

Biomed Biopharm Res
19(2) 264 – S446 (2022)

print
ISSN 2182-2360

online
ISSN 2182-2379

BIOMEDICAL AND BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH

INVESTIGAÇÃO
BIOMÉDICA E BIOFARMACÊUTICA

Editor | Luís Monteiro Rodrigues

Sponsored by / Com o patrocínio da



CPLP
Comunidade dos Países
de Língua Portuguesa

Vol. 19, No. 2

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

Luis 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

Valquiria Villas Boas - U Caxias do Sul, BR

Walter António 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 Correspondência**

ALIES

Av Campo Grande, 376

1749-024 Lisboa, Portugal

Tel: +351217515550 Fax: +351217515598

**Electronic correspondence /
Correspondência eletrónica**

directoralties@alies.pt
bbr_office@alies.pt

Electronic Edition / Edição electrónica

<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

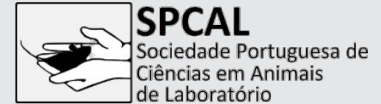
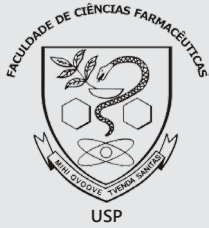
Production Manager / Gerente de Produção

Amanda B. Rodrigues

Website Manager / Gerente de Website

Clemente Rocha

Scientific Partners / Parceiros Científicos





Luís Monteiro Rodrigues

Editor

BBR 19.2

A new development cycle to begin

Our *Biomedical and Biopharmaceutical Research* (BBR) journal has been a consistent instrument of scientific culture within the Portuguese speaking communities. Its original character highlights its role as an open access, full waiver scientific publication for Portuguese speaking authors, contributing to share knowledge and promote societal progress.

Some achievements are clear, such as the increasing number of submissions from our Brazilian partners in particular, as demonstrated in the current issue, the growing number of accesses, downloads (abstracts and full-texts) and citations and presence in many recognized global databases. From the editorial perspective, we have successfully put into place better operational practices facilitating access and time to publication.

We seek now to increase our ambitions. BBR will soon have a newly redesigned website of its own, with new and more easy-to-use functionalities. From general information including connection to professional and social networks, to submission reviewing, and decision processes now entirely developed on-line. With this permanent concern for ethics, transparency, and clarity in mind, processing has also been redesigned in order to provide more objective decision steps and criteria to editors and simplify follow up for authors. Among other advantages, these new procedures expedite selection by a primary verification upon submission and center the reviewing management with the Associate Editor who is now able to interact more directly with the reviewers. In the case of an unfavorable decision regarding publication, an additional appeal step is now also in place. We believe these measures will promote our visibility and broaden our audience while reinforcing our commitment to the core values and mission of BBR.

The present issue includes eight original manuscripts, one review, and one clinical case. Four supplements are also included: The Abstract Book from the InnovDelivery '22 - I Lusophone Meeting on Innovative Delivery Systems (virtual), from June 2022 ([DOI: 10.19277/bbr.19.2.289](https://doi.org/10.19277/bbr.19.2.289)) - The Abstract Book FeSBS 2022 - XXXVI from the Annual Meeting of the Federation of Experimental Biology Societies (August 2022) ([DOI: 10.19277/bbr.19.2.291](https://doi.org/10.19277/bbr.19.2.291)) - The Abstract Book of the CBIOS Scientific Sessions ([DOI: 10.19277/bbr.19.2.300](https://doi.org/10.19277/bbr.19.2.300)) and - The Abstract Book of the 1st African Conference on Natural Products & Related Fields 2022 ([DOI: 10.19277/bbr.19.2.302](https://doi.org/10.19277/bbr.19.2.302))

L Monteiro Rodrigues

Editor in Chief

Um novo ciclo de desenvolvimento a começar

A nossa revista de *Investigação Biomédica e Biofarmacêutica* (IBB) tem sido um instrumento consistente de cultura científica no seio das comunidades de língua portuguesa. O seu carácter original evidencia-se na publicação científica de acesso aberto e gratuito para autores lusófonos que pretende contribuir para partilhar conhecimento e, através dele, promover o progresso social.

Algumas realizações são claras, tais como o número crescente de submissões, em particular dos nossos parceiros brasileiros - como se encontra bem demonstrado na edição actual, o número crescente de acessos, downloads (resumos e textos completos) e citações e, a presença numa parte significativa de bases de dados globais reconhecidas. Do ponto de vista editorial, conseguimos pôr em prática melhores práticas operacionais que facilitam o acesso e o tempo de publicação.

Procuramos agora aumentar as nossas ambições. A IBB terá em breve um sítio próprio recentemente redesenhado, com funcionalidades novas e mais fáceis de usar. Desde a informação geral, incluindo ligação às redes profissionais e sociais, até aos processos de revisão e decisão agora inteiramente desenvolvidos on-line. Com a permanente preocupação ética de garantia de transparência e clareza em mente, o processamento foi também repensado a fim de proporcionar aos editores etapas e critérios de decisão mais objectivos, e simplificar o acompanhamento dos autores. Entre outras vantagens, estes novos procedimentos aceleram a selecção através de uma verificação primária no momento da submissão e centram a gestão da revisão no Editor Associado, que está agora em condições de interagir mais directamente com os revisores. No caso de uma decisão desfavorável em relação à publicação, uma etapa adicional de recurso está agora também em vigor. Acreditamos que estas medidas promoverão a nossa visibilidade e alargarão o nosso público, reforçando ao mesmo tempo o nosso compromisso com os valores fundamentais e a missão da IBB.

O número actual inclui oito manuscritos originais, uma revisão, e um caso clínico. Quatro outros suplementos estão incluídos: - O Livro de Resumos do InnovDelivery '22 - I Encontro Lusófono sobre Sistemas de Entrega Inovadores (virtual), de Junho de 2022 ([DOI: 10.19277/bbr.19.2.289](https://doi.org/10.19277/bbr.19.2.289)) - O Livro de Resumos FeSBS 2022 - XXXVI da Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (Agosto 2022) ([DOI: 10.19277/bbr.19.2.291](https://doi.org/10.19277/bbr.19.2.291)) - O Livro de Resumos das Sessões Científicas CBIOS 2022 ([DOI: 10.19277/bbr.19.2.300](https://doi.org/10.19277/bbr.19.2.300)). e - O Livro de Resumos das 1ª Conferência Africana sobre Produtos Naturais e Áreas Relacionadas 2022 ([DOI: 10.19277/bbr.19.2.302](https://doi.org/10.19277/bbr.19.2.302)).

Adherence to the Mediterranean food pattern and sociodemographic factors in students of the 3rd cycle of basic education on Terceira Island, Azores, Portugal

Adesão ao padrão alimentar mediterrânico e fatores sociodemográficos em estudantes do 3.º ciclo do ensino básico da ilha Terceira, Açores, Portugal

Leandro Oliveira ¹, Francisco Sousa ^{2,3} & Maria Graça Silveira ^{4,5}

¹CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ²School of Social and Human Sciences of the University of the Azores, Rua da Mãe de Deus, 9500-321 Ponta Delgada, Açores, Portugal; ³Interdisciplinary Centre of Social Sciences - Campus of the University of Azores CICS.NOVA.

UAc, Rua da Mãe de Deus, 9500-321 Ponta Delgada, Açores, Portugal; ⁴School of Agrarian and Environmental Sciences of University of the Azores, Rua Capitão João d'Ávila – Pico da Urze 9700-042 Angra do Heroísmo, Açores, Portugal;

⁵Biotechnology Centre of Azores, Rua Capitão João d'Ávila – Pico da Urze 9700-042 Angra do Heroísmo, Açores, Portugal*

corresponding author / autor para correspondência: leandroliveira.nut@gmail.com

Abstract

The Mediterranean food pattern (MFP) has been identified as promoting health and preventing certain chronic diseases. The objective of this study was to determine the adherence to MFP in a sample of students in the 3rd cycle of basic education of the Terceira Island and its relationship with sociodemographic factors and weight status. Data was collected between May and June 2015. A direct application questionnaire that included KIDMED was used to assess adherence to the MFP. A total of 303 students aged between 11 and 19 years old participated in this study, mostly female (57.8%). Most students (64.4%) showed an intermediate level of adherence to the MFP and the prevalence of overweight was 33%. Boys had a higher percentage of regular consumption of breakfast cereals and fatty fruits and daily consumption of two yogurts and/or 40 g of cheese. Students who had a vegetable garden and helped to tend it or who belonged to families with additional members under the age of 18 had greater adherence to MFP. No associations were found between other sociodemographic factors and adherence to MFP. Based on these results, it is suggested to reinforce existing food education programs in schools, as well as develop other programs with a multidisciplinary approach that promotes adherence to the MFP.

Keywords: Mediterranean Food Pattern, students, KIDMED, weight status, Azores

Resumo

O padrão alimentar mediterrânico (PAM) tem sido apontado como sendo promotor de saúde e preventor de determinadas doenças crónicas. O objetivo deste estudo era determinar a adesão ao PAM numa amostra de estudantes do 3.º ciclo do ensino básico da ilha Terceira, e a sua relação com fatores sociodemográficos e estado ponderal. A recolha de dados foi realizada entre maio e junho de 2015. Utilizou-se um questionário de aplicação direta que incluía o KIDMED para avaliar a adesão ao PAM. Participaram neste estudo 303 estudantes com idade entre os 11 e os 19 anos, maioritariamente do sexo feminino (57,8%). A maior parte dos estudantes (64,4%) revelou um nível intermédio de adesão ao PAM e a prevalência de excesso de peso foi de 33%. Os rapazes tiveram uma maior percentagem de consumo regular de cereais ao pequeno-almoço e de frutos gordos e consumo diário de 2 iogurtes e/ou 40 g de queijo. Estudantes que tinham uma horta e ajudavam a cuidar dela, ou pertencentes a famílias com mais membros com idade inferior a 18 anos, tinham uma adesão maior ao PAM. Não foram encontradas associações entre outros fatores sociodemográficos com a adesão ao PAM. Face aos resultados encontrados, sugere-se o reforço dos programas de educação alimentar existentes nas escolas, bem como o desenvolvimento de outros com uma abordagem multidisciplinar que promovam a adesão ao PAM.

Palavras-chave: Padrão Alimentar Mediterrânico, alunos, KIDMED, estado ponderal, Açores

Introduction

The expression "Mediterranean Diet" was first used in the 1960s and is associated with a reduction of the incidence of chronic diseases and a longer life expectancy. This cultural, historical, and health model has been recognized in Portugal, Spain, Morocco, Italy, Greece, Cyprus, and Croatia by UNESCO as an Intangible Cultural Heritage of Humanity since December 4, 2013 (1).

The Mediterranean Food Pattern (MFP) is characterized by a high intake of fresh, seasonal, and low processed foods (fruits and vegetables, whole grains, pulses/legumes, and oilseed fruits), moderate intake of dairy products (preferably cheese and yogurt), preferential intake of fish or white meats (to the detriment of red meats), regular but moderate consumption of wine (tending to accompany meals), use of herbs and spices for seasoning, and olive oil as the main source of fats (2). Thus, we can see that from a nutritional perspective, MFP is low in saturated fats, simple carbohydrates, and animal protein, and is rich in antioxidants, fiber, and monounsaturated fats; MFP has also been reported to have an adequate ratio of omega-6/omega-3 fatty acids (3).

Several studies have demonstrated the health benefits of MFP, namely in the prevention and treatment of chronic diseases such as obesity (4), cardiovascular diseases (5), type 2 diabetes mellitus (6), metabolic syndrome, and protection against various types of cancer (7), neurodegenerative diseases, depression, and respiratory diseases (8).

Despite these benefits, only 26% of the Portuguese population has a high level of adherence to the Mediterranean diet, with the majority of the population having consumption of pulses/legumes, vegetables, and oilseeds below the desirable level (9). Furthermore, recent data report that 57.5% of Portuguese adults (63.1% of men and 52% of women) are pre-obese or obese, and that about one in three children is overweight, with more than 10% of them being obese (10).

Thus, it appears necessary to promote MFP among the Portuguese population, especially among children, as eating habits are shaped in childhood (11). Thus, it is necessary to develop more effective interventions adjusted to the characteristics of this population group.

Introdução

A expressão "Dieta Mediterrânea" foi usada pela primeira vez na década de 1960 sendo associada a uma redução na incidência de doenças crônicas e a uma maior esperança de vida. Esta é um modelo cultural, histórico e de saúde, que desde 4 de dezembro de 2013, é reconhecido em Portugal, Espanha, Marrocos, Itália, Grécia, Chipre e Croácia pela UNESCO como Património Cultural Imaterial da Humanidade (1).

O Padrão Alimentar Mediterrânico (PAM) é caracterizado pela: elevada ingestão de alimentos *in natura*, sazonais e pouco processados (frutas e hortaliças, cereais integrais, leguminosas e frutas oleaginosas); ingestão moderada de laticínios (preferencialmente queijo e iogurte); ingestão preferencial de peixe ou carnes brancas, em detrimento de carnes vermelhas; consumo regular mas moderado de vinho (tendendo a acompanhar as refeições); uso de ervas e especiarias para tempero e azeite como principal fonte de gordura (2). Deste modo, podemos verificar que de uma perspectiva nutricional, o PAM é pobre em gorduras saturadas, hidratos de carbono simples e proteína animal, sendo rico em antioxidantes, fibras e gorduras monoinsaturadas; tem também sido descrito que o PAM possui rácio adequado de ácidos gordos ómega-6/ómega-3 (3).

Vários estudos têm demonstrado os benefícios para a saúde do PAM, nomeadamente na prevenção e tratamento de doenças crônicas como obesidade (4), doenças cardiovasculares (5), diabetes mellitus tipo 2 (6), síndrome metabólica e proteção contra vários tipos de cancro (7); doenças neurodegenerativas, depressão e doenças respiratórias (8).

Apesar destes benefícios, apenas 26% da população portuguesa apresenta uma elevada adesão à dieta mediterrânica, sendo que a maioria da população tem um consumo de leguminosas, hortofrutícolas e frutos oleaginosos abaixo do desejável (9). Além disso, dados recentes reportam que 57,5% dos adultos portugueses (63,1% dos homens e 52% das mulheres) são pré-obesos ou obesos, e que cerca de uma em cada três crianças tem excesso de peso sendo que mais de 10% delas têm mesmo obesidade (10).

Deste modo, verifica-se que é necessário promover o PAM junto da população portuguesa, especialmente junto das crianças, uma vez que os hábitos alimentares são formados desde a infância (11). Torna-se, assim, necessário o desenvolvimento de intervenções mais eficazes e ajustadas às características deste grupo

Therefore, the objective of this study is to evaluate the level of adherence to the MFP in students in the 3rd cycle of basic education of the Terceira Island and its relationship with sociodemographic factors and their weight status.

Materials and Methods

This is a cross-sectional study whose population consisted of students who attended the 3rd cycle of basic education in basic schools on Terceira Island, Azores, Portugal. Data collection took place between May and June 2015.

Sample and procedures

On Terceira Island, there are seven organic units (schools or groups of schools) of the regional education system (four in Angra do Heroísmo and three in Praia da Vitória). Five units (three in Angra do Heroísmo and two in Praia da Vitória) agreed to participate in the study. The aim was to reach at least 50% of the classes each year of the 3rd cycle of basic education in each participating school. These classes were selected for convenience according to the recommendation of the school board. The questionnaires were distributed to the students and completed in the classroom, with a researcher present to clarify doubts.

Instruments

A questionnaire consisting of four sections was used. Section I was related to sociodemographic characterization and anthropometric data (gender, age, nationality, city of residence, number of household members, weight, height, etc.). Section II referred to food consumption, using a qualitative food frequency questionnaire and the Portuguese version of the Mediterranean Diet Quality Index for children and teenagers (KIDMED) (12). Section III was directed to questions related to knowledge about food. Finally, Section IV addressed the perception, beliefs, and attitudes towards health-promoting foods. Only data referring to Section I and KIDMED was examined for this paper. The KIDMED index consists of a set of sixteen questions related to daily consumption and frequency of consumption of specific foods. These questions were rated with a score (+1 or -1) according to their accordance with the MFP. The sum of the values obtained (between 0 and 12) enables the categorization

populacional. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar o nível de adesão ao PAM em alunos do 3.º ciclo do ensino básico da Ilha Terceira, e a sua relação com fatores sociodemográficos e o seu estado ponderal.

Material e Métodos

Este é um estudo transversal cuja sua população foi constituída por alunos que frequentam o 3.º ciclo do ensino básico nas escolas básicas da Ilha Terceira, Açores, Portugal. A recolha de dados decorreu entre maio e junho de 2015.

Amostra e procedimentos

Na ilha Terceira existem sete unidades orgânicas (escolas ou agrupamentos de escolas) do sistema educativo regional (quatro em Angra do Heroísmo e três na Praia da Vitória). Cinco delas (três em Angra do Heroísmo e dois na Praia da Vitória) aceitaram participar no estudo. Pretendeu-se alcançar pelo menos 50% das turmas de cada ano do 3.º ciclo do ensino básico de cada escola participante. Estas turmas foram selecionadas por conveniência de acordo com a recomendação da direção da escola. Os questionários foram distribuídos aos alunos e preenchidos em sala de aula, estando presente um investigador para o esclarecimento de dúvidas.

Instrumentos

Foi utilizado um questionário constituído por quatro grupos. O grupo I era relacionado com a caracterização sociodemográfica e dados antropométricos (sexo, idade, nacionalidade, cidade de residência, número de elementos do agregado familiar, peso, estatura, etc.). O grupo II referia-se ao consumo alimentar em que se utilizou-se um questionário qualitativo de frequência alimentar e a versão portuguesa do Índice de Qualidade da Dieta Mediterrânea para Crianças e Adolescentes — KIDMED (12). O grupo III era direcionado para questões referentes ao conhecimento sobre alimentação. Por fim, o grupo IV abordou a perceção, crenças e atitudes em relação aos alimentos promotores de saúde. Neste trabalho apenas serão utilizados os dados referentes ao grupo I e ao KIDMED. Este índice, consiste num conjunto de dezasseis questões relacionadas ao consumo diário e à frequência de consumo de alguns alimentos. Estas questões foram cotadas com uma pontuação (+1 ou -1) de acordo com a sua consonância com o PAM. A soma dos valores obtidos varia entre 0 e 12 e permite categorizar a adesão ao PAM em três níveis: nível 1 - alta adesão (≥ 8); nível 2 - adesão intermédia (4 a 7) e

of MFP adherence into three levels: level 1 - high adherence (≥ 8); level 2 - intermediate adherence (4 to 7) and level 3 - low adherence (≤ 3). Body mass index was classified according to the World Health Organization criteria for children (13).

Ethical considerations

The present study was conducted following the ethical standards established in the 1964 Declaration of Helsinki and its subsequent amendments (14) or comparable ethical standards. The Board of the evaluated schools approved the present study. The completion of the questionnaires by the students took place after authorization from their guardians through an informed consent authorization form. The students were also asked if they wanted to participate in the study, and after an affirmative answer from both, the questionnaire was distributed.

Statistical analysis

Following data collection, statistical processing was performed using IBM SPSS Statistics, version 26.0 for Windows. Descriptive statistics consisted of calculating the mean and standard deviation (SD) in the case of cardinal variables and calculating the relative and absolute frequencies in the case of ordinal and nominal variables. To compare the mean orders of the independent samples, the Mann-Whitney test was used, and the chi-square test was used to compare proportions between qualitative variables. A significance level (p) of 0.05 was considered in all analyses.

Results

A total of 366 students agreed to participate in the study, with parental consent. However, 63 questionnaires were rejected because they were not filled in correctly or because some data was missing. Most participants were female (58%), aged between 14 and 16 years (66%), attending the 9th grade (68%), and residing in rural areas (85%) in Angra do Heroísmo (73%). Regarding weight status, most were classified as having normal weight (66%), however, 33% were overweight (pre-obese or obese). A more detailed description is shown in Table 1.

nível 3 – baixa adesão (≤ 3). Neste estudo foi utilizada a versão portuguesa do Índice KIDMED traduzido para o português. O índice de massa corporal foi classificado de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde para crianças e jovens/adolescentes (13).

Considerações éticas

O presente estudo foi realizado de acordo com as normas éticas estabelecidas na Declaração de Helsínquia de 1964 (14) e as suas posteriores emendas ou normas éticas comparáveis. A direção das escolas avaliadas, aprovaram a realização do presente estudo. O preenchimento dos questionários por parte dos alunos decorreu após autorização dos encarregados de educação através de um termo de consentimento informado a autorizar o seu educando a participar no mesmo. Foi ainda perguntado aos alunos se queriam participar no estudo, e após resposta afirmativa de ambos, foi distribuído o questionário.

Análise estatística

Após a recolha de dados, foi realizado o tratamento estatístico com recurso ao IBM SPSS Statistics, versão 26.0 para Windows. A estatística descritiva consistiu no cálculo da média e do desvio padrão (DP) no caso das variáveis cardinais, e no cálculo das frequências relativas e absolutas no caso das variáveis ordinais e nominais. Para a comparação das ordens médias das amostras independentes, foi utilizado o teste de Mann-Whitney; e para comparar proporções entre variáveis qualitativas, foi utilizado o teste Qui-quadrado. Foi considerado um nível de significância (p) de 0,05 em todas as análises.

Resultados

Aceitaram participar do estudo, com o consentimento dos pais, 366 alunos. Contudo, 63 questionários foram rejeitados por não terem sido preenchidos corretamente ou por falta de alguns dados. A maioria dos participantes era do sexo feminino (58%), com idades compreendidas entre os 14 e os 16 anos (66%), a frequentar o 9.º ano (68%) e residentes em zonas rurais (85%) em Angra do Heroísmo (73%). Em relação ao estado ponderal, a maioria foi classificada como normoponderal (66%), contudo 33% tinha excesso de peso (pré-obesidade e obesidade). Uma descrição mais detalhada pode ser encontrada na Tabela 1.

