e 100 µg / mL. (A) Frequência de células positivas para iodeto de propídio (PI) avaliada por citometria de fluxo em leveduras não tratadas. (B) Frequência de células positivas para PI em leveduras tratadas que expressam a construção p426 e (C) ppIAPP-GFP. Os histogramas representativos de células positivas e negativas para PI são mostrados para cada condição. Os valores representam a média ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatísticas são identificadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

cells (Figure 3B). Remarkably, EFF-Cp treatment significantly reduced the toxic effects mediated by ppIAPP-GFP with concentrations of 50 and 100 µg/mL, which can be deduced from the decrease of PI positive cells to values similar to the control condition (Figure 3C).

The protective action exerted by EFF-Cp may be attributed, at least in part, to chlorogenic acid and isoorientin, the major compounds identified in EFF-Cp. Both compounds have been previously associated with protective actions against diabetes. Concerning IAPP pathology, chlorogenic acid was shown to exert an inhibitory effect on human IAPP (hIAPP) oligomerization/fibril formation and to improve cell viability in pancreatic INS-1 cells exposed to hIAPP aggregates. By delaying the onset of secondary structure conversion of hIAPP from random coil to β -structure, it redirects the amyloidogenic molecules into off-pathway intermediates that are less toxic to the cells (31). Chlorogenic acid was also shown to decrease fasting blood glucose, lipid peroxidation (LPO) products, and glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}), and to increase plasma insulin, total hemoglobin, C-peptide, and glycogen in streptozotocin/nicotinamide (STZ/NA)-induced type 2 diabetic rats (32-33). It is currently argued that the hypoglycemic mechanisms of chlorogenic acid may be related to the inhibition of the glucose-6-phosphate-shifting enzyme, regulating the blood glucose balance *in vivo*. In addition, studies have shown that chlorogenic acid can activate AMP-activated protein kinase (AMPK), upregulate the gene expression of glucose transporter 4 (GLUT4) to stimulate the absorption of glucose in skeletal muscle, downregulate expression of glucose-6-phosphate-shifting enzyme, inhibit gluconeogenesis, and reduce fatty acids synthesis (34). In the liver, chlorogenic acid activity was also associated with reduced oxidative and ER stress, increased autophagy and improved mitochondrial activity (35). In a similar way, the major flavonoid compounds in EFF-Cp, orientin and its isomer isoorientin, have also been reported as potent regulators of oxidative stress. In addition, isoorientin may act to improve insulin sensitivity and limit lipid accumulation in diabetic animals and cultured adipocytes (36). Therefore, it is plausible to consider that protection conferred by EFF-Cp in our model system may be attributed to the concerted action of two main molecular events: (a) modulation of toxic IAPP aggregation and (b) mitigation of IAPP-induced redox imbalance.

o extrato de *C. pachystachya* e EFF-Cp não afetaram a viabilidade celular nas leveduras controle (Figura 3B). Porém, o tratamento com EFF-Cp reduziu significativamente os efeitos tóxicos mediados pelo ppIAPP-GFP nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, o que foi deduzido pela diminuição da porcentagem de células positivas para PI para valores semelhantes à condição controle (Figura 3C).

A ação protetora exercida pela EFF-Cp pode estar associada, pelo menos em parte, ao ácido clorogénico e à isoorientina, dois dos principais compostos identificados nesta fração e que já foram anteriormente associados a ações protetoras contra a diabetes. Relativamente à patologia do IAPP, o ácido clorogénico demonstrou inibir a oligomerização/formação de fibrilas de IAPP humano (hIAPP) e melhorar a viabilidade celular em células pancreáticas expostas a agregados de hIAPP. Ao atrasar a conversão da estrutura secundária do hIAPP para a estrutura β , o ácido clorogénico redireciona as moléculas amiloidogénicas para intermediários que são menos tóxicos para as células (31). Além disso, num modelo de ratos com diabetes tipo 2, este composto também demonstrou diminuir a glucose no sangue em situações de jejum, reduzir os níveis de produtos de peroxidação lipídica (LPO) e hemoglobina glicada (HbA_{1c}), bem como aumentar os níveis de insulina plasmática, hemoglobina total, péptido-C e glicogénio (32-33). Atualmente, argumenta-se que os efeitos hipoglicémicos do ácido clorogénico podem estar relacionados com a inibição da glucose-6-fosfato desidrogenase, regulando o equilíbrio da glucose no sangue *in vivo*. Além disso, estudos têm demonstrado que o ácido clorogénico pode ainda ativar a proteína quinase ativada pelo AMP (AMPK), estimular a absorção de glucose no músculo esquelético, inibir a gluconeogénese e reduzir a síntese de ácidos gordos (34). No fígado, a atividade do ácido clorogénico também tem sido associada à redução do stress oxidativo, stress do reticulo endoplasmático, aumento da autofagia e melhoria da atividade mitocondrial (35). De modo semelhante, os principais compostos flavonóides da EFF-Cp, nomeadamente a orientina e seu isómero isoorientina, também foram descritos como potentes reguladores do stress oxidativo. Além disso, a isoorientina atua melhorando a sensibilidade à insulina e limitando a acumulação de lipídios tanto em animais diabéticos como em adipócitos presentes em cultura (36). Posto isto, é plausível considerar que a proteção conferida pela EFF-Cp no modelo de levedura aqui apresentado pode ser atribuída à ação combinada de dois grandes eventos moleculares: (a) modulação da agregação tóxica do IAPP e (b) mitigação do desequilíbrio redox induzido pelo IAPP.

Cecropia pachystachya bioactivity is unrelated to Ca^{2+} signalling

The cytosolic Ca^{2+} levels regulate a broad number of cellular processes, including metabolism, proliferation, transcription, and secretion. In β -cells, insulin granule exocytosis is tightly controlled by a finely tuned balance between Ca^{2+} influx and efflux pathways. Alterations in Ca^{2+} dynamics have been associated with impaired insulin secretion and β -cell dysfunction (37), thus representing an interesting target for a therapeutic approach.

Although there is no reported correlation between *Cecropia pachystachya* bioactivity and Ca^{2+} signalling, chlorogenic acid (one of the major components of EFF-Cp) was shown to suppress the dysregulated Ca^{2+} influx from endoplasmic reticulum and extracellular environment in endothelial cells exposed to a toxic phospholipid (38).

Bioatividade de Cecropia pachystachya não está relacionada com a via de sinalização do Ca^{2+}

Os níveis citosólicos de Ca^{2+} regulam um amplo número de processos celulares, incluindo o metabolismo, proliferação, transcrição e secreção. Nas células- β , a exocitose dos grânulos de insulina é rigidamente controlada por um equilíbrio bem ajustado entre as vias de influxo e efluxo de Ca^{2+} . Alterações na dinâmica do Ca^{2+} têm sido associadas à secreção deficiente de insulina e disfunção das células- β (37), representando assim um alvo interessante para uma abordagem terapêutica.

Embora não haja nenhuma correlação evidente entre a bioatividade de *Cecropia pachystachya* e a via de sinalização do Ca^{2+} , o ácido clorogénico (um dos principais componentes da EFF-Cp) foi descrito como sendo capaz de suprimir o influxo desregulado de Ca^{2+} proveniente do retículo endoplasmático e do ambiente extracelular em células endoteliais expostas a um fosfolípido tóxico (38).