Table 1 - Sociodemographic characterization.
Tabela 1 - Caracterização sociodemográfica.

	n (%)
Sex / Sexo (n=303)	
Female / Feminino	175 (57.8)
Male / Masculino	128 (42.2)
Age / Idade (n=303)	
11-13 years / anos	95 (31.3)
14-16 years / anos	199 (65.7)
> 16 years / anos	9 (3.1)
Nationality / Nacionalidade (n=303)	
Portuguese / Portuguesa	298 (98.4)
Other / Outra	5 (1.6)
City / Cidade (n=303)	
Angra do Heroísmo	222 (73.2)
Praia da Vitória	81 (26.8)
Residence zone / Zona de residencia (n= 303)	
Rural / Rural	257 (84.9)
Urban / Urbana	46 (15.2)
Academic Year / Ano que frequenta (n=303)	
7th year / 7.º ano	87 (28.7)
8th year / 8.º ano	85 (28.1)
9th year / 9.º ano	117 (38.6)
Professional education / Ensino profissional	14 (4.6)
Number of household members / Número de elementos do agregado familiar (n=303)	
Two / Dois	11 (4.0)
Three / Três	69 (25.3)
Four / Quatro	130 (47.6)
Five or more / Cinco ou mais	63 (23.1)
Number of children in the household / Número de crianças do agregado familiar (n=302)	
One / Uma	138 (45.6)
Two / Duas	122 (40.4)
Three or more / Três ou mais	42 (13.9)
Existence of a vegetable garden in the current residence / Existência de horta na residência atual (n=303)	
No	93 (30.8)
Yes	210 (69.2)
If yes, usually helps to take care of the garden / Se sim, costuma ajuda a cuidar da horta (n=202)	
No / Não	77 (38.1)
Yes / Sim	125 (61.9)
Weight Status / Estado ponderal (n=303)	
Underweight / Baixo peso	4 (1.3)
Normal weight / Normoponderal	199 (65.7)
Pre-obesity / Pré-obesidade	73 (24.1)
Obesity / Obesidade	27 (8.9)

Table 2 - Distribution of the students' answers to the KIDMED index by sex (n=303).
Tabela 2 - Distribuição das respostas dos alunos ao índice KIDMED por sexo (n=303)

	Male / Masculino n= 128		Female / Feminino n= 175		p
	Yes / Sim (%)	No / Não (%)	Yes / Sim (%)	No / Não (%)	
1. Do you consume a piece of fruit or natural fruit juice every day? / Comes uma peça de fruta ou bebes um sumo de fruta natural todos os dias?	70.3	29.7	72.0	28.0	0.748
2. Do you consume two pieces of fruit or two natural fruit juices every day? / Comes duas ou mais peças de fruta, todos os dias?	39.8	60.2	26.3	73.7	0.012*
3. Do you consume fresh vegetables (salads) or soups or vegetables (carrots, cabbage, etc.) in your dish every day? / Comes vegetais crus (alface, tomate...) ou cozinhados (brócolos, couve...), regularmente, pelo menos uma vez por dia?	69.5	30.5	66.3	33.7	0.551
4. Do you consume fresh vegetables (salads) or soups or vegetables (carrots, cabbage etc.) in the dish more than once a day? / Comes vegetais crus (alface, tomate...) ou cozinhados (brócolos, couve...) mais do que uma vez por dia?	50.0	50.0	44.0	56.0	0.301
5. Do you consume fish regularly (at least 2 to 3 times a week)? / Comes peixe com regularidade (pelo menos 2 a 3 vezes por semana)?	62.5	37.5	64.0	36.0	0.789
6. Do you eat "fast food" (burgers, hotdogs, pizzas ...) more than once a week? / Vais uma ou mais vezes por semana a restaurantes de fast-food?	35.2	64.8	25.7	74.3	0.076
7. Do you eat legumes/pulses (beans, peas, chickpeas, etc.), more than once a week? / Comes leguminosas (feijão, grão, ervilhas...) mais do que uma vez por semana?	66.4	33.6	68.0	32.0	0.77
8. Do you consume pasta or rice almost every day (5 or more times a week)? / Comes diariamente arroz ou massa (5 ou mais vezes por semana)?	65.6	34.4	73.7	26.3	0.128
9. Do you consume cereals or products derived from cereals (bread etc.) at breakfast? / Ao pequeno-almoço comes cereais ou derivados (pão...)?	92.2	7.8	83.4	16.6	0.025*
10. Do you eat fatty fruits (nuts, almonds, pine nuts, etc.) regularly (at least 2 to 3 times a week)? / Comes frutos oleaginosos (nozes, amêndoas...) pelo menos 2 a 3 vezes por semana?	18.8	81.3	10.3	89.7	0.035*
11. Do you use olive oil at home? / Em tua casa, utilizam azeite?	89.8	10.2	93.7	6.3	0.218
12. Do you normally eat breakfast? / Costumas tomar o pequeno-almoço?	93.8	6.3	90.9	9.1	0.357
13. Do you consume dairy products (milk, yogurt, etc.) for breakfast? / Ao pequeno-almoço costumas beber leite ou derivados (iogurte, queijo...)?	93.0	7.0	89.1	10.9	0.256
14. Do you eat confectionery or pastry (cookies, croissants, cakes, etc.) for breakfast? / Comes produtos de pastelaria ao pequeno-almoço?	38.3	61.7	33.7	66.3	0.412
15. Do you consume two cups of milk or yogurt and/or 40 g of cheese (two thin slices or one thick slice) daily? / Bebes diariamente two copos de leite/iogurtes ou comes diariamente 1 fatia grande de queijo?	47.7	52.3	36.0	64.0	0.042*
16. Do you consume sweets or treats several times a day? / Comes doces e guloseimas várias vezes ao dia?	22.7	77.3	29.7	70.3	0.17

* $p < 0.05$; Qui-square test / $p < 0,05$ Teste do Qui-quadrado

In Table 2 we present the distribution of student responses to the KIDMED index by sex. In general, most students consumed: at least one piece of fruit or fruit juice per day, fresh or cooked vegetables at least once a day, pulses (legumes) more than once a week, fish regularly, and used olive oil at home. Most students indicated they had the habit of having breakfast, in addition to consuming both dairy products and cereals or similar (bread, etc.). However, low consumption of

Na Tabela 2 apresentamos a distribuição das respostas dos alunos ao índice KIDMED por sexo. Em geral, a maioria dos estudantes consumia pelo menos uma peça de fruta ou um sumo de fruta por dia, hortícolas frescos ou cozidos pelo menos uma vez ao dia, leguminosas mais de uma vez por semana, pescado regularmente, e utilizava azeite em casa. Quanto ao pequeno-almoço, verificou-se que a maioria dos alunos tinha o hábito de realizar esta refeição, além de consumir tanto laticínios

oleaginous fruits was reported, and on the other hand a high consumption of fast food, more than once a week, and of pastries (cookies, croissants, cakes, etc.) and sweets several times a day. Compared with females, males had a higher prevalence of consumption of fruits, cereals, or derivatives (bread, etc.) for breakfast, oleaginous fruits, yogurts, and/or cheese. The total mean KIDMED score was 5.59 (standard deviation: 2.06) points. In terms of the prevalence of adherence to the MFP, 14.9% had low adherence, 64.4% had intermediate adherence, and 20.8% had high adherence.

Table 3 presents the relationships between sociodemographic characteristics and levels of adherence to the MFP. In general, it appears that most students have an intermediate level of adherence to the MFP. The number of household members and the number of children positively influence the level of adherence to MFP. In addition, students who usually help their parents to maintain a vegetable garden had a higher level of adherence to MFP compared to those who do not. There was no relationship between adherence to MFP and sex, age, city and zone of residence, having a vegetable garden, or weight status.

Discussion

This cross-sectional study aimed, firstly, to evaluate the level of adherence to MFP in students of the 3rd cycle of basic education on Terceira Island, and secondly, to study the relationship between adherence to MFP and sociodemographic factors and their weight status.

Regarding weight status, a prevalence of 33.0% of excess weight was found. This value is close to that found in a study with young students from the Algarve (29.4%), but higher than the value found in a study conducted in 17 Portuguese cities (Aveiro, Braga, Coimbra, Évora, Faro, Figueira da Foz, Funchal, Guimarães, Leiria, Lisboa, Mirandela, Porto, Viana do Castelo, Vila Real, Viseu) (15) and is above the national average (10).

Most students do not consume oleaginous fruits at least 2 to 3 times a week, so their consumption should be encouraged. Nuts are excellent sources of mono unsaturated and polyunsaturated fats (such as omega-3 fatty acids), vitamins (vitamin E and folic acid), minerals, fiber, and substances with antioxidant properties (16). These foods can be a good option for an intermediate meal, and their consumption is associated with benefits in the prevention of cardiovascular

quanto cereais ou derivados (pão etc.). No entanto, foi reportado um baixo consumo de frutos oleaginosos, e por outro lado um elevado consumo de fast food, mais de uma vez por semana, e de produtos de pastelaria (bolachas, croissants, bolos, etc.) no pequeno-almoço e consumo de doces ou guloseimas várias vezes por dia. Quando comparados com as raparigas, os rapazes apresentaram maior prevalência de consumo de frutas, cereais ou derivados (pão, etc.) ao pequeno-almoço, frutos oleaginosos, iogurtes e/ou queijo. A média total da pontuação do KIDMED foi de 5,59 (desvio-padrão: 2,06) pontos. Em termos de prevalência da adesão ao PAM, 14,9% tinha uma baixa adesão, 64,4% tinha uma adesão intermédia, e 20,8% tinha uma alta adesão.

Na Tabela 3 são apresentadas as relações entre as características sociodemográficas e níveis de adesão à Dieta Mediterrânica. Em geral, verifica-se que a maioria dos alunos apresenta um nível intermediário de adesão ao PAM. O número de membros do agregado familiar e o número de crianças influenciam positivamente o nível de adesão ao PAM. Além disso, os alunos que costumam ajudar os pais a cuidar da horta apresentaram maior nível de adesão ao PAM em comparação aos que não o fazem. Não se verificou uma relação entre a adesão ao PAM com o sexo, idade, cidade e zona de residência, ter uma horta, nem com o estado ponderal.

Discussão

Este estudo transversal pretendeu em primeiro lugar, avaliar o nível de adesão ao PAM em alunos do 3º ciclo do ensino básico da Ilha Terceira, e em segundo lugar, estudar a relação da adesão ao PAM com fatores sociodemográficos e o estado ponderal dos mesmos.

Em relação ao estado ponderal, foi encontrada uma prevalência de 33,0% de excesso de peso (pré-obesidade e obesidade). Este valor aproxima-se do encontrado num estudo com jovens estudantes do Algarve (29,4%), mas superior ao valor encontrado num estudo realizado em 17 cidades portuguesas (Aveiro, Braga, Coimbra, Évora, Faro, Figueira da Foz, Funchal, Guimarães, Leiria, Lisboa, Mirandela, Porto, Viana do Castelo, Vila Real, Viseu) (15) e superior à média nacional (10).

A maioria dos estudantes não consome frutos oleaginosos pelo menos 2 a 3 vezes por semana, pelo que o seu consumo deve ser incentivado. Os frutos oleaginosos são excelentes fontes de gorduras monoinsaturadas e poliinsaturadas (como ácidos gordos ómega-3), vitaminas (vitamina E e ácido fólico), minerais, fibras

Table 3 - Relation between sociodemographic variables and levels of adherence to the Mediterranean Diet.
Tabela 3 – Relação entre variáveis sociodemográficas e níveis de adesão à Dieta Mediterrânea.

	Adherence to the Mediterranean Food Pattern / Adesão ao Padrão Alimentar Mediterrânico (%)			p *
	Low adhesion / Baixa adesão	Intermediate adhesion / Adesão intermédia	High adhesion / Alta adesão	
Sex / Sexo (n=303) ^a				
Female / Feminino	8.9	38.0	10.9	0.156
Male / Masculino	5.9	26.4	9.9	
Age / Idade (n=303) ^b				
11-13 years / anos	4.6	21.1	5.6	0.553
14-16 years / anos	9.6	41.6	14.5	
> 16 years / anos	0.7	1.7	0.7	
City / Cidade (n=303) ^a				
Angra do Heroísmo	10.2	47.2	15.8	0.822
Praia da Vitória	4.6	17.2	5.0	
Residence zone / Zona de residência (n= 303) ^a				
Rural / Rural	12.9	54.5	17.5	0.484
Urban / Urbana	2.0	9.9	3.3	
Number of household members / Número de elementos do agregado familiar (n=303) ^b				
Two / Dois	0.3	3.0	0.3	r: 0.149 p: 0.010*
Three / Três	5.0	14.9	3.0	
Four / Quatro	5.0	28.7	9.2	
Five or more / Cinco ou mais	5.0	17.5	8.3	
Number of children in the household / Número de crianças do agregado familiar (n=302) ^b				
One / Uma	7.9	31.1	6.6	r: 0.163
Two / Duas	5.6	25.2	9.6	
Three or more / Três ou mais	1.3	7.9	4.6	p: 0.005*
Existence of a vegetable garden in the current residence / Existência de horta na residência atual (n=303) ^a				
No / Não	5.0	21.5	4.3	0.082
Yes / Sim	9.9	42.9	16.5	
If yes, usually helps to take care of the garden / Se sim, costuma ajudar a cuidar da horta (n=202) ^a				
No / Não	8.9	24.3	5.0	<0.001*
Yes / Sim	4.0	38.1	19.8	
Weight Status (n=303) ^a				
Underweight or normal weight/ Baixo peso ou normoponderal	10.2	42.6	14.2	0.739
Pre-obesity or obesity / Pré-obesidade ou obesidade	4.6	21.8	6.6	
KIDMED category / Classificação KIDMED	14.9	64.4	20.8	

* $p < 0.05$ / $p < 0,05$; ^a Mann Whitney test / Teste de Mann Whitney; ^b Spearman correlation / correlação de Spearman

diseases (17). It is also worth noting that consuming fast food more than once a week, eating confectionery or pastry products for breakfast, and eating sweets or treats several times a day should be discouraged. These foods are high in simple sugars, salt, and saturated fats (18), and their excessive consumption is associated with several chronic diseases and overweight (19-21).

e substâncias com propriedades antioxidantes (16). Esses alimentos podem ser uma boa opção para uma refeição intermédia, e o seu consumo está associado a benefícios na prevenção de doenças cardiovasculares (17). Vale ainda destacar que o consumo de fast food mais de uma vez por semana, a utilização de produtos de confeitaria ou pastelaria ao pequeno-almoço, e comer doces ou guloseimas várias vezes ao dia, deve ser

In our study, there was a higher prevalence of an intermediate level of adherence to the MFP, which is in agreement with other studies on Portugal's mainland. In the study by Barbosa (22) published in 2012, an average adherence to MFP of 7.19 (SD = 2.04) was found in 212 7th grade students who attended a school in Braga, while the average was found on Terceira Island was 5.59 (SD = 2.06) points. In another study in northern Portugal involving 166 children from two primary schools in Póvoa de Lanhoso (23), 61.4% of "high adherence" to MFP was reported at 61.4%, while we found only 20.8% on Terceira Island. Alves (24), in their study carried out in Vila Real, which involved 281 secondary schools, students reported a median of 4 points of adhesion to the MFP, that is, lower than the average we found on Terceira Island. In Guimarães, in a study (25) with 464 students in the 1st cycle of basic education, a prevalence of intermediate adherence to the MFP was found (69.1%), slightly higher than that found on Terceira Island.

Concerning the central region of Portugal, in a study by Vaquinhas et al. (26) including 98 children from the 2nd cycle of basic education in a school in Coimbra, there was a high level of adherence to the MFP (85.7%), much higher than that found on Terceira Island. Another study (27) with 3995 children and adolescents aged 2 to 21 years old from Santarém and Alpiarça reported a high level of adherence to MFP (62.0%), higher than that found on Terceira Island.

The intermediate level of adherence to MFP found on Terceira Island is similar to that found in another study, which was carried out in Tavira with 1952 young people, aged between 3 and 19 years old (28). In our study, however, the percentage of high adherence to MFP in our study is lower than their reported 24.4%. Further, if we compare our results with the study of Mateus & Graça, also conducted in the Algarve region, the high adherence reported in our study is much lower than their reported 52.5% (12). Finally, in a study including 223 children and young people aged between 6 and 16 years old from a basic school in Funchal (Madeira), high adherence to the MFP was reported by more than 50% of the participants (29).

desincentivado. Estes alimentos são ricos em açúcares simples, sal e gorduras saturadas (18), e o seu consumo excessivo está associado a diversas doenças crónicas e excesso de peso (19-21).

No nosso estudo verificou-se uma maior prevalência de um nível intermédio de adesão ao PAM, o que está de acordo com outros estudos em Portugal Continental. No estudo de Barbosa (22) publicado em 2012, foi encontrada uma média de adesão ao PAM de 7,19 (DP = 2,04) em 212 alunos do 7º ano que frequentavam uma escola de Braga enquanto a média encontrada na Ilha Terceira foi de 5,59 (DP = 2,06) pontos. Em outro estudo (23), também no norte de Portugal, que envolveu 166 crianças de duas escolas primárias da Póvoa de Lanhoso, foram encontrados 61,4% de "alta adesão" ao PAM, enquanto na Ilha Terceira havia apenas 20,8%. Alves (24), no seu estudo realizado em Vila Real, que envolveu 281 escolas secundárias, os alunos referiram uma mediana de 4 pontos de adesão ao PAM, ou seja, inferior à média encontrada na Ilha Terceira. Em Guimarães, num estudo (25) com 464 alunos do 1.º ciclo do ensino básico, foi encontrada uma prevalência de adesão intermédia ao PAM (69,1%), ligeiramente superior à encontrada na ilha Terceira.

No que diz respeito à região centro de Portugal, no estudo de Vaquinhas et al. (26), que envolveu 98 crianças do 2º ciclo do ensino básico numa escola de Coimbra, encontrou-se uma elevada adesão ao PAM (85,7%), muito superior à encontrada na Ilha Terceira. Outro estudo (27) com 3995 crianças e adolescentes dos 2 aos 21 anos de Santarém e Alpiarça reportou uma adesão elevada ao PAM (62,0%), superior à encontrada na ilha Terceira.

O nível de adesão intermédia ao PAM encontrado na ilha Terceira é semelhante ao encontrado noutro estudo, que foi realizado em Tavira com 1952 jovens, com idades compreendidas entre os 3 e os 19 anos (28). No entanto, ao comparar a percentagem de alta adesão ao PAM no nosso estudo com esse (24,4%) verifica-se que, em nosso estudo, esta é menor. E se compararmos os nossos resultados com os de outro estudo também realizado na região do Algarve (52,5%) (12), nota-se que, em nosso estudo, a adesão ao PAM é muito menor. Por fim, num estudo realizado no arquipélago da Madeira com 223 crianças e jovens de uma escola básica do Funchal, com idades compreendidas entre os 6 e os 16 anos, foi reportada uma elevada adesão ao PAM para mais de 50% dos participantes, o que é superior ao encontrado na Ilha Terceira (29).

The adherence to MFP among students from Terceira Island is lower than that found in other regions of the country. Thus, it is recommended that measures be taken to increase this adherence, taking into account the benefits in health promotion and disease prevention associated with MFP (as described above).

No projects/initiatives were found with the specific purpose of increasing adherence to the MFP in the Azores, however, indirectly we can highlight the participation of some educational establishments in the EcoEscolas project (with national scope), which aims to encourage the development of activities, to improve the environmental performance of schools, and find solutions to improve the quality of life at school and in the community (30). Some of these activities are related to healthy and sustainable food, with an emphasis on the Mediterranean diet. However, on Portugal's mainland, there are other projects/initiatives involving schools that deserve to be highlighted, namely the "Eat Mediterranean: A program to reduce nutritional inequalities in school meals" (2015-2017) (31), and the MEDITA project "Mediterranean Diet promotes health" (2017-2020) (32) which aims to promote healthier lifestyle habits in young people in the Algarve region in children and adolescents in the Andalusian region, based on the concept of the Mediterranean Diet.

In this way, food education projects could be developed aimed at students in the 3rd cycle of basic education to promote adherence to the MFP, for example, cooking workshops, associated with pedagogical vegetable gardens, video viewing, or participation in debates, and these could also be extended to the rest of the school community. Improving the (school) food supply, namely the nutritional quality of canteen/buffet meals and vending machines following MFP principles (excluding wine) could also be a strategy to be adopted.

It is also important to note that our study has some limitations, including the fact it is limited to Terceira Island and thus it is not representative of MFP adherence within the Azorean archipelago. In addition, its transversal design does not allow the extrapolation of its results. Moreover, the questionnaires were completed by the students and, although they had the opportunity to clarify any doubts they may have, they may present some bias. On the other hand, the participants cover the entire Terceira Island, with five of the seven schools

A adesão ao PAM nos estudantes da Ilha Terceira é inferior ao encontrado em outras zonas do país. Assim, recomenda-se que se tomem medidas que aumentem esta adesão, tendo em conta os benefícios na promoção de saúde e prevenção de doenças associadas ao PAM (como descrito anteriormente).

Não foram encontrados projetos/ iniciativas com a finalidade específica de aumentar a adesão ao PAM nos Açores, contudo, de forma indireta podemos destacar a participação de alguns estabelecimentos de ensino no projeto EcoEscolas (de abrangência nacional) que pretende encorajar o desenvolvimento de atividades, com o intuito de melhorar do desempenho ambiental das escolas e encontrar soluções que permitam melhorar a qualidade de vida na escola e na comunidade (30). Algumas destas atividades estão relacionadas com a alimentação saudável e sustentável, com destaque para a dieta mediterrânica. Contudo, em Portugal Continental existem outros projetos/ iniciativas que envolvem escolas e que merecem destaque, nomeadamente o "Eat Mediterranean: Um programa para reduzir desigualdades nutricionais em refeições escolares" (2015-2017) (31), e o projeto MEDITA "Dieta Mediterrânica promove saúde" (2017-2020) que tem como objetivos a promoção de hábitos de vida mais saudáveis nos jovens da região do Algarve nas crianças e jovens da Região da Andaluzia, tendo por base o conceito da Dieta Mediterrânica (32).

Deste modo, poderiam ser desenvolvidos projetos de educação alimentar dirigidos aos estudantes do 3.º ciclo do ensino básico, que promovessem a adesão ao PAM, por exemplo, workshops de culinária, associadas a hortas pedagógicas, visualização de vídeos ou participação em debates; mas que também poderiam ser alargados à restante comunidade escolar. A melhoria da oferta alimentar, nomeadamente da qualidade nutricional das refeições da cantina/ refeitórios e das máquinas de venda automática de acordo com os princípios do PAM (excluindo o vinho) também poderia ser uma estratégia a ser adotada.

Importa ainda realçar que o nosso estudo apresenta algumas limitações, como o facto de não ser representativo da adesão ao PAM no arquipélago dos Açores, uma vez que se encontra circunscrito à Ilha Terceira. Além disso o seu desenho transversal não permite a extrapolação dos seus resultados. Ademais, os questionários foram preenchidos pelos alunos e, embora tenham tido a oportunidade de esclarecer quaisquer dúvidas que possam ter, podem apresentar algum viés. Por outro lado, os participantes abrangem toda a ilha Terceira, com cinco das sete escolas com 3º ciclo do

with the 3rd cycle of basic education participating in the study. Therefore, we have a representative sample of the island, distributed among its two municipalities. To our knowledge, this is the first study conducted in the Azores archipelago that evaluated adherence to MFP in such a young age group, only one study (33) conducted in 2008 evaluated adherence to MFP among adolescents (15 to 18 years), and the prevalence of high adherence to MFP found was similar to that in our study. It is important to emphasize that the results presented here can also serve as a point of comparison and support for future interventions to promote MFP. In addition, they can be used to develop food education interventions on this topic that are better adapted to the characteristics of students in the 3rd cycle of basic education on the island of Terceira.

Conclusion

The high prevalence of overweight (pre-obesity and obesity) and the low "high" adherence to MFP reveals the need to promote adherence to this food pattern in this population. Therefore, we emphasize that collaboration between the health and education sectors is extremely important for the promotion of healthy eating. The school thus appears as an ideal environment to educate for this purpose, as well as for the creation of healthy eating habits at an early age. The results presented may be useful for future community interventions designed to promote healthier eating habits.