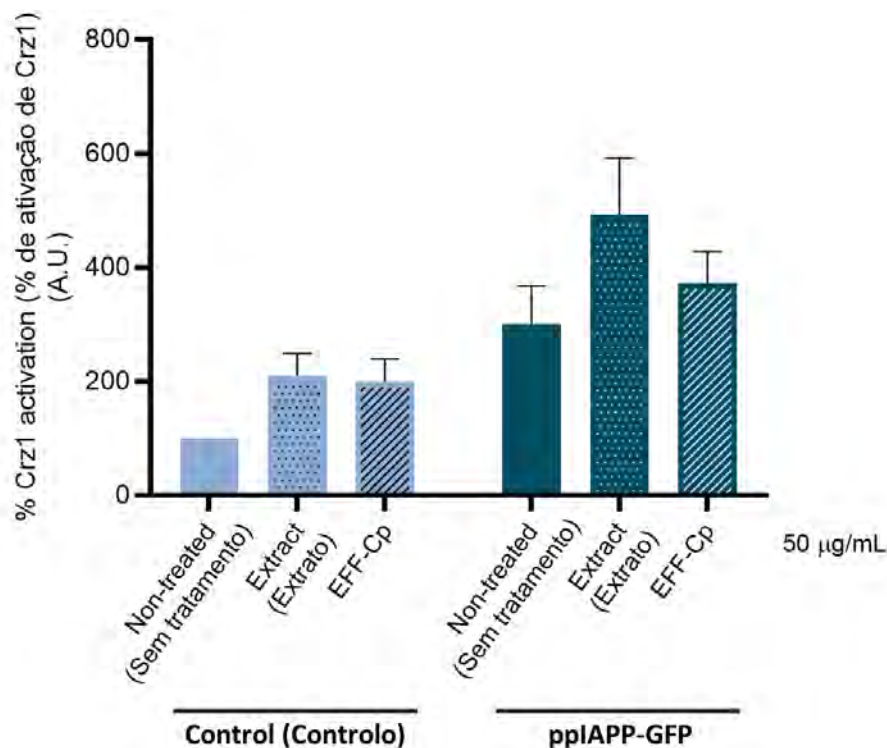


Figure 4 - Treatment with *Cecropia pachystachya* extract and EFF-Cp fraction does not attenuate ppIAPP-GFP-induced Ca^{2+} homeostasis impairment. YAA5 cells expressing ppIAPP-GFP and the respective control were induced for 20 h with galactose and co-treated with *C. pachystachya* extract or EFF-Cp at a concentration of 50 μ g/mL. Crz1 activation was assessed by monitoring β -galactosidase activity. The values represent mean \pm SD from at least three independent experiments. No statistical significances were found.

Figura 4 - O tratamento com o extrato de *Cecropia pachystachya* e fração EFF-Cp não atenua o comprometimento da homeostasia do Ca^{2+} induzido pelo ppIAPP-GFP. Células ppIAPP-GFP e o respetivo controlo foram induzidas durante 20 h com galactose e co-tratadas com extrato de *C. pachystachya* ou EFF-Cp a uma concentração de 50 μ g/mL. A ativação do Crz1 foi avaliada monitorizando a atividade da β -galactosidase. Os valores representam a média \pm desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. Não foram encontradas significâncias estatísticas.

Taking advantage of the developed yeast-based reporter assay, we used YAA5 cells expressing control and ppIAPP-GFP constructs as “*in vivo* test-tubes” to screen the bioactivity of *C. pachystachya* extract and EFF-Cp towards the modulation of Ca²⁺ signalling and consequent Crz1 activation. Since treatment with the lower concentration (50 µg/mL) of EFF-Cp significantly protected cells against ppIAPP-GFP toxicity, we selected this concentration for further tests. The incubation of YAA5_ppIAPP-GFP cells with *C. pachystachya* extract did not affect β-galactosidase activity (Figure 4), which is in accordance with its ineffectiveness to protect cells against ppIAPP-GFP-induced toxicity in the viability assay. Similarly, in ppIAPP-GFP expressing cells, no alterations on Crz1 activation were observed after treatment with EFF-Cp. Since EFF-Cp is not able to inhibit Crz1 hyperactivation, we hypothesize that it might be conferring protection against deleterious effects of ppIAPP by modulating alternative molecular mechanisms that do not include CaM/CaN pathway. Additional studies are needed to fully comprehend the molecular and cellular mode of action underlying EFF-Cp protective effect.

Conclusions

With the development of a ppIAPP-expressing yeast model that acts as a sensor of intracellular Ca²⁺ levels, our study provided new insights about the interference of ppIAPP on Ca²⁺ signaling. Overexpression of ppIAPP induced the hyperactivation of Crz1 activity, which allowed us to identify Ca²⁺ signaling dysregulation as one of the pathological mechanisms underlying ppIAPP cytotoxicity. Importantly, such findings also offered a valuable high-throughput yeast-based reporter assay to screen for compounds preventing the deleterious effects of ppIAPP on Ca²⁺ dysregulation. Our study shows that the effectiveness of EFF-Cp to improve cell viability was not mediated by changes in Ca²⁺ signaling, suggesting that other mechanisms might be associated with this protective response. Noteworthy, EFF-Cp chemical composition is enriched in chlorogenic acid and isoorientin, two secondary metabolites exerting known protective properties towards diabetic complications and IAPP pathological effects. Based on the reported evidence, it seems plausible to hypothesize that cellular protection mediated by EFF-Cp may include the mitigation of oxidative stress, ER stress, mitochondrial damage, and autophagy. Further studies are needed to unravel the molecular mechanisms underlying EFF-Cp bioactivity.

Tirando partido do modelo de levedura desenvolvido neste estudo, recorremos a células YAA5_ppIAPP-GFP para rastrear a bioatividade do extrato e EFF-Cp de *C. pachystachya* na modulação da via de sinalização do Ca²⁺ e consequente ativação do Crz1. Uma vez que o tratamento com a concentração mais baixa (50 µg/mL) de EFF-Cp protegeu significativamente as células contra a toxicidade do ppIAPP-GFP, selecionamos esta concentração para realizar os testes adicionais. A incubação das células YAA5_ppIAPP-GFP com extrato de *C. pachystachya* não afetou a atividade da β-galactosidase (Figura 4), o que está de acordo com sua ineficácia na proteção das células contra a toxicidade induzida pelo ppIAPP-GFP no ensaio de viabilidade. Da mesma forma, em células que expressam ppIAPP-GFP, nenhuma alteração na ativação do Crz1 foi observada após o tratamento com EFF-Cp. Uma vez que a EFF-Cp não é capaz de inibir a hiperativação do Crz1, colocamos então a hipótese de que o seu mecanismo de proteção contra os efeitos tóxicos do ppIAPP esteja a ocorrer de forma independente da via CaM/CaN. Estudos adicionais serão necessários para compreender totalmente o modo de ação molecular e celular subjacente ao efeito protetor da EFF-Cp.

Conclusões

Através do desenvolvimento de um modelo de levedura que simultaneamente expressa ppIAPP e que atua como um sensor dos níveis intracelulares de Ca²⁺, o nosso estudo forneceu novos dados sobre a interferência do ppIAPP na sinalização deste íon. A expressão do ppIAPP induziu a hiperativação da atividade do Crz1, o que nos permitiu identificar a desregulação da sinalização do Ca²⁺ como um dos mecanismos patológicos subjacentes à citotoxicidade do ppIAPP. A par disto, demonstrámos também que a eficácia da EFF-Cp na melhoria da viabilidade celular não é mediada por alterações na sinalização do Ca²⁺, sugerindo que outros mecanismos podem estar associados a essa resposta protetora. Digno de nota, a composição química da EFF-Cp é enriquecida em ácido clorogénico e isoorientina, dois metabolitos secundários que exercem propriedades protetoras contra complicações diabéticas e efeitos patológicos do IAPP. Com base nas evidências relatadas, parece plausível levantar a hipótese de que a proteção celular mediada pela EFF-Cp pode incluir a mitigação do stress oxidativo, stress do retículo endoplasmático, dano mitocondrial e autofagia. No entanto, mais estudos serão necessários para desvendar os mecanismos moleculares subjacentes à bioatividade da EFF-Cp.

Authors contributions statement

RM and RT conceived and designed the experiments. SF performed the experiments. SF, RT, AFR, FMS, FHR, NS and RM analyzed the data and wrote the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Acknowledgements

This study was funded by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)/Ministério da Ciência e do Ensino Superior, grant numbers PTDC/BIA-MOL/31104/2017 (RM) and UIDB/04567/2020 and UIDP/04567/2020 (CBIOS). iNOVA4Health Research Unit (LISBOA—01—0145—FEDER—007344), which is cofunded by FCT/Ministério da Ciência e do Ensino Superior, through national funds, and by FEDER under the PT2020 Partnership Agreement, is also acknowledged. Authors would like to acknowledge FCT for the financial support of AFR (PD/BD/135504/2018); SF (UI/BD/151421/2021), and RM (CEEC/04567/CBIOS/2020).