Authors Contributions Statement

LO, FS, and MGS, conceptualization and study design; LO, experimental implementation; LO, data analysis; LO, drafting, editing and reviewing; LO, tables; LO, FS and MGS, supervision and final writing.

uma amostra representativa da ilha, distribuída pelos seus dois municípios. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo realizado no arquipélago dos Açores que avaliou a adesão ao PAM numa faixa etária tão jovem, apenas um estudo (33) realizado em 2008 avaliou a adesão ao PAM entre adolescentes (15 a 18 anos). A prevalência de alta adesão ao PAM encontrada nesse estudo é semelhante à encontrada em neste. Importa realçar que os resultados aqui apresentados podem, ainda, servir de ponto de comparação e de suporte para futuras intervenções com vista à promoção do PAM. Além disso, podem servir para o desenvolvimento de intervenções de educação alimentar nesta temática mais bem-adaptadas às características dos estudantes do 3º ciclo do ensino básico da ilha Terceira.

Conclusões

A alta prevalência de excesso de peso (pré-obesidade e obesidade) e a baixa "alta" adesão ao PAM revela a necessidade de promover a adesão a este padrão alimentar nesta população. Portanto, realçamos que a colaboração entre os setores de saúde e educação é de extrema importância para a promoção da alimentação saudável. A escola surge, assim, como um ambiente ideal para educar para tal fim, bem como para a criação de hábitos alimentares saudáveis em idade precoce. Os resultados apresentados podem ser úteis para futuras intervenções comunitárias que visem a promoção de hábitos alimentares mais saudáveis.

Declaração sobre as contribuições do autor

LO, FS e MGS, conceção e desenho do estudo; LO, implementação experimental; LO, análise de dados; LO, redação, edição e revisão; LO, tabelas; LO, FS e MGS, supervisão e redação final.

Funding

This study was supported by the Calouste Gulbenkian Foundation, under the contest "Literacy in Health 2014 — Citizens and Health: improving information, improving decision-making" within the scope of the project "Health-promoting foods in a school context - more knowledge, better growth".

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to all participants.

Conflict of Interests

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

Financiamento

Este trabalho é financiado pela Fundação Calouste Gulbenkian, ao abrigo do concurso "Literacia em Saúde 2014 — Os Cidadãos e a Saúde: melhorar a informação, melhorar a decisão" no âmbito do projeto "Alimentos promotores de saúde em contexto escolar – mais conhecimento melhor crescimento".

Agradecimentos

Os autores desejam expressar os seus agradecimentos a todos os participantes.

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. Helena, R., & Pedro, G. (2019). Marcos da história da Dieta Mediterrânica, desde Ancel Keys. *Acta Portuguesa de Nutrição*, 17, 06-14, <https://dx.doi.org/10.21011/apn.2019.1702>
2. Guasch-Ferré, M., & Willett, W. C. (2021). The Mediterranean diet and health: a comprehensive overview. *Journal of Internal Medicine*, 290(3), 549-566. doi:10.1111/joim.13333
3. Echeverría, G., Dussallant, C., McGee, E., Urquiaga, I., Velasco, N., & Rigotti, A. (2017). Mediterranean Diet beyond the Mediterranean Basin: Chronic Disease Prevention and Treatment. In B. Fuerst-Bjelis (Ed.) *Mediterranean Identities - Environment, Society, Culture*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/66587>
4. D'Innocenzo, S., Biagi, C., & Lanari, M. (2019). Obesity and the Mediterranean Diet: A Review of Evidence of the Role and Sustainability of the Mediterranean Diet. *Nutrients*, 11(6), 1306. doi:10.3390/nu11061306
5. Martínez-González, M. A., Gea, A., & Ruiz-Canela, M. (2019). The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health. *Circulation Research*, 124(5), 779-798. doi:10.1161/circresaha.118.313348
6. Martín-Peláez, S., Fito, M., & Castaner, O. (2020). Mediterranean Diet Effects on Type 2 Diabetes Prevention, Disease Progression, and Related Mechanisms. A Review. *Nutrients*, 12(8), 2236. doi:10.3390/nu12082236
7. Di Daniele, N., Noce, A., Vidiri, M. F., Moriconi, E., Marrone, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., . . . De Lorenzo, A. (2017). Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget*, 8(5), 8947-8979. doi:10.18632/oncotarget.13553
8. Dominguez, L. J., Di Bella, G., Veronese, N., & Barbagallo, M. (2021). Impact of Mediterranean Diet on Chronic Non-Communicable Diseases and Longevity. *Nutrients*, 13(6), 2028. doi:10.3390/nu13062028
9. Gregório, M. G., Sousa, S. M., Chkoniya, V., & Graça, P. (2020). *Estudo de adesão ao padrão alimentar Mediterrânico*. Direção-Geral da Saúde: Lisboa.
10. World Health Organization. (2022). *WHO European Regional Obesity Report 2022*. <https://www.who.int/europe/publications/i/item/9789289057738>
11. Aparício, G. (2016). Ajudar a desenvolver hábitos alimentares saudáveis na infância. *Millenium - Journal of Education, Technologies, and Health*, 38, 283-298. <https://revistas.rcaap.pt/millenium/article/view/8263>
12. Mateus, P., & Graça, P. (2014). Adesão ao padrão alimentar mediterrânico em jovens no Algarve. In A. Romano (Ed.), *A Dieta Mediterrânica em Portugal: Cultura, Alimentação e Saúde* (pp. 317-330). Faro: Universidade do Algarve.
13. de Onis, M., Onyango, A. W., Borghi, E., Siyam, A., Nishida, C., & Siekmann, J. (2007). Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bulletin of the World Health Organization*, 85(9), 660-667. doi:10.2471/BLT.07.043497
14. 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
15. Prazeres, T., & Fonseca, L. J. (2010). Rastreio da obesidade infantil – três anos de jornadas nacionais. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 41(3), 122-126.
16. Alasalvar, C., Salvadó, J. S., & Ros, E. (2020). Bioactives and health benefits of nuts and dried fruits. *Food Chemistry*, 314, 126192. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126192
17. Martin, N., Germano, R., Hartley, L., Adler, A. J., & Rees, K. (2015). Nut consumption for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 9, Cd011583. doi:10.1002/14651858.CD011583.pub2
18. Albuquerque, T. G., Santos, J., Silva, M. A., Oliveira, M. B. P. P., & Costa, H. S. (2018). An update on processed foods: Relationship between salt, saturated and trans fatty acids contents. *Food Chemistry*, 267, 75-82. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.029>
19. Cappuccio, F. P., Beer, M., & Strazzullo, P. (2018). Population dietary salt reduction and the risk of cardiovascular disease. A scientific statement from the European Salt Action Network. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.11.010>
20. Chi, D. L., & Scott, J. M. (2019). Added Sugar and Dental Caries in Children: A Scientific Update and Future Steps. *Dental Clinics of North America*, 63(1), 17-33. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cden.2018.08.003>
21. Neuhauser, M. L. (2018). The importance of healthy dietary patterns in chronic disease prevention. *Nutrition Research*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.06.002>
22. Barbosa, S. M. (2012). *Efeito combinado da adesão à dieta mediterrânica e da aptidão cardiovascular no desempenho académico. Um estudo em adolescentes do 7.º ano de escolaridade*. (Relatório de estágio do Mestrado em Ensino de Educação Física nos Ensinos Básico e Secundário). Universidade do Minho, Braga.
23. Almeida, A. (2012). *Adesão ao padrão alimentar mediterrânico e associação ao estado nutricional em crianças das escolas de 1º ciclo da Póvoa de Lanhoso*. (Trabalho de Investigação da Licenciatura em Ciências da Nutrição) Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Porto.
24. Alves, C. (2012). *Caracterização sociodemográfica e comportamental de um Padrão Alimentar Saudável: aplicação do Kidmed a Adolescentes (15-18 anos) de um meio rural*. (Trabalho de Investigação da Licenciatura em Ciências da Nutrição). Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Porto.
25. Albuquerque, G., Moreira, P., Rosário, R., Araújo, A., Teixeira, V. H., Lopes, O., . . . Padrão, P. (2017). Adherence to the Mediterranean diet in children: Is it associated with economic cost? *Porto Biomedical Journal*, 2(4), 115-119. doi:10.1016/j.pbj.2017.01.009
26. Vaquinhas, M., Carlos, F., Martins, I., Oliveira, R., Cancela, V., & Lara, L. (2015). *Padrão Alimentar Mediterrânico numa população escolar*. Paper presented at the XV Jornadas da Fundação Portuguesa de Cardiologia - Delegação Centro, Coimbra.
27. Rito, A., Rosa, L., Rascoa, C., & Dinis, A. (2017). The mediterranean diet quality index (KIDMED) in children and adolescents: Eat Mediterranean Program. *Acta Portuguesa de Nutrição*, 9 (Resumos Posters | XVI Congresso de Nutrição e Alimentação, 04 e 05 De Maio, 2017), 55.
28. Santos, P. (2003). *A qualidade da dieta mediterrânea numa população jovem do sul de Portugal*. (Monografia da Licenciatura em Ciências da Nutrição). Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Porto..
29. Sousa, B., & António, C. (2015). *Adesão ao padrão alimentar mediterrânico em crianças e jovens dos 6 aos 16 anos de idade do concelho do funchal*. Paper presented at the XVI Congresso Português de Endocrinologia/66ª Reunião Anual da SPEDM, Funchal.
30. ABAE. (2022). EcoEscolas. <https://ecoescolas.abae.pt/>
31. Ana Isabel, R., Ana, D., Carla, R., Susana, R., Camila, S.-N., Sofia, M., . . . Ricardo, L. (2018). Avaliação e promoção da qualidade alimentar e nutricional de refeições escolares portuguesas – Programa Eat Mediterranean. *Acta Portuguesa de Nutrição*(12), 06-12. doi:<https://dx.doi.org/10.21011/apn.2018.1202>
32. MEDITA. (2017). Projeto MEDITA "Dieta Mediterrânica Promove Saúde". <https://www.projetededita.eu/>
33. Figueiredo, A., Lopes, L., Moreira, C., Agostinis, C., Santos, J., Mota, J., . . . Abreu, S. (2017). Relationship between mediterranean diet adherence and cardiometabolic risk factors in azorean adolescents. *Acta Portuguesa de Nutrição*, 9 (Resumos Posters | XVI Congresso de Nutrição e Alimentação, 04 e 05 De Maio, 2017), 55.

Supplementation with *Moringa oleifera* leaves flour prevents fructose-based metabolic disorders in young rats

Suplementação de farinha de folhas de Moringa oleifera previne distúrbios metabólicos induzidos pela frutose em ratos jovens

Izabel Carolina Bousfield Terranova¹, Isabelle Coelho Souza², Isadora Simas Ribeiro², Milena Fronza Broering¹, Aline De Faveri¹, Marina Jagielski Goss¹, Ana Mara de Oliveira Silva³, Rivaldo Niero¹, Eduardo Augusto Steffens¹, Larissa Benvenuti¹, Luciano Vitali⁴, Samantha Gonçalves⁴, Isabel Daufenback Machado⁵, Nara Lins Meira Quintão¹, José Roberto Santin^{1*}

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Science, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, Brazil; ²School of Health Sciences, Nutrition Course, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, Brazil.; ³Nutrition Department (DNUT), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil; ⁴Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil;

⁵Postgraduate Program in Biodiversity, Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brazil

corresponding author / autor para correspondência: jrs.santin@univali.br

Abstract

Moringa oleifera leaves flour is amply used to treat metabolic conditions. The aim was to assess the *M. oleifera* flour (MOF) on metabolic changes induced by fructose. Phenolic compounds were determined by LC-ESI-MS/MS. Wistar rats were distributed in groups: 1) Control (normal-chow + water); 2) Fructose (normal-chow + fructose (20%) in water) and 3) Feed with MOF20% + fructose (20%) in water. At the end of the 4th week of treatment, the animals were submitted to insulin resistance (IR) test, blood collection and histological evaluation. MOF contains phenolic compounds such as quercetin and chlorogenic acid. MOF supplementation promotes reduction in glycemia, insulin, triglycerides. The supplementation improved the insulin sensitivity. In the histological analysis, MOF supplementation reduced the adipocyte hypertrophy and the lipid deposition in the liver. The data obtained showed that MOF supplementation presented a protective effect against the harmful consequences of excessive fructose consumption.

Keywords: *Moringa oleifera*, metabolic syndrome, diabetes, fructose, mice

Resumo

A farinha de folhas de *Moringa oleifera* é amplamente utilizada para tratar condições metabólicas. O objetivo foi avaliar o efeito da farinha de *M. oleifera* (MOF) sobre as alterações metabólicas induzidas pela frutose. Os compostos fenólicos foram determinados por LC-ESI-MS/MS. Ratos Wistar foram distribuídos em grupos: 1) Controle (ração normal + água); 2) Frutose (ração normal + frutose (20%) em água) e 3) Alimentação com MOF20% + frutose (20%) em água. Ao final da 4ª semana de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de resistência à insulina (RI), coleta de sangue e avaliação histológica. MOF possui compostos fenólicos como quercetina e ácido clorogênico. A suplementação com MOF promove redução na glicemia, insulina, triglicerídeos. A suplementação melhorou a sensibilidade à insulina. Na análise histológica, a suplementação com MOF reduziu a hipertrofia dos adipócitos e a deposição de lipídios no fígado. Os dados obtidos mostraram que a suplementação com MOF apresentou efeito protetor contra as consequências nocivas do consumo excessivo de frutose.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*, síndrome metabólica, diabetes, frutose, ratos

Introduction

Fructose is a common type of sugar in the American diet. A major source of fructose is high fructose corn syrup (HFCS), an inexpensive substitute for cane sugar that was introduced in the 1970s. It is now used to sweeten a variety of foods, including soda, candy, baked goods, and cereals. Studies in humans have linked excessive consumption of HFCS and other added sugars leads to insulin resistance, lipid abnormalities, obesity, hypertension, and renal dysfunction health (1,2). High fructose intake was associated with higher blood pressure and uric acid concentrations among adults in the United States without a history of hypertension. Furthermore, the same metabolic disease prevalence has been observed in younger population, as well as in children (2).

Fructose is metabolized mainly in hepatocytes by fructokinase that rapidly phosphorylates fructose to generate fructose-1-phosphate (2). The metabolism pathway consists of various other steps, resulting in primary metabolites and secondary products including glucose, lactate, free fatty acid, very low-density lipoprotein (VLDL) and uric acid (3).

Moringa oleifera Lam. is a specie within the Moringaceae family, commonly known as Moringa. The flour produced from its leaves is amply used in folk medicine to treat diabetes and other metabolic conditions. In fact, the Moringa leaves are the most used part of the plant, and present a great number of bioactive compounds, mainly phenolic compounds, such as quercetin, chlorogenic acid and caffeic acid (4).

M. oleifera has been extensively studied *in vivo* in several conditions, as it may provide hepatoprotective (5) and hypoglycemic (6,7) effects (8), be protective against diet-induced metabolic diseases (9), and have anti-obesity and *in vitro* antioxidant effects (10).

Flavonoids and saponins present in the plant are reported to increase HDL (High Density Lipoprotein) and to reduce total cholesterol, LDL (Low Density Lipoprotein), and VLDL cholesterol (11). Phytocompounds phenolic acids, including chlorogenic acid (CGA) identified in *M. oleifera* leaves (12), have been shown to have antioxidant and anti-hyperglycemic properties (13–15).

Introdução

A frutose é um tipo comum de açúcar na dieta americana. Uma das principais fontes de frutose é o xarope de milho rico em frutose (HFCS), um substituto barato para o açúcar de cana que foi introduzido na década de 1970. Agora é usado para adoçar uma variedade de alimentos, incluindo refrigerantes, doces, assados e cereais. Estudos associaram o consumo excessivo de HFCS e outros açúcares adicionados a resistência à insulina, anormalidades lipídicas, obesidade, hipertensão e disfunção renal (1,2). A alta ingestão de frutose foi associada a elevação da pressão arterial e concentrações de ácido úrico entre adultos nos Estados Unidos sem histórico de hipertensão. Além disso, a mesma prevalência de doença metabólica tem sido observada na população mais jovem, bem como em crianças (2).

A frutose é metabolizada principalmente nos hepatócitos pela frutosequinase que fosforila rapidamente a frutose para gerar frutose-1-fosfato (2). A via do metabolismo consiste em várias outras etapas e os resultados são metabólitos primários e produtos secundários, incluindo glicose, lactato, ácidos graxos livres, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e ácido úrico (3).

Moringa oleifera Lam. é uma espécie pertencente à família Moringaceae, comumente conhecida como Moringa. A farinha produzida a partir de suas folhas é amplamente utilizada na medicina popular para tratar diabetes e outras doenças metabólicas. De fato, as folhas da Moringa são a parte mais utilizada da planta, que apresenta um grande número de compostos bioativos, principalmente compostos fenólicos, como quercetina, ácido clorogênico e ácido cafeico (4).

M. oleifera tem sido extensivamente estudada *in vivo* em várias condições, pois pode fornecer efeito hepatoprotetor (5), hipoglicêmico (6,7,8), protetor contra doenças metabólicas induzidas por dieta (9), anti-obesidade e efeito antioxidante *in vitro* (10).

Flavonoides e saponinas presentes na planta são relatados para aumentar o HDL (lipoproteína de alta densidade) e reduzir o colesterol total, LDL (lipoproteína de baixa densidade) e colesterol VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) (11). Os ácidos fenólicos, incluindo o ácido clorogênico (CGA) identificado nas folhas de *M. oleifera* (12), demonstrou apresentar propriedades antioxidantes e anti-hiperglicêmicas (13–15).

Considering the increased prevalence of diet-induced metabolic dysfunction by fructose consumption, this study was designed to investigate the phenolic compounds in *Moringa oleifera* leaf flour (MOF) and the protective effects of the oral supplementation of MOF on initial metabolic changes induced by fructose consumption in young rats.

Material and Methods

Sample

The *M. oleifera* flour obtained from leaves (MOF) was purchased from an industry in São Paulo, SP, Brazil (registration number 0111.0820.08R-1). The flour was kept in the refrigerator at 4°C in dark hermetically sealed jars throughout the period of the experiment. To produce the extract, the flour (200 g) was subjected to static maceration in methanol for 7 days, and was then subject to phytochemical profile analysis.

Identification of phenolic compounds by LC-ESI-MS/MS

The analysis was performed in a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Agilent Technologies, Germany) and a Phenomenex® Synergi 4 µ Polar-RP 80A column (150 mm x 2 mm ID, particle size of 4.6 µm) at a temperature of 30 °C. The mobile phase used was composed of solvent A (95% methanol in water) and solvent B (0.1% formic acid in water). The separations were conducted using segmented elution gradient as follows: 0–5 min, 10% A; 5–7 min, 90% A; 7–10 min, 90% A; 10–17 min, 10% A. The flow rate and sample injection volume were 250 µL/min and 10 µL, respectively. The LC system was coupled to a mass spectrometry system consisting of a hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (Qtrap® 3200, Applied Biosystems/MDS SCIEX, Waltham, MA, USA, with Turbo Ion Spray® as the ionization source) in negative ionization mode. The MS/MS parameters used were: ion spray interface quadrupole at 400°C; voltage of -4500 V; curtain gas, 10 psi; nebulizer gas, 45 psi; auxiliary gas, 45 psi; collision gas, medium. The Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode was used for analysis. For the identification of phenolic compounds, forty-five standards were dissolved in methanol and analyzed under the same conditions described above. The software Analyst® (version 1.5.1) was used to record and process the data.

Considerando o aumento da prevalência de disfunção metabólica induzida pela dieta pelo consumo de frutose, este estudo foi desenhado para investigar os compostos fenólicos na farinha de folhas de *M. oleifera* (MOF) e os efeitos protetores da suplementação oral de MOF nas alterações metabólicas iniciais induzidas pelo consumo de frutose em ratos jovens.

Material e Métodos

Amostras

A farinha de *M. oleifera* (MOF) obtida a partir das folhas foi adquirida de uma indústria em São Paulo, SP, Brasil (número de registro 0111.0820.08R-1). A farinha foi mantida na geladeira em frascos escuros hermeticamente fechados a 4°C durante todo o período do experimento. Para obtenção do extrato, a farinha (200 g) foi submetida à maceração estática em metanol por 7 dias e depois utilizada para análise fitoquímica.

Identificação de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS

A análise foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Agilent Technologies, Alemanha) e uma coluna Phenomenex® Synergi 4 µ Polar-RP 80A (150 mm x 2 mm ID, tamanho de partícula de 4,6 µm) à temperatura de 30°C. A fase móvel utilizada foi composta por solvente A (95% metanol em água) e solvente B (0,1% ácido fórmico em água). As separações foram realizadas usando gradiente de eluição segmentado como segue: 0-5 min, 10% A; 5-7 min, 90% A; 7-10 min, 90% A; 10-17 min, 10% A. A taxa de fluxo e o volume de injeção da amostra foram 250 µL/min e 10 µL, respectivamente. O sistema LC foi acoplado a um sistema de espectrometria de massa composto por um espectrômetro de massa híbrido triplo quadrupolo/linear ion trap Qtrap® 3200 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Waltham, MA, EUA) com Turbo Ion Spray® como fonte de ionização, no modo de ionização negativa. Os parâmetros MS/MS utilizados foram quadrupolo de interface de spray iônico a 400°C; tensão de -4500 V; gás de cortina, 10 psi; gás nebulizador, 45 psi; gás auxiliar, 45 psi; gás de colisão, médio. O modo Multiple Reaction Monitoring (MRM) foi usado na análise. Para a identificação dos compostos fenólicos, quarenta e cinco padrões foram dissolvidos em metanol e analisados nas mesmas condições descritas acima. O software Analyst® (versão 1.5.1) foi utilizado para registrar e processar os dados.

Antioxidant activity

The determination of reduction potential of the MOF extract was performed by the ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay. Briefly, in a microplate well, 9 µL of extract at concentrations of 3, 10, 30, 100, 300 and 1000 µg/mL or 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (100 µg/mL) were added to 27 µL of distilled water and 270 µL of freshly prepared FRAP solution (acetate buffer pH 3.6 (0.3 mmol/L), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (10 mmol/L) and ferric (FeCl₃)). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min, after which the absorbance was measured at 595 nm. A standard curve for FeSO₄ was plotted and used to calculate the reducing power of the extract.

The antioxidant capacity was measured against the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH). Briefly, a reaction mixture containing 50 µL of MOF extract at 10, 30, 100, 300 and 1000 µg/mL or Trolox (100 µg/mL) added with 150 µL DPPH stock solution (24 µg/mL) were incubated at room temperature in the dark for 30 min and measured at 517 nm. All determinations were accompanied by a control (blank) without the antioxidant samples. The decrease in the absorbance values of the samples was correlated to the control and the percentage of scavenging of the DPPH radical was expressed by the equation: % of scavenging = $((\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$. The results were expressed as percentage of DPPH scavenging activity

Animals and treatment

Male Wistar rats, 21-day-year old, were obtained from the vivarium of the Universidade do Vale do Itajaí. Animals were allowed free access to water and food. The rats were housed in three animals per cage and acclimatized to laboratory conditions (20–23 °C, humidity 60%, 12 h light/dark cycle) for at least one week before each study. All procedures were performed according to the Brazilian Society of Science of Laboratory Animals' guidelines for the proper care and use of experimental animals. All procedures were approved by the local Ethics Committee of the Universidade do Vale Do Itajaí, Brazil (protocol no. 017/17).

All rats were weighed, and the consumption of water and feeds were quantified every two days. Fructose was supplied in the drinking water at a concentration of 20%. Twenty-seven rats were distributed in different groups (n=9): (1) control: water and standard feed; (2) water with 20% fructose solution (w/v, prepared every

Atividade antioxidante

A determinação do potencial redutor do extrato de MOF foi realizada pelo ensaio de poder redutor/antioxidante férrico (FRAP). Resumidamente, em um poço de microplaca, 9 µL de extrato em concentrações de 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL ou ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (100 µg/mL) foram adicionados a 27 µL de água destilada e 270 µL de solução FRAP recém-preparada (tampão acetato pH 3,6 (0,3 mmol/L), 2,4,6-tripiridil-s-triazina (10 mmol/L) e férrico (FeCl₃)). A mistura de reação foi incubada a 37 °C por 30 min. Em seguida, a absorbância foi medida a 595 nm. Uma curva padrão para FeSO₄ foi plotada e usada para calcular o poder redutor do extrato.

A capacidade antioxidante foi avaliada contra o modelo do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Resumidamente, uma mistura de reação contendo 50 µL de extrato de MOF a 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL ou Trolox (100 µg/mL) adicionado com 150 µL de solução estoque DPPH (24 µg/mL) foi incubada à temperatura ambiente no escuro por 30 min e ler a 517 nm. Todas as determinações foram acompanhadas por um controle (em branco) sem as amostras de antioxidantes. A diminuição dos valores de absorbância das amostras foi correlacionada com o controle e a porcentagem de eliminação do radical DPPH foi expressa pela equação: % de eliminação = $((\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade de eliminação de DPPH

Animais e tratamento

Ratos Wistar machos, com 21 dias de idade, foram obtidos do biotério da Universidade do Vale do Itajaí. Os animais tiveram livre acesso a água e comida. Os ratos foram alojados em três animais por gaiola e aclimatados às condições de laboratório (20-23 °C, umidade 60%, ciclo claro/escuro de 12 h) por pelo menos uma semana antes de cada estudo. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório para o cuidado e uso adequado de animais de experimentação. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética local da Universidade do Vale do Itajaí, Brasil (protocolo n° 017/17).

Todos os ratos foram pesados e o consumo de água e ração foi quantificado a cada dois dias. A frutose foi fornecida na água na concentração de 20%. Vinte e sete ratos foram distribuídos em diferentes grupos (n=9): (1) controle: água e ração padrão; (2) água com solução de frutose a 20% (p/v, preparada a cada dois dias) e ração

two days) and normal feed; (3) water with 20% fructose solution and standard feed supplemented with 20% of MOF for four weeks. The methodology concerning the amount of *M. oleifera* flour added to chow was based on previous work with flour of vegetable products (16,17), and the amount of fructose supplemented in water was proposed by Mamikutty *et al.* (2014) (18).

Abdominal circumference

The abdominal circumference of animals was measured at the beginning of the experiment and at the end of the fourth week. The measurement was performed with the animal in the prone position with a tape measure in the region corresponding to the line above the iliac crest. The initial and final measurements were considered in the calculation of the percentage of increase in abdominal circumference.

Insulin Resistance Test (IRT)

The ITT was performed using a method previously described for rats (19). The food was removed from the cages at 08:00 a.m. on the study day, and the procedure was initiated at 1:00 p.m. Human insulin (Humulin[®]) was administered intraperitoneally in rats at a dose of 0.75 U/kg body weight. Tail blood was collected at 0 (before insulin infusion), 30, 60, 90, and 120 min (post infusion). Blood glucose levels were measured with a glucometer (Accu-chek[®] Active, Roche Diagnosis, Basel, Switzerland) at each time point. The area under the glucose decay curve (AUC) was calculated for each mouse and the mean was calculated for each group (20).

Biochemical parameters

The biochemical analysis was performed with the blood samples collected at the end of the experiment. After the fasting protocol, the animals were anaesthetized (ketamine and xylazine) and their blood samples were taken from the brachial artery. The samples were centrifuged at 4,000 g, at 4 °C for 10 min to separate the serum. The total cholesterol (CT), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-c), no-HDL cholesterol, triglyceride, glucose, and the activity of aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) concentrations were measured using corresponding commercial kits (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) by spectrophotometry and serum insulin concentration was measured by electrochemiluminescence assay.

normal; (3) água com solução de frutose a 20% e ração padrão suplementada com 20% de MOF por 4 semanas. A metodologia referente à quantidade de farinha de *M. oleifera* adicionada à ração foi baseada em trabalho anterior com farinha de produtos vegetais (16,17), e a quantidade de frutose suplementada em água foi proposta por Mamikutty *et al.* (2014) (18).

Circunferência abdominal

No início do experimento e no final da 4ª semana foi medida a circunferência abdominal dos animais. A medida foi realizada com o animal em decúbito ventral com fita métrica na região correspondente à linha acima da crista ilíaca. Para acessar o percentual de aumento do ganho de circunferência abdominal, considerou-se a medida inicial e final.

Teste de resistência a insulina (TRI)

O TRI foi realizado por um método previamente descrito para ratos (19) O alimento foi retirado às 08h00 no dia do estudo, e o procedimento foi iniciado às 13h00. A insulina humana (Humulin[®]) foi administrada por via intraperitoneal em ratos na dose de 0,75 U/kg de peso corporal. O sangue da cauda foi coletado em 0 (antes da infusão de insulina), 30, 60, 90 e 120 min (pós infusão). Os níveis de glicose no sangue foram medidos com um glicosímetro (Accu-chek[®] Active, Roche Diagnosis, Basel, Suíça) em cada ponto de tempo. A área sob a curva de decaimento da glicose (AUC) foi calculada para cada camundongo e a média foi calculada para cada grupo (20).

Parâmetros bioquímicos

A análise bioquímica foi realizada com as amostras de sangue coletadas ao final do experimento. Após o protocolo de jejum, os animais foram anestesiados (cetamina e xilazina) e suas amostras de sangue foram retiradas da artéria braquial. As amostras foram centrifugadas a 4.000 g, a 4 °C por 10 min para separação do soro. As concentrações de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade-colesterol (HDL-c), colesterol sem HDL, triglicerídeos, glicose e a atividade da aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) foram medida usando kits comerciais correspondentes (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria e a concentração sérica de insulina foi medida por ensaio de eletroquimioluminescência.

Histological analysis

Small samples of hepatic, pancreatic and adipose tissues, extracted at the end of the experiment were fixed in 10% formalin. Then, followed the dehydration protocol, they were embedded in paraffin, sliced and stained using hematoxylin-eosin (HE). Images of the histological sections were taken using an optical microscope (Olympus CBA, Bartlett, TN, USA). For analysis of the pancreas, 15 images were captured for each animal in each group using a 10x objective. The image analysis was determined using Image J software, which quantified the areas of the respective functional units of each tissue. The results were expressed in $\mu\text{m}^2/\text{field}$. For the adipose tissue, 10 images of each animal in each group were captured using 10x objective, and the images were analyzed using Adiposoft Software (CIMA/Universidade de Navarra, Spain) (21)

Extraction of hepatic lipids

The liver cholesterol and triglyceride were extracted according Folch's method (1957) (22). At the end of the experiment, fresh livers were extracted and homogenized using chloroform/methanol (2:1, 3.75 mL). Chloroform and distilled water were then added to the homogenate and the solution was vortexed. After centrifugation (1500 g for 10 min), the lower organic phase was transferred to a new glass tube and lyophilized. The lyophilized powder was dissolved in a chloroform:methanol (1:2) mixture and then stored at -20°C . Cholesterol and triglyceride concentrations were determined spectrophotometrically using commercial diagnostic kits (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) in the liver

The evaluation of lipid peroxidation was determined by the concentration of malondialdehyde in the liver tissue. The amount of present TBARS were determined as described by Uchiyama and Mihara (1978) (23). Livers were removed and 10 % homogenates were prepared in 15 % KCl solution. To 0.5 mL of 10 % homogenate was added 3.0 mL 1% H_3PO_4 and 1 mL 0.6% thiobarbituric acid solution. Each mixture was heated for 45 min, cooled, and extracted with n-butanol and the absorbance of the color at 535 nm was measured. The results were expressed as nmol MDA/mg tissue.

Análise histológica

Pequenas amostras de tecidos hepático, pancreático e adiposo, extraídas ao final do experimento, foram fixadas em formol a 10%. Em seguida, seguindo o protocolo de desidratação, foram incluídos em parafina, fatiados e corados com hematoxilina-eosina (HE). As imagens dos cortes histológicos foram obtidas usando um microscópio óptico (Olympus CBA, Bartlett, TN, EUA). Para análise do pâncreas, foram capturadas 15 imagens de cada animal em cada grupo experimental usando uma objetiva de 10x. A análise das imagens foi determinada pelo software Image J, que quantificou as áreas das respectivas unidades funcionais de cada tecido. Os resultados foram expressos em $\mu\text{m}^2/\text{campo}$. Para o tecido adiposo, 10 imagens de cada animal em cada grupo experimental foram capturadas com objetiva de 10x, e as imagens foram analisadas com Adiposoft. Software (CIMA/Universidade de Navarra, Espanha) (21).

Extração de lipídeos hepáticos

O colesterol e os triglicerídeos do fígado foram extraídos de acordo com o método de Folch (1957) (22). No final do experimento, fígados frescos foram extraídos e homogeneizados usando clorofórmio/metanol (2:1, 3,75 mL). Clorofórmio e água destilada foram então adicionados ao homogenato e a solução foi agitada em vórtex. Após centrifugação (1500 g por 10 min), a fase orgânica inferior foi transferida para um novo tubo de vidro e liofilizada. O pó liofilizado foi dissolvido em uma mistura de clorofórmio:metanol (1:2) e então armazenado a -20°C . As concentrações de colesterol e triglicerídeos foram determinadas por meio de kits comerciais de diagnóstico (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria.

Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado

A avaliação da peroxidação lipídica foi determinada pela concentração de malondialdeído no tecido hepático. A quantidade de TBARS presentes foi determinada conforme descrito por Uchiyama e Mihara (1978) (23). Os fígados foram removidos e homogeneizados a 10% foram preparados em solução de KCl a 15%. A 0,5 mL de homogeneizado a 10% foram adicionados 3,0 mL de H_3PO_4 a 1% e 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico a 0,6%. Cada mistura foi aquecida por 45 min, resfriada e extraída com n-butanol e a absorbância da cor a 535 nm foi medida. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/mg de tecido.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard error mean (SEM) of 9 rats per group ($n=9$). For weight evolution analysis and insulin resistance tests, two-way ANOVA was used followed by Bonferroni test. All other statistical comparisons were performed using one-way analyses of variance (one way-ANOVA) followed by Tukey's test. P-values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered significant. All analyses were performed using GraphPad PRISM 6[®] (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Characterization of MOF extract by determination of total phenol content and LC-ESI- MS/MS analysis

Total phenol content in MOF extract was 122.96 ± 0.18 mg of gallic acid equivalent (GAE) per gram of extract, showing 2.27 ± 0.33 g EAG/100 g MOF. The phytochemical profile of MOF presented several compounds, seven of which could be identified (Figure 1 and Table 1). The seven major phenolic compounds were identified as (1) protocatechuic acid, (2) chlorogenic acid, (3) caffeic acid, (4) p-coumaric acid, (5) rutin, (6) quercetin, (7) eriodictyol, and the concentration of each was determined (Table 1). Among the identified compounds, the major compound of the extract is the compound 6, identified as quercetin with 103.01 mg/g, followed by protocatechuic and chlorogenic acid with 4.03 and 1.03 mg/g, respectively.

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão médio (SEM) de 9 ratos por grupo ($n=9$). Para a análise de evolução do peso e testes de resistência a insulina, foi utilizada ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni. Todas as outras comparações estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância de uma via (ANOVA), seguidas do pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad PRISM 6[®] (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Resultados

Caracterização do extrato de MOF por determinação do teor de fenol total e análise LC-ESI-MS/MS

O teor total de fenol no extrato de MOF foi de $122,96 \pm 0,18$ mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por grama de extrato, apresentando $2,27 \pm 0,33$ g EAG/100 g MOF. O perfil fitoquímico do MOF apresentou diversos compostos, dos quais foi possível identificar sete compostos (Figura 1 e Tabela 1). Os sete principais compostos fenólicos detectados foram identificados como: (1) Ácido protocatecuico; (2) ácido clorogênico; (3) ácido cafeico; (4) ácido p-cumárico; (5) rutina; (6) quercetina; (7) eriodictiol. As concentrações desses compostos foram determinadas e estão apresentadas na Tabela 1. Dentre os compostos identificados, o composto majoritário do extrato é o composto 6, identificado como quercetina com 103,01 mg/g, seguido de ácido protocatecuico e clorogênico com 4,03 e 1,03 mg/g, respectivamente.

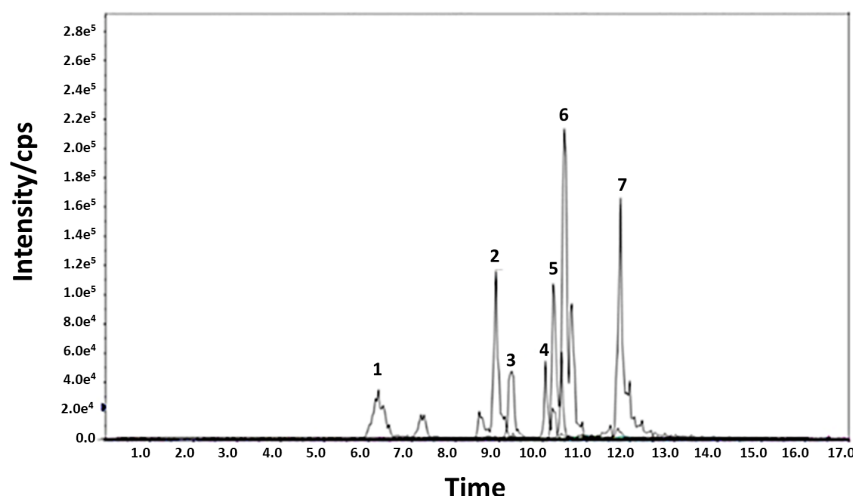


Figure 1 - Total ion chromatogram from methanolic extract of *Moringa oleifera* flour (MOF). Protocatechuic acid (1); Chlorogenic acid (2); Caffeic acid (3); p-Coumaric acid (4); Rutin (5); Quercetin (6); Eriodictyol (7).

Figura 1 - Cromatograma iônico total do extracto metanólico da farinha de *Moringa oleifera* (MOF). Ácido Protocatecuico (1); Ácido Clorogênico (2); Ácido Cafeico (3); Ácido p-Cumárico (4); Rutina (5); Quercetina (6); Eriodictiol (7).

Table 1 - Content of phenolic compounds from methanolic extract of *Moringa oleifera* flour (MOF). LOD, limit of detection; LOQ; limit of quantification; R², coefficient of determination. Concentration values ± SEM. **Tabela 1** - Teor de compostos fenólicos do extracto metanólico da farinha de *Moringa oleifera* (MOF). LOD, limite de detecção; LOQ; limite de quantificação; R², coeficiente de determinação. Valores expressos ± EPM.

Compounds	Linearity (mg mL ⁻¹)	R ²	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Concentration (mg/g)
Protocatechuic acid (1)	0.08 - 1.00	0.996	0.021	0.068	4.03 ± 0.47
Chlorogenic acid (2)	0.03 - 2.36	0.995	0.003	0.009	1.03 ± 0.29
Caffeic acid (3)	0.05 - 4.00	0.992	0.015	0.050	0.45 ± 0.16
<i>p</i> -Coumaric acid (4)	0.31 - 4.08	0.994	0.001	0.005	0.02 ± 0.01
Rutin (5)	0.05 - 6.24	0.998	0.032	0.108	0.11 ± 0.02
Quercetin (6)	0.08 - 3.20	0.997	0.011	0.036	103.01 ± 28.70
Eriodictyol (7)	0.06 - 2.03	0.992	0.001	0.004	0.01 ± 0.01

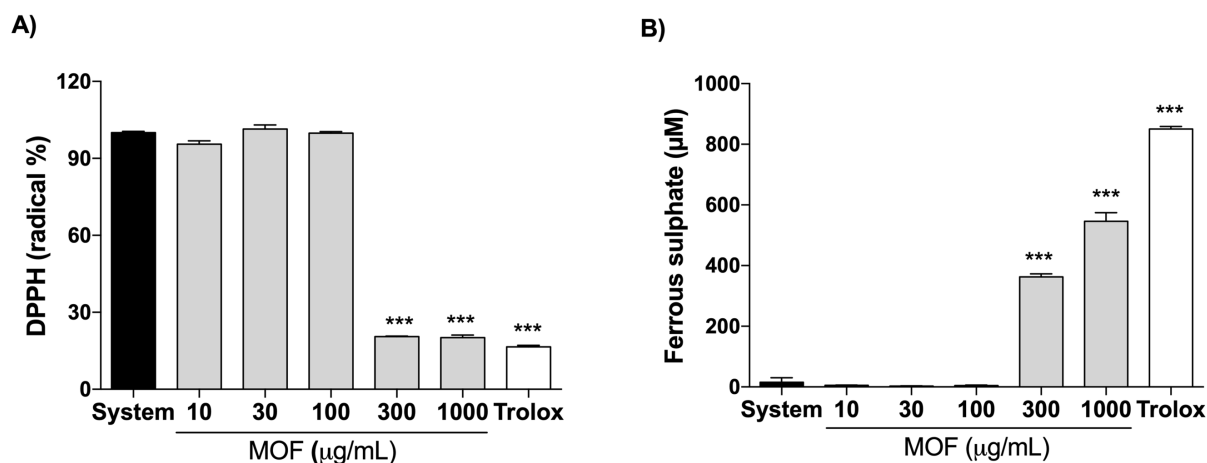


Figure 2 - Antioxidant activity of the methanolic extract of *Moringa oleifera* flour (MOF) *in vitro*. (A) MOF was tested in the DPPH radical assay (B) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). Experiments were performed in triplicate. Trolox was used as standard antioxidant. ***p < 0.001 vs. respective system (reaction medium without antioxidants).

Figura 2 - Atividade antioxidante do extracto metanólico da farinha de *Moringa oleifera* (MOF) *in vitro*. (A) MOF foi avaliado nos testes DPPH (B) e antioxidante redutor férrico (FRAP). As concentrações são indicadas para as soluções de reserva e os valores resultantes representam a média ± EPM. As experiências foram realizadas em triplicado. O Trolox foi utilizado como antioxidante padrão. ***p < 0,001 vs. o respectivo sistema (meio de reacção sem antioxidantes).

In vitro antioxidant activity of MOF methanolic extract

The extract was evaluated for antioxidant activity *in vitro* by the DPPH radical assay and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. Figure 2A shows that the MOF methanolic extract significantly decreased the DPPH radical from of 300–1000 $\mu\text{g/mL}$. Trolox (100 $\mu\text{g/mL}$) also significantly reduced the DPPH radical in comparison to the system. Data presented in Figure 2B demonstrates that MOF methanolic extract significantly increased the reducing potential from of 300–1000 $\mu\text{g/mL}$, when compared with the system. Trolox (100 $\mu\text{g/mL}$) also presented this activity ($p < 0.001$). Taken together, the data shows that MOF extract has antioxidant activity, probably due to the presence of phenolic compounds in the plant.

Effect of MOF in weight gain and abdominal circumference measurement

Figure 3 demonstrates that MOF and fructose supplementation did not interfere with weight gain after 4-week period of intervention (Figure 3A and 3B). Additionally, abdominal circumference was unaffected (Figure 3C).

Atividade antioxidante in vitro do extrato metanólico MOF

O extrato foi avaliado quanto à atividade antioxidante *in vitro* pelo ensaio do radical DPPH e pelo ensaio do poder antioxidante redutor férrico (FRAP). A Figura 2A mostra que o extrato metanólico MOF diminuiu significativamente o radical DPPH de 300–1000 $\mu\text{g/mL}$. Trolox (100 $\mu\text{g/mL}$) também reduziu significativamente o radical DPPH em comparação com o sistema. Os dados apresentados na Figura 2B demonstram que o extrato metanólico MOF aumentou significativamente o potencial redutor de 300–1000 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado com o sistema. Trolox (100 $\mu\text{g/mL}$) também apresentou essa atividade ($p < 0,001$). Em conjunto, os dados mostram que o extrato de MOF possui atividade antioxidante, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos na planta.

Efeito do MOF no ganho de peso e medida da circunferência abdominal

A Figura 3 demonstra que a suplementação com MOF e frutose não interferiu no ganho de peso após 4 semanas de intervenção (Figura 3A e 3B). Além disso, também não houve diferença na medida da circunferência abdominal (Figura 3C).

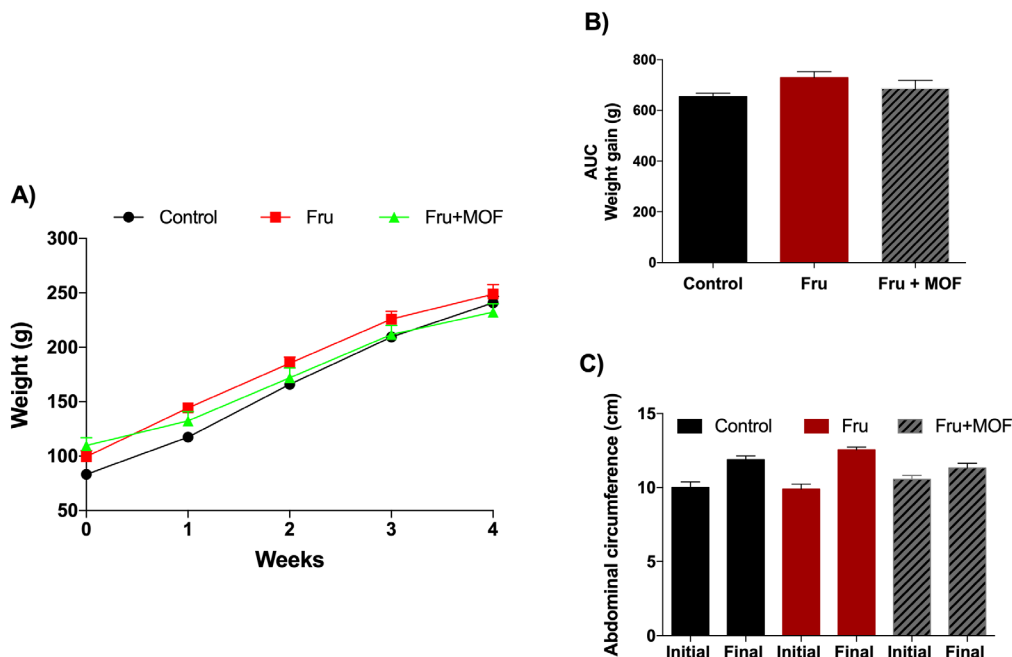


Figure 3 - Data obtained during the four-week period of intervention. (A) Weight Evolution; (B) Area under the curve of the weight evolution chart; (C) Abdominal Circumference. The results represent the mean \pm SEM of the values ($n = 9$ per group). Control = normal chow + drinking water; Fru = normal chow + 20% fructose solution; Fru+MOF = *M. oleifera* leaves flour added to chow + 20% fructose solution.