Conflict of interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Declaração sobre as contribuições do autor

RM e RT conceberam e desenharam as experiências. SF realizou as experiências. SF, RT, AFR, FMS, FHR, NS e RM analisaram os dados e escreveram o artigo. Todos os autores contribuíram para o artigo e aprovaram a versão submetida.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)/Ministério da Ciência e do Ensino Superior, números de bolsas PTDC/BIA-MOL/31104/2017 (RM) e UIDB/04567/2020 e UIDP/04567/2020 (CBIOS). A Unidade de Pesquisa iNOVA4Health (LISBOA-01-0145-FEDER-007344), que é co-financiada pela FCT/Ministério da Ciência e do Ensino Superior, por meio de fundos nacionais, e pela FEDER no âmbito do Acordo de Parceria PT2020, também é reconhecida. Os autores gostariam de agradecer à FCT pelo apoio financeiro prestado à AFR (PD/BD/135504/2018); SF (UI/BD/151421/2021) e RM (CEEC/04567/CBIOS/2020).

Conflito de interesses

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

References / Referências

- Kahn, S. E., Cooper, M. E., & Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet (London, England)*, 383(9922), 1068–1083. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62154-6
- Westermarck, P., Andersson, A., & Westermarck, G. T. (2011). Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological Reviews*, 91(3), 795–826. doi: 10.1152/physrev.00042.2009
- Raimundo, A. F., Ferreira, S., Martins, I. C., & Menezes, R. (2020). Islet Amyloid Polypeptide: A Partner in Crime With A β in the Pathology of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 35. doi: 10.3389/fnmol.2020.00035
- Huang, C., Lin, C., Haataja, L., Gurlo, T., Butler, A. E., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2007). High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes*, 56(8), 2016–2027. doi: 10.2337/db07-0197
- Abedini, A., & Schmidt, A. M. (2013). Mechanisms of islet amyloidosis toxicity in type 2 diabetes. *FEBS Letters*, 587(8), 1119–1127. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.017
- Anguiano, M., Nowak, R. J., & Lansbury, P. T. J. (2002). Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. *Biochemistry*, 41(38), 11338–11343. doi: 10.1021/bi020314u
- Rivera, J. F., Costes, S., Gurlo, T., Glabe, C. G., & Butler, P. C. (2014). Autophagy defends pancreatic β cells from Human islet amyloid polypeptide-induced toxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 124(8), 3489–3500. doi: 10.1172/JCI71981
- Mattson, M. P., & Chan, S. L. (2003). Calcium orchestrates apoptosis. *Nature Cell Biology*, 5(12), 1041–1043. doi: 10.1038/ncb1203-1041
- Tanaka, Y., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R. K., Wanner, T., Tanzi, R. E., Sawa, A., Dawson, V., Dawson, T. M., & Ross, C. A. (2001). Inducible expression of mutant α -synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Human Molecular Genetics*, 10(9), 919–926. doi: 10.1093/hmg/10.9.919
- Casas, S., Novials, A., Reimann, F., Gomis, R., & Gribble, F. M. (2008). Calcium elevation in mouse pancreatic beta cells evoked by extracellular human islet amyloid polypeptide involves activation of the mechanosensitive ion channel TRPV4. *Diabetologia*, 51(12), 2252–2262. doi: 10.1007/s00125-008-1111-z
- Casas, Silvia, Gomis, R., Gribble, F. M., Altirriba, J., Knuutila, S., & Novials, A. (2007). Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway is a downstream endoplasmic reticulum stress response induced by extracellular human islet amyloid polypeptide and contributes to pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes*, 56(9), 2284–2294. doi: 10.2337/db07-017
- Klec, C., Ziomek, G., Pichler, M., Malli, R., & Graier, W. F. (2019). Calcium Signaling in β -cell Physiology and Pathology: A Revisit. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). doi: 10.3390/ijms20246110
- Sabatini, P. V., Speckmann, T., & Lynn, F. C. (2019). Friend and foe: β -cell Ca^{2+} signaling and the development of diabetes. *Molecular Metabolism*, 21, 1–12. doi: 10.1016/j.molmet.2018.12.007
- Aragão, D. M. O., Guarize, L., Lanini, J., da Costa, J. C., Garcia, R. M. G., & Scio, E. (2010). Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(3), 629–633. doi: 10.1016/j.jep.2010.01.008