Figura 3 - Dados obtidos durante as 4 semanas de intervenção. (A) Evolução do Peso; (B) Área sob a curva do gráfico de evolução do peso; (C) Circunferência Abdominal. Os resultados representam a média \pm EPM dos valores ($n = 9$ por grupo). Controle = papa normal + água potável; Fru = papa normal + 20% de solução de frutose; Fru+MOF = farinha de *M. oleifera* adicionada à papa + 20% de solução de frutose.

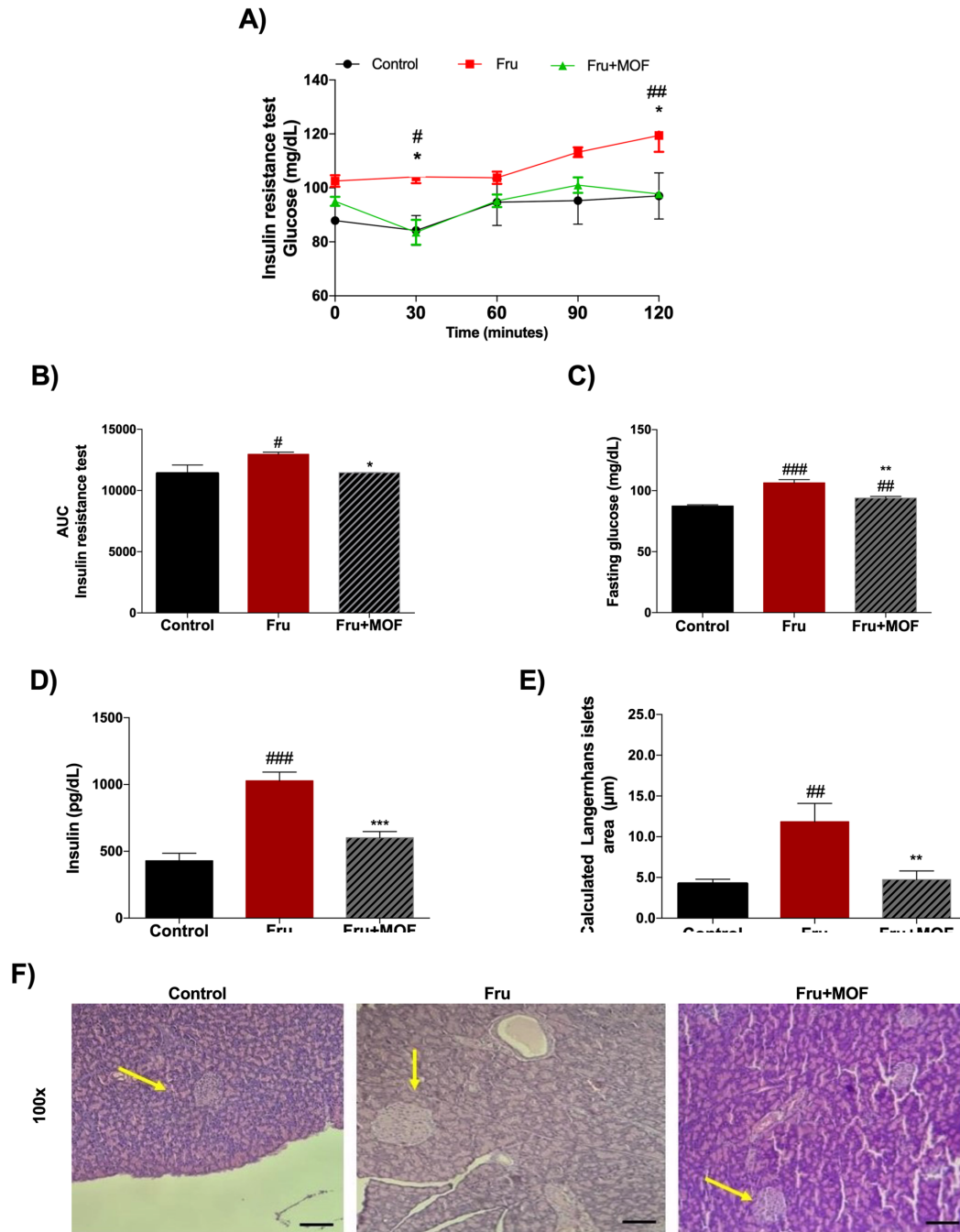


Figure 4 - Effects of MOF supplementation on insulin resistance test (A) and area under curve (AUC) of the respective line graph (B); levels of fasting glycemia (C) and insulin (D). Histomorphometric (E) and histomorphological analysis (F) of the Langerhans islets. The results represent the mean \pm SEM of the values (n = 9 per group). #p<0.05 ##p<0.01 e ###p<0.001 vs. control group and *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 vs. Fru group. Control= Normal chow + drinking water; Fru= normal chow +20% fructose solution; Fru+MOF = chow including *M. oleifera* leaves flour + 20% fructose solution. Scale bar = 100 μ m.

Figura 4 - Efeitos da suplementação de MOF no teste de resistência à insulina (A) e área sob curva (AUC) do respectivo gráfico de linhas (B); níveis de glicemia de jejum (C) e insulina (D). Histomorfometria (E) e análise histomorfológica (F) das ilhotas de Langerhans. Os resultados representam a média \pm EMP dos valores (n = 9 por grupo). #p<0.05 ##p<0.01 e #####p<0.001 vs. grupo de controle e *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 vs. grupo Fru. Control= papa normal + água potável; Fru= papa normal +20% de solução de frutose; Fru+MOF = papa incluindo farinha de folhas de *M. oleifera* + 20% de solução de frutose. Escala = 100 μ m.

Effect of MOF on insulin and glucose sensitivity, fasting blood glucose, and pancreatic parameters

The results obtained showed that rats supplemented with fructose for four weeks developed insulin resistance (Figure 4A and 4B) with increased fasting blood glucose (Figure 4C). Corroborating to this data, the animals also presented increased insulin levels (Figure 4D) and Langerhans islets hypertrophy (Figure 4F), which was confirmed by the measurement of Langerhans islets area (Figure 4E). On the other hand, the animals that received MOF supplementation presented a reduction in the glucose levels, without other metabolic changes correlated to insulin metabolism (Figure 4A, 4B and 4D). In fact, the histological evaluation of the pancreas in MOF-treated animals was very similar the animals from control group (Figure 4F). Moreover, in this group, the Langerhans islets cell volume remained close to normal (Figure 4E and F).

Effect of MOF on serum lipid profile

The effect of the MOF supplementation on serum lipid profile is demonstrated in Figure 5. The triglycerides (TGL) concentration was significantly decreased ($p < 0.05$) (Figure 5A), while high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentration increased significantly compared to fructose group ($p < 0.01$) (Figure 5C). The fructose group demonstrated a decrease in HDL values, as expected, and had a considerable increase in TGL when compared to both groups (Figure 5A). Total cholesterol and non-HDL cholesterol values did not show differences between groups (Figures 5B and 5D respectively).

Characterization of liver tissue lipids

The data presented in Figure 6 shows the hepatic lipid profile following the four-week period of intervention. The histological analysis of H&E-stained hepatocytes (magnification x 400) demonstrated lower deposition of lipids in the hepatic tissue in animals that received MOF supplementation (Figure 6A). The hepatocytes from the fructose-treated group presented plaques separated by irregular blood sinusoids. The areas were characterized as histological manifestation of intracytoplasmic lipids, close to the central lobular vein (Figure 6A). No such abnormalities were found in the MOF supplementation group, indicating that MOF supplementation prevented the deleterious effect of fructose on hepatic lipid storage. In fact, the biochemical analysis demonstrated that MOF supplementation prevented the increase of hepatic cholesterol and TGL concentrations (Figures 6B and C).

Efeito do MOF na sensibilidade à insulina e à glicose, glicemia de jejum e parâmetros do pâncreas

Os resultados obtidos mostraram que ratos suplementados com frutose por quatro semanas desenvolveram resistência à insulina (Figura 4A e 4B) com aumento da glicemia em jejum (Figura 4C). Corroborando com esses dados, os animais também apresentaram aumento do nível de insulina (Figura 4D) e hipertrofia das ilhotas de Langerhans (Figura 4F), o que foi confirmado pela medida da área das ilhotas de Langerhans (Figura 4E). Por outro lado, os animais que receberam suplementação com MOF apresentaram redução nos níveis de glicose, sem outra alteração metabólica correlacionada ao metabolismo da insulina (Figura 4A, 4B e 4D). De fato, a avaliação histológica do pâncreas em animais tratados com MOF foi muito semelhante aos animais do grupo controle (Figura 4F). Além disso, neste grupo, as ilhotas de Langerhans mantiveram o volume celular próximo da normalidade (Figura 4E e F).

Efeito do MOF no perfil lipídico sérico

O efeito da suplementação de MOF no perfil lipídico sérico é demonstrado na Figura 5. A concentração de triglicerídeos (TGL) foi significativamente diminuída ($p < 0,05$) (Figura 5A), enquanto a concentração de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) aumentou significativamente em comparação com grupo frutose ($p < 0,01$) (Figura 5C). O grupo frutose apresentou diminuição dos valores de HDL, como esperado, e teve aumento considerável de TGL quando comparado aos dois grupos (Figura 5A). Os valores de colesterol total e colesterol não HDL não mostraram diferenças entre os grupos (Figuras 5B e 5D respectivamente).

Caracterização dos lipídios do tecido hepático

Os dados apresentados na Figura 6 mostram o perfil lipídico hepático após o período de quatro semanas de intervenção. A análise histológica dos hepatócitos corados por H.E. (ampliação x 400) demonstrou menor deposição de lipídios no tecido hepático em animais que receberam suplementação de MOF (Figura 6A). O fígado do grupo tratado com frutose, os hepatócitos, apresentou placas separadas por sinusóides sanguíneos irregulares. As áreas foram caracterizadas como manifestação histológica de lipídios intracitoplasmáticos, próximo à veia lobular central (Figura 6A). A suplementação com MOF foi capaz de prevenir o efeito da frutose no armazenamento de lipídios hepáticos e não foram encontradas anormalidades. De fato, a análise

In addition, the lipid peroxidation was evaluated according to appropriate methods through malondialdehyde (MDA) measurement. As expected, liver tissue samples from rats that consumed only fructose revealed increase in MDA compared to both other groups. Moreover, MOF addition improved oxidative stress, reducing hepatic MDA formation (Figure 6D).

bioquímica demonstrou que a suplementação com MOF preveniu o aumento das concentrações hepáticas de colesterol e TGL (Figuras 6B e C).

Além disso, a peroxidação lipídica foi avaliada de acordo com métodos apropriados através da dosagem de malondialdeído (MDA). Como esperado, amostras de tecido hepático de ratos que consumiram apenas frutose revelaram aumento no MDA em comparação com os outros dois grupos. Além disso, a adição de MOF melhorou o estresse oxidativo, reduzindo a formação de MDA hepático (Figura 6D).

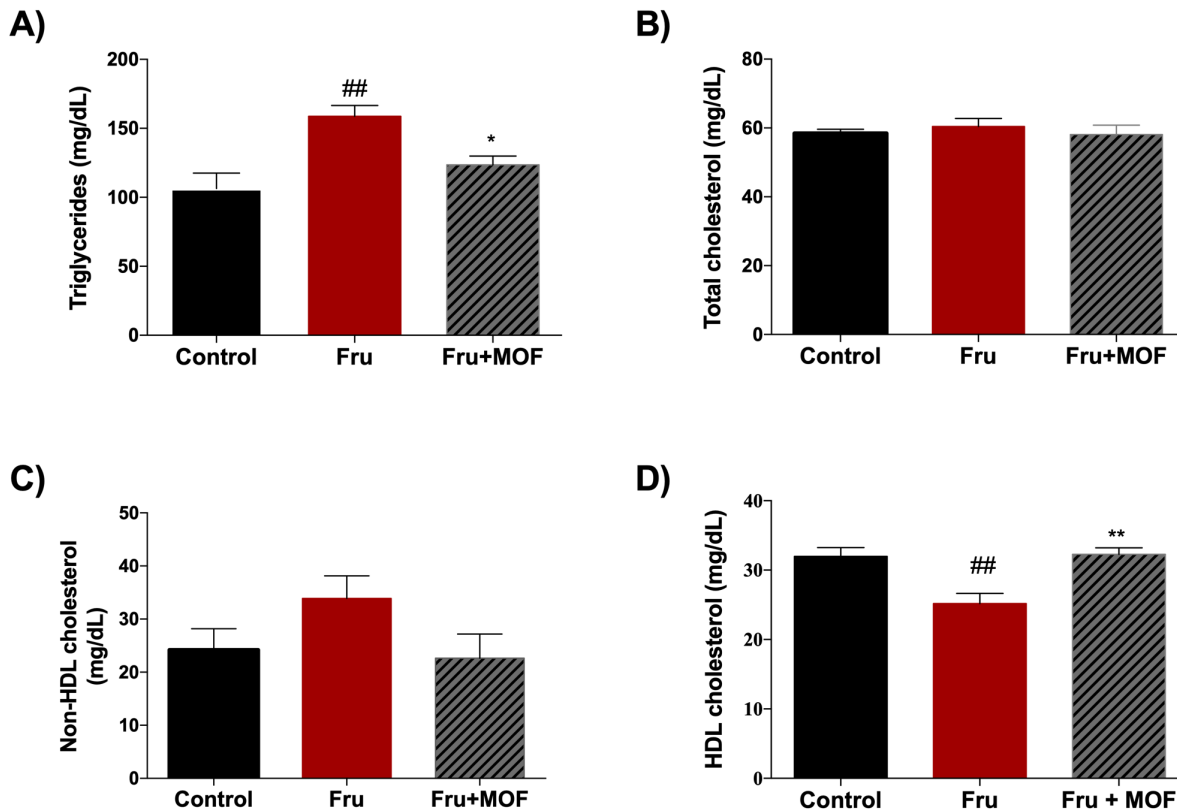


Figure 5 - Lipid profile of animals treated with MOF. (A) Measurement of triglycerides; (B) Total cholesterol; (C) Non-HDL cholesterol; (D) HDL cholesterol. The results represent the mean \pm SEM of the values (n = 9 per group). ##p<0.01 vs. control group and *p<0.05 **p<0.01 vs. Fru group. Control = Normal chow + drinking water; Fru = normal chow +20% fructose solution; Fru+MOF = chow including *M. oleifera* leaves flour + 20% fructose solution.

Figura 5 - Perfil lipídico dos animais tratados com MOF. (A) Medição de triglicéridos; (B) colesterol total; (C) colesterol não-HDL; (D) colesterol HDL (D). Os resultados representam a média \pm EMP dos valores (n = 9 por grupo). ##p<0,01 vs. grupo de controle e *p<0,05 **p<0,01 vs. grupo Fru. Controle = papa normal + água potável; fruta = papa normal +20% de solução de frutose; fruta+MOF = papa incluindo farinha de folhas de *M. oleifera* + 20% de solução de frutose.

Effect of MOF on adipose tissue parameters

The fructose group presented an increase in the absolute weight of visceral and epididymal adipose tissue (Figures 7A and 7D) after 4-week treatment period, as shown in Figure 7. However, no significant difference was observed between the relative weight for both tissues (Figures 7B and 7E). Noteworthy, the histology (Figure 7C) and morphometry (Figure 7F) from epididymal adipose tissue showed that fructose induces a higher cellular volume in the adipocytes. However, animals treated with MOF exhibited cellular area size similar to the control group.

Efeito do MOF nos parâmetros do tecido adiposo

Os dados apresentados na Figura 7 mostram que o grupo Frutose apresentou aumento no peso absoluto do tecido adiposo visceral e epididimal (Figuras 7A e 7D) após 4 semanas de tratamento. No entanto, não foi observada diferença significativa entre o peso relativo para ambos os tecidos (Figuras 7B e 7E). Destaca-se que a histologia (Figura 7C) e morfometria (Figura 7F) do tecido adiposo do epidídimo mostraram que a frutose induz maior volume celular nos adipócitos. No entanto, os animais tratados com MOF exibiram tamanho de área celular semelhante ao grupo controle.

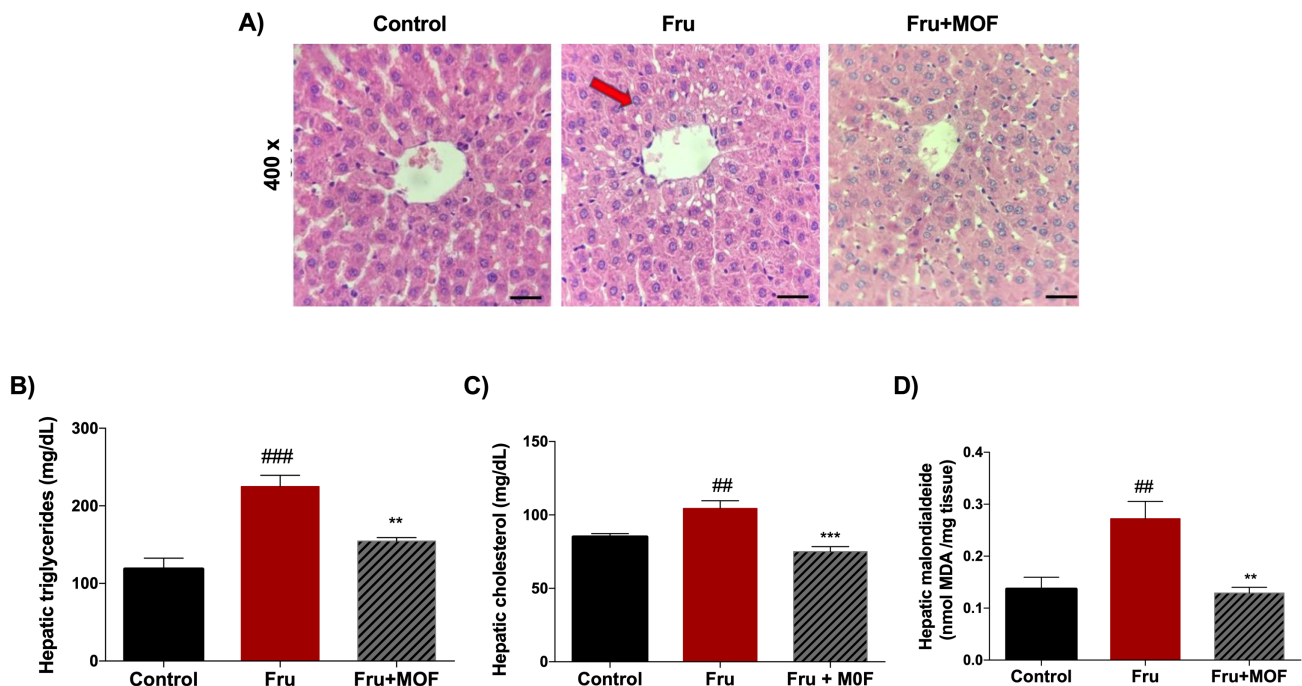


Figure 6 - Characterization of liver tissue from animals submitted to MOF treatment: (A) Illustrative histological images of the liver; (B) levels of triglycerides, (C) cholesterol, and (D) Evaluation of MDA dosage by the TBARS test (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). The values express the mean \pm S.E. M. (9 animals per group). ##p < 0.01 e ###p < 0.001 vs. Control group **p < 0.01 e ***p < 0.001 vs. Fru group. Control= normal chow + drinking water; Fru= normal chow +20% fructose solution; Fru+MOF= chow including *M. oleifera* leaves flour + 20% fructose solution. The red arrow indicates an area of hepatic steatosis. Scale bar = 100 μ m.

Figura 6 - Caracterização do tecido hepático de animais submetidos ao tratamento MOF: (A) Imagens histológicas ilustrativas do fígado; (B) níveis de triglicéridos, (C) colesterol, e (D) Avaliação da dosagem de MDA pelo teste TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Os valores expressam a média \pm S.E. M. (9 animais por grupo). ##p < 0.01 e #####p < 0.001 vs. Grupo de controle **p < 0.01 e ***p < 0.001 vs. Grupo Fru. Control= papa normal + água potável; Fru= papa normal +20% de solução de frutose; Fru+MOF= papa incluindo farinha de folhas de *M. oleifera* + 20% de solução de frutose. A seta vermelha indica uma área de esteatose hepática. Escala = 100 μ m.