- Pereira, E. D. de M., da Silva, J., Carvalho, P. da S., Grivicich, I., Picada, J. N., Salgado Júnior, I. B., Vasques, G. J., Pereira, M. A. da S., Reginatto, F. H., & Ferraz, A. de B. F. (2020). In vivo and in vitro toxicological evaluations of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 83(19–20), 659–671. doi: 10.1080/15287394.2020.1811817
- Campos, M. L. de, Castro, M. B. de, Campos, A. D., Fernandes, M. F., Conegundes, J. L. M., Rodrigues, M. N., Mügge, F. L. B., Silva, A. M. da, Sabarense, C. M., Castañón, M. C. M. N., Andreazzi, A. E., & Scio, E. (2021). Antiobesity, hepatoprotective and anti-hyperglycemic effects of a pharmaceutical formulation containing *Cecropia pachystachya* Trécul in mice fed with a hypercaloric diet. *Journal of Ethnopharmacology*, 280, 114418. doi: 10.1016/j.jep.2021.114418
- Rivera-Mondragón, A., Ortíz, O. O., Bijttebier, S., Vlietinck, A., Apers, S., Pieters, L., & Caballero-George, C. (2017). Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1500–1512. doi: 10.1080/13880209.2017.1307421
- Pacheco, N. R., Pinto, N. de C. C., da Silva, J. M., Mendes, R. de F., da Costa, J. de C., Aragão, D. M. de O., Castañón, M. C. M. N., & Scio, E. (2014). *Cecropia pachystachya*: a species with expressive in vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant effects. *BioMed Research International*, 2014, 301294. doi: 10.1155/2014/301294
- Aragão, D. M. de O., Lima, I. V. de A., da Silva, J. M., Bellozi, P. M. Q., da Costa, J. de C., Cardoso, G. M. M., de Souza-Fagundes, E. M., & Scio, E. (2013). Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. *Phytotherapy Research: PTR*, 27(6), 926–930. doi: 10.1002/ptr.4811
- Gazal, M., Kaufmann, F. N., Acosta, B. A., Oliveira, P. S., Valente, M. R., Ortmann, C. F., Sturbelle, R., Lencina, C. L., Stefanello, F. M., Kaster, M. P., Reginatto, F. H., & Ghisleni, G. (2015). Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. *Neurochemical Research*, 40(7), 1421–1430. doi: 10.1007/s11064-015-1610-5
- Ortmann, C. F., Réus, G. Z., Ignácio, Z. M., Abelaira, H. M., Titus, S. E., de Carvalho, P., Arent, C. O., Dos Santos, M. A. B., Matias, B. I., Martins, M. M., de Campos, A. M., Petronilho, F., Teixeira, L. J., Morais, M. O. S., Streck, E. L., Quevedo, J., & Reginatto, F. H. (2016). Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. *Neurotoxicity Research*, 29(4), 469–483. doi: 10.1007/s12640-016-9596-6
- Gazal, M., Ortmann, C. F., Martins, F. A., Streck, E. L., Quevedo, J., de Campos, A. M., Stefanello, F. M., Kaster, M. P., Ghisleni, G., Reginatto, F. H., & Lencina, C. L. (2014). Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. *Brain Research Bulletin*, 108, 10–17. doi: 10.1016/j.brainresbull.2014.07.007
- Raimundo, A. F., Ferreira, S., Farrim, M. I., Santos, C. N., & Menezes, R. (2020). Heterologous Expression of Immature Forms of Human Islet Amyloid Polypeptide in Yeast Triggers Intracellular Aggregation and Cytotoxicity. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2035. doi: 10.3389/fmicb.2020.02035
- Costa, G. M., Ortmann, C. F., Schenkel, E. P., & Reginatto, F. H. (2011). An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, 1096–1002. doi: 10.1590/S0103-50532011000600014
- Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (1991). Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast*, 7(3), 253–263. doi: 10.1002/yea.320070307
- Garcia, G., Santos, C. N. do, & Menezes, R. (2016). High-Throughput Yeast-Based Reporter Assay to Identify Compounds with Anti-inflammatory Potential. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1449, 441–452. doi: 10.1007/978-1-4939-3756-1_29
- Araki, Y., Wu, H., Kitagaki, H., Akao, T., Takagi, H., & Shimoi, H. (2009). Ethanol stress stimulates the Ca^{2+} -mediated calcineurin/Crz1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(1), 1–6. doi: 10.1016/j.jbiosc.2008.09.005
- Dudnik, A., Almeida, A. F., Andrade, R., Avila, B., Bañados, P., Barbay, D., Bassard, J.-E., Benkoulouche, M., Bott, M., Braga, A., Breitel, D., Brennan, R., Bulteau, L., Chanforan, C., Costa, I., Costa, R. S., Doostmohammadi, M., Faria, N., Feng, C., ... Forster, J. (2018). BacHBerry: BACterial Hosts for production of Bioactive phenolics from bERRY fruits. *Phytochemistry Reviews*, 17(2), 291–326. doi: 10.1007/s11101-017-9532-2