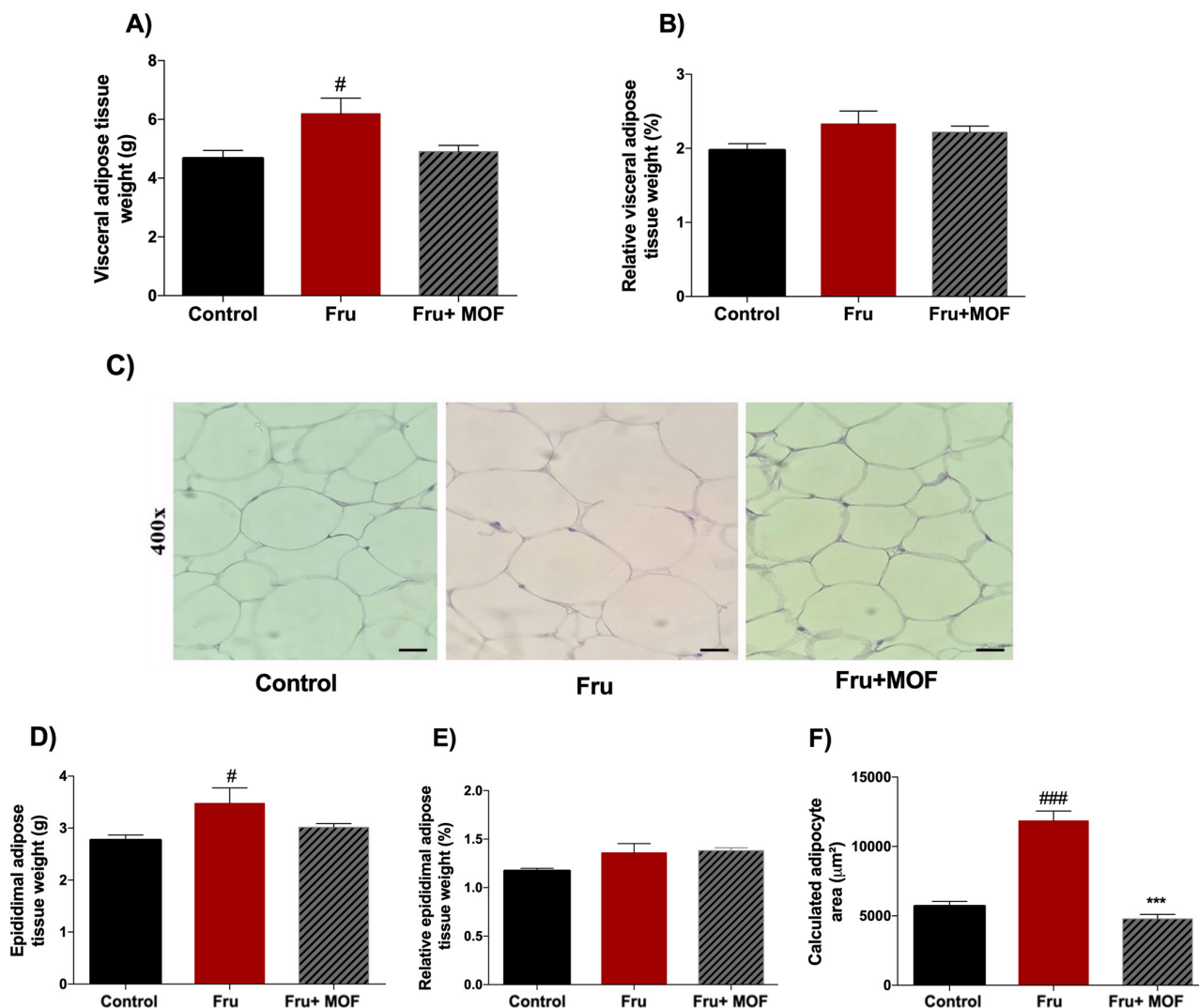


Figure 7 - Effects of MOF supplementation in adipose tissue parameters. (A) Absolute weight of visceral adipose tissue; (B) Relative weight of visceral adipose tissue; (D) Absolute weight of epididymal adipose tissue; (E) Relative weight of epididymal adipose tissue; (C) Illustrative images of adipocytes stained by hematoxylin and eosin; and (F) measurement of adipocyte cells area. The values express the mean \pm SEM. (9 animals per group). $\#p < 0.05$ and $###p < 0.001$ vs. control group and $***p < 0.01$ vs Fru group. Control = normal chow + drinking water; Fru = normal chow +20% fructose solution; Fru+MOF= chow including *M. oleifera* leaves flour + 20% fructose solution. Scale bar = 100 μ m

Figura 7 - Efeitos da suplementação de MOF nos parâmetros do tecido adiposo. (A) Peso absoluto do tecido adiposo visceral; (B) Peso relativo do tecido adiposo visceral; (D) Peso absoluto do tecido adiposo do epidídimo; (E) Peso relativo do tecido adiposo do epidídimo; (C) Imagens ilustrativas de adipócitos corados por hematoxilina e eosina; e (F) medição da área de células adipocitárias. Os valores expressam a média \pm EPM (9 animais por grupo). $\#p < 0,05$ e $###p < 0,001$ vs. grupo de controle e $***p < 0,01$ vs. grupo Fru. Controle = papa normal + água potável; fru = papa normal +20% de solução de frutose; fruta+MOF= papa incluindo farinha de folhas de *M. oleifera* + 20% de solução de frutose. Escala = 100 μ m.

Discussion

M. oleifera is an edible plant and contains not only nutrients, but also bioactive compounds such as alkaloids, sterols, glucosinolates, isothiocyanates, phenolic glycosides and flavonoids (24,25). In fact, our results showed that MOF extract is rich in phenolic compounds, as previously published (26). LC-ESI-MS/MS profile analysis enabled the identification of various active compounds within the extract. The detection of quercetin, as the majority compound, followed by protocatechuic, chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, rutin and eriodictyol in MOF agrees with previous studies (27).

Antioxidants are not only reducing agents used as preventatives to inhibit the oxidation of other molecules, but they may also be used to treat health complications from metabolic conditions caused by oxidative stress (3). MOF phytochemical analysis demonstrated the presence of phenolics compounds and flavonoids, which are known to be efficient antioxidants (28). In this context, the presence and synergy of these compounds in MOF explains the efficient antioxidant properties *in vitro* and *in vivo*.

Several researchers have demonstrated that excessive fructose consumption can lead to metabolic disturbances, especially related to insulin metabolism and metabolic syndrome (29,30). In fact, our data demonstrates that adding 20% fructose in the water given to the animals for four weeks promotes metabolic changes, mainly related to insulin resistance and liver lipid accumulation, without promoting alterations in the weight gain, abdominal circumference, and abdominal visceral fat deposition. Additionally, the data obtained in the histological analysis of the adipose tissue showed that the adipocyte's area increased in the fructose-treated animals. This data corroborates with the literature, which shows that the fructose consumption is associated with the adipocyte hypertrophy (31). In contrast, adipocyte hypertrophy was prevented with the incorporation of MOF into the diet, when compared to fructose treated animals.

Discussão

A *M. oleifera* é uma planta comestível e contém não apenas nutrientes, mas também compostos bioativos como alcalóides, esteróis, glucosinolatos, isotiocianatos, glicosídeos fenólicos e flavonóides (24,25). De fato, nossos resultados mostraram que o extrato de MOF é rico em compostos fenólicos, conforme previamente publicado (26). Para identificar os diferentes compostos ativos do extrato de MOF, utilizou-se a análise do perfil LC-ESI-MS/MS. A detecção de quercetina, como composto majoritário, seguida de protocatecuico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, rutina e eriodictiol no MOF concorda com estudos anteriores (27).

Os antioxidantes não são apenas agentes redutores que inibem a oxidação de outras moléculas, usados na prevenção, mas também podem tratar complicações de saúde, como condições metabólicas causadas pelo estresse oxidativo (3). A análise fitoquímica do MOF demonstrou a presença de compostos fenólicos e flavonóides, que são antioxidantes eficientes (28). Nesse contexto, a presença e sinergia desses compostos no MOF explica as eficientes propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*.

Vários pesquisadores apontaram que o consumo excessivo de frutose pode levar a distúrbios metabólicos, especialmente relacionados ao metabolismo da insulina e à síndrome metabólica (29,30). De fato, nossos dados demonstram que a adição de 20% de frutose na água fornecida aos animais por quatro semanas promove alterações metabólicas, principalmente relacionadas à resistência à insulina e acúmulo de lipídios no fígado, sem promover alterações no ganho de peso, circunferência abdominal e deposição de gordura visceral abdominal. Além disso, os dados obtidos na análise histológica do tecido adiposo mostraram que a área do adipócito aumentou nos animais tratados com frutose. Esses dados corroboram com a literatura, que mostra que o consumo de frutose está associado à hipertrofia de adipócitos (31). Em contrapartida, o grupo que teve MOF incorporado à dieta preveniu a hipertrofia de adipócitos quando comparado aos animais tratados com frutose. Esses achados são consistentes com dados anteriores que relataram que o tratamento com *M. oleifera* regulou negativamente a expressão de mRNA de leptina e resistina e a expressão de mRNA de adiponectina regulada positivamente em tecido visceral de ratos obesos, atenuando a síndrome metabólica (32).

From the above findings, the insulin resistance was observed in animals that received fructose. The insulin resistance is a fundamental aspect of the etiology of type 2 diabetes and plays important role not only in the development of hyperglycemia of non-insulin dependent diabetes but also in the pathogenesis of long-term complications such as hypertension, nephropathy, and hyperlipidemia. The high consumption of large(r) amounts of fructose facilitates the hepatic triacylglycerol production, in a process called *de novo lipogenesis*. This process leads to a “selective insulin resistance”, in which the inhibited-glucose metabolism by insulin signaling pathways is impaired while those that stimulates lipid metabolism are preserved, resulting in the devastating co-existence of hyperglycemia and hypertriglyceridemia (33,34).

Corroborating, our results show that fructose consumption promotes high triglycerides and insulin levels, increases the Langerhans islets area, altering glycemic behavior in response to exogenous insulin administration and fasting hyperglycemia, moving towards the impairment of insulin signaling cascade. In contrast, rats that received MOF incorporated to their diet presented normalized triglycerides, glucose metabolism and normal Langerhans islets area in the histopathological analysis. These results are consistent with recent studies that demonstrated the role of *M. oleifera* leaves in modulating hepatic key genes of the insulin signaling, reducing the hyperglycemia by minimizing gluconeogenesis, up-regulating the expression of hepatic IR and IRS-1, supporting the regeneration of damaged hepatocytes and pancreatic cells in rats (35,36). This effect could be in part related to the presence of chlorogenic acid that enhances insulin activity by triggering the AMP-activated protein kinase (AMPK) and by flavonoids that can promote the glucose uptake stimulation in peripheral tissues (37).

As previously cited, the liver histological analysis demonstrates that fructose promotes accumulation of triglycerides and cholesterol. This effect was previously reported by other studies (38,39) However, interestingly, triglyceride accumulation in the liver of fructose treated rats occurred in the absence of increased body weight or adiposity. According to Fabbrini *et al.* (2009) (40), intra-hepatic lipid content is a better predictor of metabolic abnormalities than body

Dos achados acima, a resistência à insulina foi observada em animais que receberam frutose. A resistência à insulina é um aspecto fundamental da etiologia do diabetes tipo 2 e desempenha papel importante não apenas no desenvolvimento da hiperglicemia do diabetes não insulino-dependente, mas também na patogênese de complicações a longo prazo, como hipertensão, nefropatia e hiperlipidemia. O alto consumo de maiores quantidades de frutose facilita a produção de triacilglicerol hepático, em um processo chamado de lipogênese de novo. Esse processo leva a uma “resistência seletiva à insulina”, na qual o metabolismo da glicose inibida pelas vias de sinalização da insulina é prejudicado enquanto aquelas que estimulam o metabolismo lipídico são preservadas, resultando na coexistência devastadora de hiperglicemia e hipertrigliceridemia (33,34).

Corroborando, nossos resultados mostram que o consumo de frutose promove níveis elevados de triglicérides e insulina, aumenta a área das ilhotas de Langerhans, altera o comportamento glicêmico em resposta à administração de insulina exógena e hiperglicemia de jejum, caminhando para o comprometimento da cascata de sinalização da insulina. Em contrapartida, os ratos que receberam MOF incorporado à dieta apresentaram triglicérides normalizados, metabolismo da glicose e área normal das ilhotas de Langerhans na análise histopatológica. É consistente com estudos recentes que demonstraram o papel das folhas de *M. oleifera* na modulação de genes-chave hepáticos da sinalização da insulina, reduzindo a hiperglicemia minimizando a gliconeogênese, regulando positivamente a expressão de IR e IRS-1 hepáticos, auxiliando na regeneração de células danificadas. hepatócitos e células pancreáticas em ratos (35,36). Esse efeito pode estar em parte relacionado à presença de ácido clorogênico que aumenta a atividade da insulina ao desencadear a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e por flavonóides que podem promover a estimulação da captação de glicose nos tecidos periféricos (37)

Conforme citado anteriormente, a análise histológica do fígado demonstra que a frutose promove acúmulo de triglicérides e colesterol. Esse efeito foi relatado anteriormente por outros estudos (38,39). No entanto, curiosamente, o acúmulo de triglicérides no fígado de ratos tratados com frutose ocorreu na ausência de maior peso corporal ou adiposidade. De acordo com Fabbrini *et al.* (2009) (40), o conteúdo lipídico intra-hepático é um melhor preditor de anormalidades metabólicas do que a adiposidade corporal. A deposição lipídica ectópica

adiposity. Ectopic lipid deposition induced by fructose is attributed to the activation of the transcription factor ChREBP and SREBP1c, which occurs during the fructose metabolism, and these transcription factors regulate the expression of several enzymes responsible for the fatty acid synthesis (41). It is believed that elevation in hepatic diacylglycerol (DAG) levels lead to protein kinase C (PKC) activation and its consequent translocation to the cell membrane, which results in inhibition of hepatic insulin signaling and development of hepatic insulin resistance.

In contrast, MOF diet supplementation was able to prevent the effect of fructose on hepatic lipid stores, probably due to its bioactive compounds such as quercetin which have been shown to alter gene expression of major regulators of hepatic cholesterol and triglycerides synthesis and uptake. The accumulation of liver lipids overloads the mitochondrial electron transport chain, which in turn leads to the increase of ROS and lipid peroxidation products. The increase of these mediators impairs mitochondrial function and reduces lipid β -oxidation, promoting even greater hepatic lipid deposition from this vicious cycle, creating a state of oxidative stress as a result of free radical production (42). Our results have shown an elevation in the hepatic MDA, an important biomarker of lipid peroxidation, and an impairment in the antioxidant defense system. As expected, the MOF supplementation induced lower levels of hepatic MDA, being itself a key antioxidant at the hub of numerous competing reactions.

As quercetin is the major compound of MOF, it is important to mention that according to literature data, only 5.3% of unchanged quercetin is bioavailable. Quercetin is ingested in the form of glycosides, and the glycosyl groups are released during mastication, digestion, and absorption. Afterwards, quercetin glycosides are converted to aglycone in the intestine before being absorbed into enterocytes by the action of glycosidases enzymes. Furthermore, more recent studies demonstrate that the biotransformation products of polyphenols can reach the tissues, and these metabolites are indeed found in higher concentrations than their “parent compounds” (43).

induzida pela frutose é atribuída à ativação do fator de transcrição ChREBP e SREBP1c, que ocorre durante o metabolismo da frutose, e esses fatores de transcrição regulam a expressão de várias enzimas responsáveis pela síntese de ácidos graxos (41). Acredita-se que a elevação dos níveis hepáticos de diacilglicerol (DAG) leve à ativação da proteína quinase C (PKC) e sua consequente translocação para a membrana celular, o que resulta na inibição da sinalização hepática da insulina e no desenvolvimento de resistência hepática à insulina.

Em contraste, a suplementação da dieta com MOF foi capaz de prevenir o efeito da frutose nos estoques de lipídios hepáticos, provavelmente devido aos seus compostos bioativos, como a quercetina, que demonstraram alterar a expressão gênica dos principais reguladores da síntese e captação hepática de colesterol e triglicérides. O acúmulo de lipídios no fígado sobrecarrega a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, o que, por sua vez, leva ao aumento de EROs e produtos da peroxidação lipídica. O aumento desses mediadores prejudica a função mitocondrial e reduz a β -oxidação lipídica, promovendo ainda maior deposição hepática de lipídios a partir desse ciclo vicioso, criando um estado de estresse oxidativo como resultado da produção de radicais livres (42). Nossos resultados mostraram uma elevação do MDA hepático, um importante biomarcador da peroxidação lipídica, e um comprometimento do sistema de defesa antioxidante. Como esperado, a suplementação de MOF induziu níveis mais baixos de MDA hepático, sendo ele próprio um antioxidante chave no centro de inúmeras reações.

Sendo a quercetina o principal composto do MOF, é importante mencionar que, de acordo com dados da literatura, apenas 5,3% da quercetina inalterada é biodisponível. A quercetina é ingerida na forma de glicosídeos e os grupos glicosil são liberados durante a mastigação, digestão e absorção. Posteriormente, os glicosídeos de quercetina são convertidos em aglicona no intestino antes de serem absorvidos pelos enterócitos pela ação das enzimas glicosidases. Além disso, estudos mais recentes demonstram que os produtos de biotransformação dos polifenóis podem atingir os tecidos. E, de fato, esses metabólitos são encontrados em concentrações mais altas do que seus “compostos originais” (43).

Together, these findings demonstrated an efficient protective effect of MOF supplementation against adverse effects of fructose diet-induced metabolic syndrome and its first initial metabolic changes, like insulin resistance and associated cardiovascular disorders. The present results also highlight the deleterious effects of fructose consumption in early life which may lead to adults with severe metabolic syndrome and co-morbidities.

Strengths and limitations of the study

Although there are different murine models to mimic the metabolic syndrome, the decision about which model to use for a particular experiment is often multifactorial. The advantage of the model used in our study (over the genetic models) is that not the entire population is genetically affected and will develop metabolic syndrome. Another important point is the type of sugar used in the diet. We decided to use fructose because many studies have reported that the chronic consumption is strongly associated with a variety of related metabolic diseases, including obesity, systemic insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus.

The (unfortunately) wide consumption of soft drinks, which are mostly sweetened with high fructose syrup (60% + 40% sucrose), was another determinant in our selection of fructose.

Although this study was focused on the evaluation of MOF supplementation to prevent fructose metabolic disorders, one of the limitations of this work is the lack of knowledge of the mechanism through which MOF can modulate the metabolism to avoid the effects of high fructose diet. Another limitation of the study is related to the lack of quantification of sugars in the diet. In this context, is important to mention that the data here obtained *in vitro* and *in vivo* are preliminary, and further research is required to elucidate these points.

In addition, there is a lack of knowledge about the pharmacokinetics of MOF compounds to better understanding the metabolization and the delivery of metabolites to the tissues. In this context, further analyses are necessary to elucidate this point.

Juntos, esses achados demonstraram um efeito protetor eficiente da suplementação de MOF contra os efeitos adversos da síndrome metabólica induzida pela dieta de frutose e suas primeiras alterações metabólicas iniciais, como resistência à insulina e distúrbios cardiovasculares associados. Os presentes resultados também destacam os efeitos deletérios da frutose consumo no início da vida, o que pode levar a adultos com síndrome metabólica grave e comorbidades.

Pontos fortes e limitações do estudo

Embora existam diferentes modelos murinos para mimetizar a síndrome metabólica, a decisão sobre qual modelo usar para um determinado experimento é muitas vezes multifatorial. A vantagem deste modelo sobre os modelos genéticos é que nem toda a população é geneticamente afetada e pode desenvolver síndrome metabólica. Outro ponto importante é o tipo de açúcar utilizado na dieta. Decidimos usar frutose porque muitos estudos relataram que o consumo crônico está fortemente associado a uma variedade de doenças metabólicas relacionadas, incluindo obesidade, resistência sistêmica à insulina, síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2.

Infelizmente, no mundo há um alto consumo de refrigerantes, que em sua maioria são adoçados com xarope rico em frutose (60% + 40% sacarose). Esta é uma das razões pelas quais decidimos usar este modelo de frutose.

Embora este estudo esteja focado em avaliar se a suplementação com MOF previne distúrbios metabólicos da frutose, uma das limitações deste trabalho é a falta de conhecimento do mecanismo pelo qual a suplementação com MOF pode modular o metabolismo para evitar os efeitos da dieta rica em frutose. Outra limitação do estudo está relacionada à falta de quantificação de açúcares na dieta. Nesse contexto, é importante mencionar que os dados aqui obtidos *in vitro* e *in vivo* são preliminares, sendo necessárias mais pesquisas para elucidar esses pontos.

Além disso, há uma falta de conhecimento sobre a farmacocinética dos compostos presentes na MOF para melhor compreensão da metabolização e entrega de metabólitos aos tecidos. Nesse contexto, mais análises são necessárias para elucidar esse ponto.

Conclusion

Taken together, the data herein presented show that *Moringa oleifera* flour prevents the high-fructose intake-initiated metabolic disorders. Phytochemical study of MOF demonstrated a series of phenolic compounds, which can be correlated with its *in vitro* antioxidant activity. *In vivo*, MOF prevented insulin resistance, dyslipidemia, and adipocyte hypertrophy. However, more studies are necessary to elucidate the mechanisms involved.

Authors Contributions Statement

Data collection: ICBC, ICZ, IRS, MFB, ADF, MJG, EAS, LB and SG; statistical analysis: ICBC, LB, JRS, RN, LV, NLMQ and IDM; analysis and interpretation of the data: JRS, NLMQ, IDM, AMOS and LV; drafting the manuscript: JRS, IDM and NLMQ; critical revision of the manuscript: JRS.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number: 429505/2018-3) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, cod. 001). I.C.B.T and M.F.B were Master students and are recipients of CAPES (Cod. 001) grants during the study. N.L.M.Q. and J.R.S. are CNPq researchers (process numbers 305550/2018-7 and 310326/2020-6).

Conflict of Interests

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

Conclusão

Em conjunto, os dados aqui apresentados mostram que a farinha de *Moringa oleifera* previne os distúrbios metabólicos iniciais induzidos pela ingestão de frutose. O estudo fitoquímico do MOF demonstrou uma série de compostos fenólicos, o que está correlacionado com a atividade antioxidante apresentada nos estudos *in vitro*. *In vivo*, o MOF preveniu a resistência à insulina, dislipidemia e hipertrofia de adipócitos. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos.

Declaração de Contribuições dos Autores

Coleta de dados: ICBC, ICZ, IRS, MFB, ADF, MJG, EAS, LB e SG; análise estatística: ICBC, LB, JRS, RN, LV, NLMQ e IDM; análise e interpretação dos dados: JRS, NLMQ, IDM, AMOS e LV; redação do manuscrito: JRS, IDM e NLMQ; revisão crítica do manuscrito: JRS.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por bolsas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, número: 429505/2018-3) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, cod. 001). I.C.B.T e M.F.B eram alunos de mestrado e bolsistas da CAPES (Cod. 001) durante o estudo. N.L.M.Q. e J.R.S. são pesquisadores do CNPq (processos números 305550/2018-7 e 310326/2020-6).