29. Menezes, R., Foito, A., Jardim, C., Costa, I., Garcia, G., Rosado-Ramos, R., Freitag, S., Alexander, C. J., Outeiro, T. F., Stewart, D., & Santos, C. N. (2020). Bioprospection of Natural Sources of Polyphenols with Therapeutic Potential for Redox-Related Diseases. *Antioxidants*, 9(9). doi: 10.3390/antiox9090789
30. Kallscheuer, N., Menezes, R., Foito, A., da Silva, M. H., Braga, A., Dekker, W., Sevillano, D. M., Rosado-Ramos, R., Jardim, C., Oliveira, J., Ferreira, P., Rocha, I., Silva, A. R., Sousa, M., Allwood, J. W., Bott, M., Faria, N., Stewart, D., Ottens, M., ... Marienhagen, J. (2019). Identification and Microbial Production of the Raspberry Phenol Salidroside that Is Active against Huntington's Disease. *Plant Physiology*, 179(3), 969–985. doi: 10.1104/pp.18.01074
31. Cheng, B., Liu, X., Gong, H., Huang, L., Chen, H., Zhang, X., Li, C., Yang, M., Ma, B., Jiao, L., Zheng, L., & Huang, K. (2011). Coffee Components Inhibit Amyloid Formation of Human Islet Amyloid Polypeptide in Vitro: Possible Link between Coffee Consumption and Diabetes Mellitus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13147–13155. doi: 10.1021/jf201702h
32. Karthikesan, K., Pari, L., & Menon, V. P. (2010a). Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *General Physiology and Biophysics*, 29(1), 23–30. doi: 10.4149/gpb_2010_01_23
33. Karthikesan, K., Pari, L., & Menon, V. P. (2010b). Protective effect of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid against streptozotocin–nicotinamide generated oxidative stress induced diabetes. *Journal of Functional Foods*, 2(2), 134–142. doi: 10.1016/j.jff.2010.04.00
34. Miao M, & Xiang L. (2020). Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. *Advances in Pharmacology*, 87, 71–88. doi: 10.1016/bs.apha.2019.12.002
35. Kolb, H., Martin, S., & Kempf, K. (2021). Coffee and Lower Risk of Type 2 Diabetes: Arguments for a Causal Relationship. *Nutrients*, 13(4). doi: 10.3390/nu13041144
36. Ziqubu, K., Dlodla, P. V., Joubert, E., Muller, C. J. F., Louw, J., Tiano, L., Nkambule, B. B., Kappo, A. P., & Mazibuko-Mbeje, S. E. (2020). Isoorientin: A dietary flavone with the potential to ameliorate diverse metabolic complications. *Pharmacological Research*, 158, 104867. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104867
37. Gilon, P., Chae, H.-Y., Rutter, G. A., & Ravier, M. A. (2014). Calcium signaling in pancreatic β -cells in health and in Type 2 diabetes. *Cell Calcium*, 56(5), 340–361. doi: 10.1016/j.ceca.2014.09.001
38. Jung, H.-J., Im, S.-S., Song, D.-K., & Bae, J.-H. (2017). Effects of chlorogenic acid on intracellular calcium regulation in lysophosphatidylcholine-treated endothelial cells. *BMB Reports*, 50(6), 323–328. doi: 10.5483/bmbrep.2017.50.6.182

BIOMEDICAL AND BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH

JORNAL DE INVESTIGAÇÃO
BIOMÉDICA E BIOFARMACÊUTICA

Contents / Conteúdos

- 156 **Editorial: This issue in brief**
Este numero em breves notas
L. Monteiro Rodrigues
- 158 **Hereditary Hemochromatosis (Clinical case)**
Hemocromatose hereditária (Caso clínico)
Bruno Sousa & Nelson Tavares
- 164 **Assessment of nutritional risk in elderly adults of a senior residence – a case study**
Avaliação do risco nutricional em idosos utentes de uma residência sénior – um estudo de caso
Diana Pereira, Cíntia Ferreira-Pêgo, and Bruno Sousa
- 176 **Probiotics in the gut-skin axis – the case of kefir**
Probióticos no eixo intestino-pele - o caso do kefir
Emília Alves, Patrícia Rijo, Luís Monteiro Rodrigues, Catarina Rosado
- 191 **Photoplethysmography in dogs: identification of spectral elements and application in a surgical setting**
Fotoplethysmografia em cães: identificação dos elementos espectrais e aplicação em ambiente cirúrgico
Rui Assunção, Clemente Rocha, Luís Lobo, Luís Monteiro Rodrigues, João Requiça
- 200 **Optoacoustic Tomography – good news for microcirculatory research**
Tomografia Optoacústica – boas notícias para a investigação microcirculatória
Tiago Granja, Sérgio Faloni de Andrade, and Luis Monteiro Rodrigues
- 213 **An overview of violence and sexual abuse in children: global data, policy responses, and multidisciplinary approaches in health care**
Uma perspetiva geral da violência e do abuso sexual em crianças: dados globais, respostas políticas e abordagens multidisciplinares no contexto dos cuidados de saúde
Nuno Coelho, Anabela Neves, and João Gregório
- 228 **Rapid UV-Vis spectroscopy methods for quantification of ranitidine tablets**
Métodos de espectroscopia rápida UV-Vis para quantificação de comprimidos de ranitidina
Patrícia Rijo, Lara Ribeiro, Marisa Nicolai, Paula Pereira, Célia Faustino
- 238 **Single versus mixed edge activators in caffeine-loaded transfersomes: physicochemical and cytotoxicity assessment**
Ativadores de superfície únicos versus mistos em transferossomas para veicular cafeína: avaliação físico-química e de citotoxicidade
Íris Guerreiro, Marta Rodrigues, Ana Sofia Fernandes, Catarina Rosado, Catarina Pereira-Leite
- 252 **Effect of cosmetic films with ascorbic acid and hyaluronic acid on transepidermal water loss**
Efeito de filmes cosméticos com ácido ascórbico e ácido hialurônico na perda de água transepidermal
Isadora Marques Garros Brait, Mariane Massufero Vergilio, Laura Moretti Aiello, Gislaïne Ricci Leonardi
- 263 **Clinical efficacy of a cosmetic formulation with vitamin B3 for the treatment of oily skin**
Eficácia clínica de uma formulação cosmética contendo vitamina B3 para o tratamento da pele oleosa
Marcella Gabarra Almeida Leite & Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos
- 274 **Cecropia pachystachya protection against preproIAPP cytotoxicity is independent of Ca²⁺ homeostasis: lessons learned using a novel yeast model of preproIAPP-induced Ca²⁺ intracellular dysregulation**
Efeito protetor de Cecropia pachystachya contra a citotoxicidade do preproIAPP é independente da homeostasia do Ca²⁺: conhecimento revelado por um modelo de levedura de desregulação de Ca²⁺ mediada pelo preproIAPP
Sofia Ferreira, Rejane G. Tavares, Ana F. Raimundo, Francieli M. Stefanello, Flavio H. Reginatto, Nuno Saraiva, Regina Menezes

Supplement | Suplemento

- S291 **ePoster Abstract Book - The 56th Annual Congress of SBFIS, Brazilian Society of Physiology, 12 - 17 Outubro 2021**
Livro de Resumos - 56º Congresso Anual da SBFIS - Sociedade Brasileira de Fisiologia, 12 - 17 outubro 2021
- S554 **Abstract Book - The 33rd Brazilian Congress of Cosmetology, 18-20 August 2021**
Livro de Resumos - 33º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 18-20 agosto 2021