Conflito de interesses

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

References / Referências

1. Ma, X., Lin, L., Yue, J., Wu, C. S., Guo, C. A., Wang, R., Yu, K. J., Devaraj, S., Murano, P., Chen, Z., & Sun, Y. (2017). Suppression of Ghrelin Exacerbates HFCS-Induced Adiposity and Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS18061302>
2. Mortera, R. R., Bains, Y., & Gugliucci, A. (2019). Fructose at the crossroads of the metabolic syndrome and obesity epidemics. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *24*(2), 186–211. <https://doi.org/10.2741/4713>
3. Goss, M. J., Nunes, M. L. O., Machado, I. D., Merlin, L., Macedo, N. B., Silva, A. M. O., Bresolin, T. M. B., & Santin, J. R. (2018). Peel flour of *Passiflora edulis* Var. *Flavicarpa* supplementation prevents the insulin resistance and hepatic steatosis induced by low-fructose-diet in young rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *102*, 848–854. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.03.137>
4. Ogunsina, B. S., Radha, C., & Indrani, D. (2011). Quality characteristics of bread and cookies enriched with debittered *Moringa oleifera* seed flour. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *62*(2), 185–194. <https://doi.org/10.3109/09637486.2010.526928>
5. Pari, L., & Kumar, N. A. (2004). Hepatoprotective Activity of *Moringa oleifera* on Antitubercular Drug-Induced Liver Damage in Rats. <https://Home.Liebertpub.Com/Jmf>, *5*(3), 171–177. <https://doi.org/10.1089/10966200260398206>
6. Gupta, R., Mathur, M., Bajaj, V. K., Katariya, P., Yadav, S., Kamal, R., & Gupta, R. S. (2012). Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. *Journal of Diabetes*, *4*(2), 164–171. <https://doi.org/10.1111/J.1753-0407.2011.00173.X>
7. López, M., Ríos-Silva, M., Huerta, M., Cárdenas, Y., Bricio-Barrios, J. A., Díaz-Reval, M. I., Urzúa, Z., Huerta-Trujillo, M., López-Quezada, K., & Trujillo, X. (2018). Effects of *Moringa oleifera* leaf powder on metabolic syndrome induced in male Wistar rats: a preliminary study. *The Journal of International Medical Research*, *46*(8), 3327. <https://doi.org/10.1177/0300060518781726>
8. Ghasi, S., Nwobodo, E., & Ofili, J. O. (2000). Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *69*(1), 21–25. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00106-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00106-3)
9. Daba, M.-H., Elmasry, A., & El-Karef, A. A. (2015). Effect of moringa oleifera with and without metformin on an experimental model of metabolic syndrome in rats. *International Journal of Advanced Research*, *3*(10), 1624–1632.
10. Othman, A. I., Amer, M. A., Basos, A. S., & El-Missiry, M. A. (2019). *Moringa oleifera* leaf extract ameliorated high-fat diet-induced obesity, oxidative stress and disrupted metabolic hormones. *Clinical Phytoscience* *2019 5:1*, *5*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S40816-019-0140-0>
11. Mehta, L. K., Balaraman, R., Amin, A. H., Bafna, P. A., & Gulati, O. D. (2003). Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, *86*(2–3), 191–195. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00075-8)
12. Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchoe, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, *44*, 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.021>
13. Oboh, G., Agunloye, O. M., Adefegha, S. A., Akinyemi, A. J., & Ademiluyi, A. O. (2015). Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): A comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, *26*(2), 165–170. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2013-0141/machinereadablecitation/ris>
14. Sanchez, M. B., Miranda-Perez, E., Verjan, J. C. G., de los Angeles Fortis Barrera, M., Perez-Ramos, J., & Alarcon-Aguilar, F. J. (2017). Potential of the chlorogenic acid as multitarget agent: Insulin-secretagogue and PPAR α/γ dual agonist. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *94*, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.086>
15. Ahangarpour, A., Sayahi, M., & Sayahi, M. (2019). The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, *13*(1), 854–857. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.11.051>
16. Scarminio, V., Fruet, A. C., Witaicenis, A., Rall, V. L. M., & di Stasi, L. C. (2012). Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa sp AAA*) prevents intestinal inflammation in a trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, *32*(3), 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.01.002>
17. Irondi, E. A., Olalekan Agboola, S., Oboh, G., Boligon, A. A., Linde Athayde, M., & Shode, F. O. (2016). Guava leaves polyphenolics-rich extract inhibits vital enzymes implicated in gout and hypertension in vitro. *J Intercult Ethnopharmacol*, *2*. <https://doi.org/10.5455/jice.20160321115402>
18. Mamikutty, N., Thent, Z. C., Sapri, S. R., Sahrudin, N. N., Mohd Yusof, M. R., & Haji Suhaimi, F. (2014). The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed Research International*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/263897>
19. Storlien, L. H., Higgins, J. A., Thomas, T. C., Brown, M. A., Wang, H. Q., Huang, X. F., & Else, P. L. (2000). Diet composition and insulin action in animal models. *The British Journal of Nutrition*, *83* Suppl 1(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1017/S0007114500001008>
20. Yuan, L., Wang, Y., Lu, C., & Li, X. (2013). Angiotensin-Converting Enzyme 2 Deficiency Aggravates Glucose Intolerance via Impairment of Islet Microvascular Density in Mice with High-Fat Diet. *Journal of Diabetes Research*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/405284>
21. Galarraga, M., Campión, J., Muñoz-Barrutia, A., Boqué, N., Moreno, H., Martínez, J. A., Milagro, F., & Ortiz-de-Solórzano, C. (2012). Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of Lipid Research*, *53*(12), 2791–2796. <https://doi.org/10.1194/JLR.D023788>
22. Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, *226*(1), 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
23. Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, *86*(1), 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1)
24. Joung, H., Kim, B., Park, H., Lee, K., Kim, H. H., Sim, H. C., Do, H. J., Hyun, C. K., & Do, M. S. (2017). Fermented *Moringa oleifera* Decreases Hepatic Adiposity and Ameliorates Glucose Intolerance in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. <https://Home.Liebertpub.Com/Jmf>, *20*(5), 439–447. <https://doi.org/10.1089/JMF.2016.3860>
25. Omodanisi, E. I., Aboua, G. Y., & Oguntibeju, O. O. (2017). Therapeutic potentials and pharmacological properties of *Moringa oleifera* Lam in the treatment of diabetes mellitus and related complications. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *16*(7), 1737–1746. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i7.35>
26. Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *14*(6), 2167–2180. <https://doi.org/10.3390/molecules14062167>
27. Valdez-Solana, M. A., Mejía-García, V. Y., Téllez-Valencia, A., García-Arenas, G., Salas-Pacheco, J., Alba-Romero, J. J., & Sierra-Campos, E. (2015). Nutritional content and elemental and phytochemical analyses of moringa oleifera grown in Mexico. *Journal of Chemistry*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/860381>
28. Ksouri, R., Ksouri, W. M., Jallali, I., Debez, A., Magné, C., Hiroko, I., & Abdely, C. (2012). Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Critical reviews in biotechnology*, *32*(4), 289–326. <https://doi.org/10.3109/073885512.011.630647>
29. Nimrouzi, M., Ruyvaran, M., Zamani, A., Nasiri, K., & Akbari, A. (2020). Oil and extract of safflower seed improve fructose induced metabolic syndrome through modulating the homeostasis of trace elements, TNF- α and fatty acids metabolism. *Journal of Ethnopharmacology*, *254*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112721>

30. Ramírez-Higuera, A., Peña-Montes, C., Herrera-Meza, S., Mendoza-López, R., Valerio-Alfaro, G., & Oliart-Ros, R. M. (2020). Preventive Action of Sterculic Oil on Metabolic Syndrome Development on a Fructose-Induced Rat Model. *Journal of Medicinal Food*, 23(3), 305–311.
31. Lin, W. T., Chan, T. F., Huang, H. L., Lee, C. Y., Tsai, S., Wu, P. W., Yang, Y. C., Wang, T. N., & Lee, C. H. (2016). Fructose-Rich Beverage Intake and Central Adiposity, Uric Acid, and Pediatric Insulin Resistance. *The Journal of Pediatrics*, 171, 90-96.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.12.061>
32. Metwally, F. M., Rashad, H. M., Ahmed, H. H., Mahmoud, A. A., Abdol Raouf, E. R., & Abdalla, A. M. (2017). Molecular mechanisms of the anti-obesity potential effect of Moringa oleifera in the experimental model. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3), 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.007>
33. Anitha Nandhini, A. T., Balakrishnan, S. D., & Anuradha, C. v. (2002). Taurine improves lipid profile in rats fed a high fructose-diet. *Nutrition Research*, 22(3), 343–354. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(01\)00391-8](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00391-8)
34. Leavens, K. F., & Birnbaum, M. J. (2011). Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 46(3), 200–215. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.562481>
35. Abd El Latif, A., el Bialy, B. E. S., Mahboub, H. D., & Abd Eldaim, M. A. (2014). Moringa oleifera leaf extract ameliorates alloxan-induced diabetes in rats by regeneration of β cells and reduction of pyruvate carboxylase expression. *Biochemistry and Cell Biology. Biochimie et Biologie Cellulaire*, 92(5), 413–419. <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0081>
36. Mohamed, M. A., Ahmed, M. A., & el Sayed, R. A. (2019). Molecular effects of Moringa leaf extract on insulin resistance and reproductive function in hyperinsulinemic male rats. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 18(2), 487. <https://doi.org/10.1007/s40200-019-00454-7>
37. Ong, K. W., Hsu, A., & Tan, B. K. H. (2013). Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochemical Pharmacology*, 85(9), 1341–1351. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.008>
38. Mock, K., Lateef, S., Benedito, V. A., & Tou, J. C. (2017). High-fructose corn syrup-55 consumption alters hepatic lipid metabolism and promotes triglyceride accumulation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 39, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.09.010>
39. Muhammad, N., Ibrahim, K. G., Ndhlala, A. R., & Erlwanger, K. H. (2020). Moringa oleifera Lam. prevents the development of high fructose diet-induced fatty liver. *South African Journal of Botany*, 129, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.12.003>
40. Fabbrini, E., Magkos, F., Mohammed, B. S., Pietka, T., Abumrad, N. A., Patterson, B. W., Okunade, A., & Klein, S. (2009). Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15430–15435. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904944106>
41. Janevski, M., Ratnayake, S., Siljanovski, S., McGlynn, M. A., Cameron-Smith, D., & Lewandowski, P. (2012). Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat. *Food & Function*, 3(2), 141–149. <https://doi.org/10.1039/c1fo10111k>
42. Takaki, A., Kawai, D., & Yamamoto, K. (2013). Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 20704–20728. <https://doi.org/10.3390/IJMS141020704>
43. Chen, X., Yin, O. Q., Zuo, Z., & Chow, M. S. (2005). Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharmaceutical research*, 22(6), 892–901. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-4584-1>

Pilot study of unconventional food plant (UFP): adherence to nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) in the diet and monitoring of biometric and clinical indicators

*Estudo piloto de planta alimentícia não convencional (PANC): adesão da capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) na dieta e monitorização de indicadores biométricos e clínicos*

Sérgio Faloni de Andrade¹, Maria da Graça Lopes Serrador¹, Alda Pereira da Silva^{1,3,4}, Rejane Giacomelli Tavares^{1,2}, Luis Monteiro Rodrigues¹, Maria do Céu Costa^{1,5}

¹Universidade Lusófona - CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av. Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal; ²Universidade Federal de Pelotas- PPGNA- Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Rua Gomes Carneiro, 01, 96010-610, Pelotas, RS, Brazil; ³Institute for Preventive Medicine and Public Health, Lisbon School of Medicine, University of Lisbon, Portugal; ⁴Clinic of General and Family Medicine, Ecogenetics and Human Health Unity, Institute for Environmental Health, ISAMB, Portugal; ⁵NICiTeS, Polytechnic Institute of Lusophony, ERISA-Escola Superior de Saúde Ribeiro Sanches, Lisboa, Portugal

* corresponding author / autor para correspondência: sergio.andrade@ulusofona.pt

Abstract

The flowers of *Tropaeolum majus*, popularly known as "capuchinha," garden nasturtium, nasturtium, Indian cress, or monks cress, are currently used worldwide as a food supplement and in plant-based diets, being added to smoothies, soups, mayonnaise and salads by consumers in search of sources of substances considered beneficial to human health. Most studies have shown nutritional qualities and beneficial effects of the plant, especially its flowers and respective aqueous extracts in vitro and in animals. Thus, this pilot study was designed to evaluate the acceptance and possible benefits of daily consumption of 20 g *T. majus* flowers per day for 30 days in healthy participants. Before and after ingestion, body composition, heart rate, blood pressure, and hematological and biochemical parameters were analysed. Results have shown good acceptance and safe use of *T. majus* flowers in a balanced and varied diet. However, it is important to highlight that this is the first exploratory study regarding these issues in healthy humans, and therefore, despite the widespread consumption described, additional studies are needed to deepen the results in biometric and clinical indicators in a larger number of volunteers.

Keywords: *Tropaeolum majus*, unconventional food plant (UFP), nasturtium, edible flowers

Resumo

As flores de *Tropaeolum majus* conhecidas como capuchinha, capuchinha de jardim, agrião-da-índia ou agrião-monge são mundialmente utilizadas como suplemento alimentar em dietas à base de plantas, adicionadas a smoothies, sopas, maionese e saladas por consumidores em busca de fontes de substâncias consideradas benéficas para a saúde humana. A maioria dos estudos mostra qualidades nutricionais e efeitos benéficos da planta, principalmente das flores, e seus extratos aquosos *in vitro* e em animais. Este estudo piloto foi desenhado para avaliar a aceitação da ingestão diária e possíveis benefícios resultantes da ingestão de flores de *T. majus*, em voluntários humanos saudáveis consumindo 20 g de flores de *T. majus* por dia em 30 dias. Antes e após a ingestão, a composição corporal, frequência cardíaca, pressão arterial e parâmetros hematológicos e bioquímicos foram analisados. Os resultados mostram boa aceitação e uso seguro das flores de *T. majus* numa dieta equilibrada e variada. No entanto, é importante destacar que este é o primeiro estudo exploratório sobre a segurança do consumo de flores de *T. majus* em humanos saudáveis, e, portanto, apesar do consumo generalizado descrito, são necessários estudos adicionais para aprofundar os resultados em indicadores biométricos e clínicos em um número maior de voluntários.

Palavras-chave: *Tropaeolum majus*, plantas alimentícias não-convencionais (PANCs), capuchinha, flores comestíveis

Introduction

Tropaeolum majus L. (Figure 1) is popularly known as garden nasturtium, nasturtium, Indian cress, or monks cress and belongs to the Tropaeolaceae family. It is a native plant of the Andes, mainly from Bolivia and Colombia where it grows wild, however, it was brought to Europe from Peru in the 16th century and is successfully cultivated as an annual decorative plant (1,2). It is currently found in all of Europe, and in some regions of Africa, Asia and Oceania (3).

This species is used in folk medicine to treat several diseases. Its leaves are used to treat asthma, urinary tract infections, cardiovascular disorders, and constipation (4). Pre-clinical studies have shown antihypertensive and diuretic effects (5,6) and *in vitro* assays using culture cells revealed anti-adipogenic effects of *T. majus* extracts (7). In addition, several toxicologic studies (chronic and subchronic toxicity, reproductive toxicity, and genotoxicity) have been conducted and demonstrated that *T. majus* infusions and aqueous extracts are safe (8,9). However, the use of high doses of hydroethanolic extracts should not be recommended to men of reproductive age and to pregnant women because high doses of these extracts (> 300 mg/kg) have interfered with reproductive function and gestation of animals (4,8-10). Pre-treatment with *T. majus* methanolic alcohol extract provides protection against diethyl maleate-induced blood and liver toxicity in rats, with results confirmed by histological examinations (11). In recent years, *T. majus* flower has been widely used in culinary as unconventional food

Introdução

Tropaeolum majus L. (Figura 1) é popularmente conhecida como capuchinha de jardim, capuchinha, agrião-da-índia ou agrião-dos-monges. Pertence à família Tropaeolaceae e é uma planta nativa dos Andes, principalmente da Bolívia e Colômbia, onde cresce naturalmente, trazida para a Europa do Peru no século XVI e é cultivada com sucesso como planta anual e decorativa (1,2). Atualmente, encontra-se em toda a Europa, em algumas regiões da África, Ásia e Oceania (3).

Esta espécie é utilizada na medicina popular, para o tratamento de diversas doenças. Suas folhas são usadas para tratar distúrbios cardiovasculares, infecções do trato urinário, asma e obstipação (4). Estudos pré-clínicos mostraram efeitos anti-hipertensivos e diuréticos (5,6) e ensaios *in vitro* usando células de cultura revelaram efeitos anti-adipogênicos de extratos de *T. majus* (7). Além disso, vários estudos toxicológicos (toxicidade crônica e subcrônica, toxicidade reprodutiva e genotoxicidade) foram já realizados e mostraram que infusões de *T. majus* e extratos aquosos são seguros (8,9). No entanto, o uso de altas doses de extratos hidroetanólicos não deve ser recomendado para homens em idade reprodutiva e gestantes, pois altas doses desses extratos (> 300 mg.kg) têm interferido na função reprodutiva e gestação dos animais (4,8-10), embora o pré-tratamento com extrato de álcool metanólico de *T. majus* forneça proteção contra a toxicidade sanguínea e hepática induzida por maleato de dietilo em ratos, sendo esses resultados confirmados por exames histológicos (11). Nos últimos anos, a flor de *T. majus* tem sido amplamente utilizada na culinária como planta alimentícia não convencional (PANC) para decorar



Figure 1 - Vegetable soup containing 14 g of nasturtium flowers with their stems.

Figura 1 - Sopa de legumes contendo 14 g de flores de capuchinha com seus caules.

plant (UFP) to decorate plates, especially salads, and is characterized by a spicy flavour and as an important source of carotenoids (antheraxanthin, zeaxanthin, lutein, β -cryptoxanthin, zeinoxanthin, α -carotene, β -carotene, violaxanthin) and phenolic compounds (quercetin, myricetin, kaempferol, pelargonidin, delphinidin, cyanidin, derivatives of hydroxycinnamic acid) (12-16).

Terms such as "functional foods" or "nutraceuticals" are widely used in the marketplace. These foods are regulated by the Food and Drug Administration (FDA) under the authority of the Federal Food, Drug and Cosmetic Act, although they are not specifically defined by law. Thus, functional foods are not officially recognised as a regulatory category by the FDA in the United States and the same is true in Europe, where Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods applies. "General function" claims under Article 13.1 of the EC Nutrition and Health Claims Regulation refer to the role of a nutrient or substance in growth, development and bodily functions; psychological and behavioural functions; slimming and weight control, satiety or reduction of available energy from the diet. *T. majus* may be a candidate for a general function claim if a cause-effect relationship is demonstrated for a particular physiologic effect.

Considering its spontaneous worldwide use as an unconventional food plant based on a perceived presumption of safety by the consumer and supported by published information, an exploratory investigation was carried out to evaluate, for the first time, the acceptance of *T. majus* flowers in a diet by adding it in different plates, as well as their effects on corporal composition, biochemical and haematological parameters in healthy volunteers.

Materials and methods

Participants

The study was made with the voluntary participation of six healthy individuals, both sexes (one man and five women), ages between 21 and 71 years old (mean 52.50 ± 17.28 years old) recruited randomly from a convenience population asked to participate in sensorial tests by the researcher team. The acceptance prior to the study and adherence during the study of *T. majus* flowers in the diet were assessed through questionnaires

pratos, principalmente saladas, sendo caracterizada pelo sabor picante e como importante fonte de carotenoides (violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, zeinoxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno) e compostos fenólicos (quercetina, miricetina, kaempferol, pelargonidina, delphinidina, cianidina, derivados do ácido hidroxicinâmico) (12-16).

Termos como "alimentos funcionais" ou "nutracêuticos" são amplamente utilizados no mercado. Esses alimentos são regulamentados pela Food and Drug Administration (FDA) sob a autoridade da Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos, embora não sejam especificamente definidos por lei. Assim, os alimentos funcionais não são oficialmente reconhecidos como categoria regulatória pela FDA nos Estados Unidos e o mesmo acontece na Europa, onde se aplica o Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Dezembro de 2006 sobre nutrição e as alegações de saúde feitas em alimentos. As alegações de "função geral" nos termos do Artigo 13.1 do Regulamento CE sobre alegações nutricionais e de saúde referem-se ao papel de um nutriente ou substância no crescimento, desenvolvimento e funções corporais; funções psicológicas e comportamentais; emagrecimento e controle de peso, saciedade ou redução da energia disponível da dieta. A planta *T. majus* pode ser candidata para uma alegação de função geral se for demonstrada uma relação causa-efeito para um determinado efeito fisiológico.

Neste contexto, e considerando o uso espontâneo mundial como planta alimentícia não convencional, e com base na presunção de segurança percebida pelo consumidor apoiada em informações publicadas, desenhou-se um estudo de investigação exploratória para avaliar pela primeira vez a aceitação das flores de *T. majus* na dieta adicionando-a em diferentes tipos de pratos, bem como os seus efeitos na composição corporal, parâmetros bioquímicos e hematológicos em voluntários saudáveis.

Materiais e métodos

Participantes

O estudo foi feito com a participação voluntária de seis indivíduos saudáveis, de ambos os sexos (1 homem e 5 mulheres), com idades entre 21 e 71 anos (média $52,50 \pm 17,28$ anos) recrutados aleatoriamente de uma população de conveniência convidada a participar em testes sensoriais pela equipa de pesquisadores. A

in which the volunteers described their opinions on the visual and taste aspects of the prepared meals. The following recipes were included in the acceptance study before the test: soup, meat pie, roast, bread, cod, rice, juice, sweet pie, and gelatin. The parameters questioned were: i) Have you ever heard of unconventional food plants (UFPs)? ii) Do you usually consume (UFPs)? iii) Have you ever tasted this plant? After tasting, how do you describe it? iv) You can use the suggested terms to define the meals: *Appearance*: pleasant/unpleasant/other; *Color*; *Odor*: intense/mild/other; *Flavor*: bitter/sweet/spicy/other; *Texture*: velvety/grainy/liquid/pasty/other. All procedures observed the principles of good clinical practices from the Helsinki Declaration and respective amendments (17). The volunteers were included in the study after informed written consent. The inclusion criteria were the acceptance of nasturtium taste as pleasant and willingness to include it in their daily diet for one month. The following exclusion criteria were considered: (i) any possibility of pregnancy, (ii) men of reproductive age, (iii) any pre-existing disease. Additionally, the participants filled out an Informed Consent Form to indicate if they smoked and if they took any medications, and, if so, which ones.

Procedures

Firstly, the volunteers selected in accordance with the criteria described above were given detailed information about the objectives, methods, and their role in the project. After signing informed written consent, data were collected for all participants by applying a semiquantitative food frequency questionnaire (FFQ), already validated for a Portuguese population (18) defining a mean reference portion consumed over one year for all food groups. The questionnaire used was composed of a list of the nutrients belonging to the seven conventional food table/wheel groups (19) and one closed section with five categories of the frequencies of consumption of twelve high-rated items (dairy products, fatty-, lean- and cod- fish, white and red meat, olive oil, whole meal bread and cereals, eggs, sweets, vegetables and legumes, and fruits). Thereafter, the volunteers received the recipes for the preparation of the meals containing *T. majus* flowers. The ingestion was divided into three meals per day (breakfast, lunch and dinner) such that 20 g of flowers were ingested daily for 30 days. The portion of 20 g per day divided into

aceitação prévia ao estudo, e a adesão durante o estudo, das flores de *T. majus* na dieta, foram avaliadas por meio de questionários nos quais os voluntários descreviam suas opiniões sobre os aspectos visuais e gustativos das refeições preparadas. As seguintes receitas foram incluídas no estudo de aceitação antes do teste: sopa, torta de carne, assado, empanado, bacalhau, arroz, suco, torta doce e gelatina. Os parâmetros questionados foram: i) Já ouviu falar em plantas alimentícias não convencionais (PANCs)? ii) Costuma consumir PANCs? iii) Já provou esta planta? Após a degustação, como a descreve? iv) Pode utilizar os termos sugeridos para definir as refeições: *Aspetto*: agradável/desagradável/outro; *Cor*; *Odor*: intenso/leve/outro; *Sabor*: amargo/doce/picante/outro; *Textura*: aveludado/granulado/líquido/pastoso/outro. Todos os procedimentos observaram os princípios de boas práticas clínicas da Declaração de Helsínquia e respectivas alterações (17). Os voluntários foram incluídos no estudo após consentimento informado por escrito. Os critérios de inclusão foram: aceitar o gosto da capuchinha como agradável, estar disposto a incluí-la na dieta diária durante um mês. Foram considerados os seguintes critérios de exclusão: (i) qualquer possibilidade de gravidez, (ii) homens em idade reprodutiva, (iii) qualquer doença pré-existente. Além disso, os participantes preencheram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual informavam se fumavam, e se tomavam medicamentos e quais.

Procedimentos

Primeiramente, os voluntários selecionados de acordo com os critérios descritos acima foram informados detalhadamente sobre os objetivos, métodos e seu papel no projeto. Após a assinatura do consentimento informado por escrito, foram recolhidos dados de todos os participantes através da aplicação de um questionário semiquantitativo de frequência alimentar (QFA), já validado para a população portuguesa (18), definindo uma porção média de referência consumida ao longo de um ano para todos os grupos da tabela alimentar. O questionário utilizado foi composto por uma lista dos nutrientes pertencentes aos 7 grupos de convencionais da roda alimentar portuguesa (19) e uma seção fechada com cinco categorias de frequências de consumo onde foram extraídos 12 itens de alta classificação (laticínios, peixes gordos, peixes magros e bacalhau, carne branca e vermelha, azeite, pão integral e cereais, ovos, doces, verduras e legumes e frutas). Em seguida, os voluntários receberam as receitas para preparar as refeições contendo as flores de *T. majus*. A ingestão foi dividida em três refeições por dia (pequeno almoço, almoço e jantar) totalizando 20 g de flores ingeridas

the main meals was based on the recommendation for intake of salad leaves regularly used by the population (for example, lettuce, rocket), which is a minimum of 12-15 leaves per day (20).

Meals were diversified, for example, salads, soups, cakes, and sandwiches, among other foods. At two time points, one at time zero (before starting the consumption of *T. majus*) and the second at the end of the study, the body composition of all volunteers were evaluated by dual-energy x-ray absorptiometry (DXA Lunar Prodigy Advance - GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). The parameters measured were Body Fat Percentage (BFP), Visceral Adipose Tissue (VAT), and Subcutaneous Adipose Tissue (TAS). Heart rate and arterial pressure were also measured, and blood and urine samples were collected for clinical analysis (hematological and biochemical) in the Laboratory LEB (Lisbon, Portugal).

During the study, participants were asked for each meal: i) Did you like/dislike the addition of the *T. majus* flowers? Justify. ii) Do you think it could become a regular option in your diet or not? Justify. In addition, the volunteers were contacted daily by the researchers to report whether they had eaten the entire daily portion or if there were leftovers to quantify (in scoops), and to register their opinion about the meals, as well as to report any unwanted/unexpected effects.

Plant Material

The plant material was collected on 12-July, 2021, at Latitude 38.955834, Longitude - 8.994359, Dr Luis César Pereira Urban Park, Time: 14.40 h. The manual harvest was conducted by one technician and the sample was identified and deposited by the Curator of Vascular Plants, Herbário LISU - Jardim Botânico/Herbarium LISU - Botanical Garden, Museu Nacional de História Natural e da Ciência, Lisboa, Portugal (Voucher number: LISU270425). The material was provided fresh to the volunteers, separated in portions of 20 g (daily portion) and kept at -20 °C until consumption.

Statistics

Data are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM) were compared by T-test using GraphPadPrism 5[®] software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). A *p* value <0.05 was considered significant in all experiments.

diariamente durante 30 dias. A porção de 20 g por dia dividida em três frequências diárias nas principais refeições foi baseada na recomendação de ingestão diária de salada de folhas regularmente usadas pela população (por exemplo alface, rúcula), que é de 12-15 folhas por dia no mínimo (20).

As refeições eram diversificadas, por exemplo, saladas, sopas, bolos, sanduíches, entre outros. Em dois momentos, um no momento zero (antes de iniciar o consumo de *T. majus*) e outro no momento final do estudo, a composição corporal de todos os voluntários foi avaliada por absorciometria de raios-x de dupla energia (DXA Lunar Prodigy Advance - GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA). Os parâmetros medidos foram: Percentual de Gordura Corporal (BFP), Tecido Adiposo Visceral (TAV) e Tecido Adiposo Subcutâneo (TAS). A frequência cardíaca e a pressão arterial também foram medidas, e amostras de sangue foram recolhidas análises clínicas (hematológicas e bioquímicas) e de urina no Laboratório LEB (Lisboa, Portugal).

Durante o estudo, foi perguntado para cada refeição: i) Gostou/não gostou da adição das flores de *T. majus*? Justificar. ii) Considera que poderia tornar-se uma opção regular na sua dieta ou não? Justificar. Durante o estudo, os voluntários foram contatados diariamente pelos pesquisadores para relatar se haviam ingerido toda a porção diária ou se havia sobras para quantificar (em colheres), e sua opinião sobre as refeições, bem como quaisquer efeitos indesejados/inesperados.

Material vegetal

O material vegetal foi coletado no dia 12 de julho de 2021, na Latitude 38.955834, Longitude - 8.994359, Parque Urbano Dr. Luis César Pereira, Horário: 14h40. A colheita manual foi realizada por um único técnico e a amostra do material foi depositada e identificada pela Curadora de Plantas Vasculares, Herbário LISU - Jardim Botânico/Herbário LISU - Jardim Botânico, Museu Nacional de História Natural e da Ciência, Lisboa, Portugal. (Voucher número: LISU270425). O material foi fornecido para os voluntários separado em porções de 20 g. (porção diária) e mantidos na temperatura de -20°C até o momento do consumo.

Estatística

Os dados são relatados como média \pm erro padrão da média (SEM) e foram comparados pelo teste T usando o software GraphPadPrism 5[®] (software GraphPad, San Diego, CA, EUA). Um valor de *p* $<0,05$ foi considerado significativo em todos os experimentos.

Results and Discussion

A healthy diet intended to control the risk of obesity was identified for the study participants based on their dietary habits, characterized by abundant and variable consumption of plant foods, high consumption of cereals, olive oil as the main fat, low intake of red meat, and null to moderate consumption of wine (Table 1). It is well reported that the high consumption of red meat, saturated fatty acids, and cholesterol may be associated with increased risk of diabetes and mortality due to cardiovascular diseases (CVDs) (21-23). Moreover, Alzheimer's disease protection has been associated with a higher intake of vegetables, fruit, whole grains, fish, and legumes and with a lower intake of high-fat dairy, processed meat, and sweets (24). Epidemiological studies suggest a role of fruits and vegetables in protection against disease risks and aging (25), and for this reason the WHO considers that these should be the main foods to be ingested.

The analysis of parameters related to the body composition revealed that there was no observed effect on Body Fat Percentage (BFP), Visceral Adipose Tissue (VAT), and Subcutaneous Adipose Tissue (TAS) after *T. majus* ingestion (Figure 2).

Kim et al. (7) demonstrated in cell culture (3T3-L1 adipocytes) that ethanolic extract of *T. majus* decreases lipid accumulation and inhibits the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding proteins (CEBPs) and

Resultados e Discussão

Foi identificada a prática de uma alimentação saudável com o objetivo de controlar o risco de obesidade para os participantes do estudo com base nos seus hábitos alimentares, caracterizados pelo consumo abundante e variável de alimentos vegetais, alto consumo de cereais, azeite como principal gordura, baixo consumo de carne vermelha, e consumo de vinho nulo a moderado (Tabela 1). Está bem estabelecido que o alto consumo de carne vermelha, ácidos gordos saturados e colesterol podem estar associados ao aumento do risco de diabetes, cancro, Doenças Cardiovasculares (DCVs) (21-23). Além disso, a proteção da doença de Alzheimer foi associada a uma maior ingestão de vegetais, frutas, grãos integrais, peixes e legumes e a uma menor ingestão de laticínios com alto teor de gordura, carne processada e doces (24), e estudos epidemiológicos sugerem um papel frutas e hortaliças, na proteção contra riscos de doenças e envelhecimento (25), razão pela qual a OMS considera que estes devem ser os principais alimentos a serem ingeridos (26).

A análise dos parâmetros relacionados com a composição corporal revelou que não houve efeito no Percentual de Gordura Corporal (PB), Tecido Adiposo Visceral (TAV) e Tecido Adiposo Subcutâneo (TAS) após o consumo das flores de *T. majus* (Figura 2).

Kim et al. (7) mostraram em cultura de células (adipócitos 3T3-L1) que o extrato etanólico de *T. majus* diminui o acúmulo de lípidos e inibe a expressão do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding proteins (CEBPs) e fator de

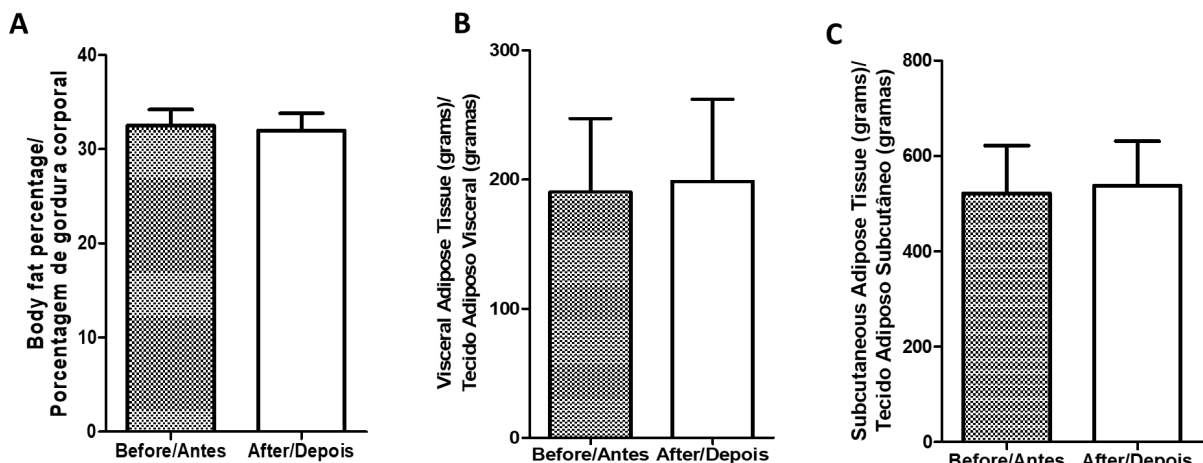


Figure 2 - Body fat mass before and after ingestion of meals containing *T. majus* flowers (20 g/day for 30 days). Data are expressed as mean \pm SD. Comparisons were done by t-test.

Figura 2 - Massa de gordura corporal antes e após a ingestão de refeições contendo flores de *T. majus* (20 g/dia por 30 dias). Os dados são expressos como média \pm DP. As comparações foram feitas pelo teste t.

Table 1 - Frequency of food consumption of participants.
Tabela 1- Frequência de consumo alimentar dos participantes.

Item	Frequency of Food Consumption / Frequência de Consumo Alimentar	Data / Dados
Number of meals / Número de refeições	per day / por dia	3 (100%)
Portion / Porção	per day / por dia	Medium (100%) / Média 100%
Dairy products / Laticínios	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	2 2 1 1
Fatty fish / Peixe gordo	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	4 1 1
Lean fish / Peixe magro	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	4 1 1
Cod fish / Bacalhau	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	2 2 2
White meat / Carne branca	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	3 1 2
Red meat / Carne vermelha	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	4 1 1
Eggs / Ovos	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	 1 2 3
Olive oil / Azeite de oliva	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	 3 3
Wholemeal bread and cereals / Pão integral e cereais	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	 3 3
Sweets / Doces	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	2 3 1
Vegetables and legumes / Vegetais e legumes	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	 1 5
Fruits / Frutas	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	 1 5
Wine / Vinho	Never-4x a year / Nunca-4x por ano >4x a year / >4x por ano 1x a month / 1x por mês 1-3x a month / 1-3x por mês 1-6x a week / 1-6x por semana 1-3x a day / 1-3x ao dia	4 2

sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (SREBF1), which are transcription factors involved in the regulation of the adipogenesis pathway in 3T3-L1 adipocytes. In the present study, neither an effect on lipid accumulation nor a significant reduction in the rate of blood triglyceride content resulting from intake of 20 g daily of *T. majus* flowers was observed. The results are likely not relatable and concern very different study models and experimental conditions but raise interest in future studies with an intake of *T. majus* by participants with a higher percentage of fat mass over a longer period of time.

All participants reported that meals prepared using the daily portion of 20 g of *T. majus* flowers had a pleasant taste and no participant left the study. Mlcek *et al.*, (27) also reported good acceptance of *T. majus* in a study that involved sensory evaluation of several species of edible flowers. In addition, during daily contact with the researchers responsible by study, no volunteer reported any changes in the number of bowel movements and stool consistency, urinary volume, or any other discomfort or unexpected change/symptom during the 30 days period of *T. majus* flowers ingestion and within two weeks after study completion. Likewise, no alterations were observed in rate heart and arterial pressure.

No changes were found when the hematological parameters were analyzed (Table 2), nor within the evaluated serum biochemical parameters used to assess liver, kidney, pancreas and metabolic functions (Table 3). The absence of toxicity of *T. majus* was formerly demonstrated by Araújo *et al.* (8), in a preclinical study using hydroethanolic extract by 90-day in rodents and lagomorphs. No changes in renal parameters, such as serum urea and serum creatinine, were also reported by Gasparoto Junior *et al.* (4), using ethanolic extract of *T. majus* and one of its main constituents, isoquercetin. Only for the biomarker C-Reactive Protein (CRP) a significant decrease was observed after adding *T. majus* flowers to the diet (Table 3) from 1.18 ± 0.16 mg/dL to 0.73 ± 0.04 mg/dL although in the range of healthy levels. It is well known that CRP is an acute-phase protein that has been associated with response to injury and systemic inflammation (28). Nowadays, epidemiological studies have shown a consistent

transcrição de ligação ao elemento regulador de estero1 (SREBF1), que são fatores de transcrição envolvidos na regulação da via de adipogênese em adipócitos 3T3-L1. No presente estudo, não foi observado efeito na acumulação de lípidos nem redução significativa do teor de triglicerídeos no sangue resultante da ingestão de 20 g diários de flores de *T. majus*. Os resultados provavelmente não são relacionáveis pois dizem respeito a modelos de estudo e condições experimentais muito diferentes, mas despertam interesse para estudos futuros com ingestão de *T. majus* por um período mais longo, por participantes com maior percentagem de massa gorda.

Todos os participantes relataram que as refeições preparadas com a porção diária de 20 g de flores de *T. majus* tinham sabor agradável e nenhum abandonou o estudo. Mlcek *et al.* (27) também relataram boa aceitação de *T. majus* num estudo que envolveu avaliação sensorial de várias espécies de flores comestíveis. Adicionalmente, nenhum voluntário relatou durante o contato diário com os investigadores responsáveis pelo estudo qualquer alteração no número de evacuações e consistência das fezes, volume urinário ou qualquer outro desconforto ou alteração/sintoma inesperado durante o período de 30 dias de ingestão de flores de *T. majus* e no intervalo de 2 semanas após a conclusão. Também não foram observadas alterações na frequência cardíaca e na pressão arterial.

Não foram encontradas alterações quando analisados os parâmetros hematológicos (Tabela 2) e quando avaliados os parâmetros bioquímicos séricos utilizados para avaliar as funções hepática, renal, pancreática e metabólica (Tabela 3). A ausência de toxicidade de *T. majus* foi anteriormente demonstrada por Araújo *et al.* (8), em estudo pré-clínico utilizando extrato hidroetanólico por 90 dias em roedores e lagomorfos. Gasparoto Junior *et al.* (4) também descreveram a inexistência de qualquer alteração nos parâmetros renais, como ureia sérica e creatinina sérica, utilizando extrato etanólico de *T. majus* e um dos seu principais constituintes, a isoquercetina. No presente estudo, apenas para o biomarcador Proteína C-Reativa (PCR) foi observada uma diminuição significativa após a adição de flores de *T. majus* à dieta (Tabela 3) de $1,18 \pm 0,16$ mg/dL para $0,73 \pm 0,04$ mg/dL embora na faixa de níveis saudáveis. É bem conhecido que a PCR é uma proteína de fase aguda que tem sido associada à resposta subsequente a uma lesão e inflamação sistêmica (28). Atualmente, diversos estudos epidemiológicos têm mostrado uma associação consistente entre o risco de doença cardiovascular e as concentrações de PCR.

Table 2 - Hematologic parameters before and after ingestion of meals containing 20 g of *T. majus* flowers/daily for 30 days.

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos antes e após ingestão de refeições contendo 20 g de flores de *T. majus*/dia por 30 dias

Hematologic parameters / Parâmetros hematológicos	Before / Antes	After / Depois
Erythrocytes / Eritrócitos	4.32 ± 0.11x10 ⁶ /mm ³	4.33 ± 0.14 x 10 ⁶ /mm ³
Hemoglobin / Hemoglobina	13.41 ± 0.40 g/dL	13.21 ± 0.43 g/dL
Hematocrit / Hematócrito	39.68 ± 0.98%	39.60 ± 1.13%
Mean Corpuscular Volume / Volume Corpuscular Médio	91.61 ± 0.98 fL	91.38 ± 0.96 fL
Mean Corpuscular Hemoglobin / Hemoglobina Corpuscular Média	30.91 ± 0.42 pg	30.50 ± 0.58 pg
Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration / Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média	33.73 ± 0.33 g/dL	33.38 ± 0.35 g/dL
Red Cell Distribution Width / Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos	13.31 ± 0.33 %	13.43 ± 0.22 %
Leukocytes / Leucócitos	5.25 ± 0.52 x 10 ³ /mm ³	6.01 ± 0.75 x 10 ³ /mm ³
Neutrophils / Neutrófilos	51.21 ± 3.62 %	59.10 ± 3.99 %
Eosinophils / Eosinófilos	3.00 ± 0.59 %	3.06 ± 0.61 %
Basophils / Basófilos	0.85 ± 0.20 %	0.66 ± 0.10 %
Lymphocytes / Linfócitos	38.81 ± 3.25 %	32.08 ± 3.25 %
Monocytes / Monócitos	6.13 ± 0.22 %	5.58 ± 0.25 %
Platelets / Plaquetas	231.5 ± 15.84 x 10 ³ /mm ³	228.0 ± 12.40 x 10 ³ /mm ³

Data are reported as mean ± standard error of the mean (SEM) were compared by t-test using / Os dados são relatados como média ± erro padrão da média (SEM) e foram comparados pelo teste t.

Table 3 - Biochemical parameters before and after ingestion of meals containing 20 g of *T. majus* flowers/daily for 30 days.

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos antes e após a ingestão de refeições contendo 20 g de flores de *T. majus*/dia por 30 dias.

Biochemical parameters / Parâmetros bioquímicos	Before / Antes	After / Depois
Blood Uric Acid / Ácido Úrico Sanguíneo	8.85 ± 4.83 mg/dL	3.95 ± 0.40 mg/dL
Blood Creatinine / Creatinina Sanguínea	0.73 ± 0.03 mg/dL	0.75 ± 0.04 mg/dL
Cholesterol / Colesterol	209.66 ± 15.64 mg/dL	210.16 ± 14.05 mg/dL
HDL Cholesterol / Colesterol HDL	69.5 ± 2.30 mg/dL	66.66 ± 3.02 mg/dL
Triglycerides / Triglicerídeos	56.66 ± 7.03 mg/dL	74.50 ± 16.97 mg/dL
Thyroxine (T4) / Tiroxina	14.19 ± 0.81 pmol/L	14.85 ± 0.44 pmol/L
Thyroid-Stimulating Hormone / Hormona Tireoestimulante	1.73 ± 0.25 µUI/mL	1.82 ± 0.30 µUI/mL
Alanine Aminotransferase (ALT) / Alanina Aminotransferase (ALT)	16.00 ± 1.06 U/L	15.33 ± 1.38 U/L
Aspartate Aminotransferase (AST) / Aspartato Aminotransferase (AST)	19.66 ± 1.47 U/L	17.50 ± 0.61 U/L
Gamma-glutamyltransferase (GGT)	18.50 ± 1.52 U/L	21.00 ± 1.50 U/L
Glycemia / Glicemia	84.00 ± 5.10 mg/dL	79.83 ± 6.05 mg/dL
Glycated hemoglobin (HbA1c) / Hemoglobina Glicada (HbA1c)	5.40 ± 0.06%	5.43 ± 0.08%
Hemo Sedimentation rate / Velocidade de Hemossedimentação	5.67 ± 0.66 mm/h	7.17 ± 1.10 mm/h
C-Reactive Protein (CRP) / Proteína C-reativa (PCR)	1.18 ± 0.16 mg/dL	0.73 ± 0.04 mg/dL*
Urine pH / pH urinário	6.08 ± 0.32	6.00 ± 0.40

Data are reported as mean ± standard error of the mean (SEM) were compared by T-test using / Os dados são relatados como média ± erro padrão da média (SEM) e foram comparados pelo teste t.

association between cardiovascular disease risk and CRP concentrations. Elevated levels of CRP are related to inflammatory processes which are related to vascular cell activation, thrombosis, and accumulation of lipids and atherosclerotic process (29). *T. majus* contains a variety of bioactive compounds which are also known for their anti-inflammatory and antioxidant properties, including ascorbic acid (Vitamin C), flavonoids, carotenoids, and other polyphenolics (30). Furthermore, aqueous extracts of *T. majus* significantly suppressed the production of inflammatory mediators such as TNF-alpha, Prostaglandin E2 (PGE2), and leukotriene LTB4 in human blood cells (31). Another group of interesting substances from *T. majus* are the thermostable glucosinolates (32,33), such as glucotropaeolin, which is metabolized into benzyl isothiocyanate and has significant antitumor activity (34, 35). Thus, monitoring CRP before and after ingestion of *T. majus* for a longer time period and within a more representative group of human volunteers may contribute to a better understanding of the reason and significance of the decrease observed in our study.

Only about 103 plant species are responsible for 90% of the world's food supply despite estimates showing that there are about 27,000 plant food species (36). Hence, there are many species with alimentary potential which are neglected. Many of these species were used in the past, but their use has been abandoned with the industrialization and urbanization processes. In the last years, several of these species, including *T. majus*, have been highlighted as nutritious UFPs with high impact in Latin- and Ibero-American countries, namely Brazil and Portugal (12). Thus, more studies on its acceptance, safety, and nutritional value are important to understand any benefit/risk relationship for its use in the human diet.

The European Green Deal has the "Farm to Fork" strategy as a central focus to make food systems fair, sustainable, and healthy. The role of UFPs in this path is indisputable, but increasing the adoption of healthy and sustainable diets does not mean adhering to all the available UFPs offered without any criteria (37). Hence, the need to anticipate emerging risks for edible flower consumption has been brought to the EFSA's (European Food Safety Authority) agenda. The guarantee of

A PCR é um marcador para processos inflamatórios que podem estar envolvidos em todos os estágios, influenciando diretamente o processo aterosclerótico, ativação de células vasculares, trombose e acumulação de lípidos (29). *T. majus* contém uma variedade de compostos bioativos que também são conhecidos pelo seu potencial anti-inflamatório e antioxidante, incluindo ácido ascórbico (Vitamina C), flavonóides, carotenóides e outros polifenóis (30). Tran et al. (31) demonstraram que extratos aquosos de *T. majus* exerceram forte supressão dependente da concentração na libertação de TNF-alfa desencadeada por LPS e sinalização da via COX, incluindo a síntese de PGE2. Além disso, o *T. majus* é rico em glucosinolatos (32,33) como a glucotropaeolina que é metabolizada em isotiocianato de benzilo, que são moléculas termoestáveis e que possuem atividades anticancerígenas (34, 35). Perante esta informação, é importante reconhecer que a monitorização da PCR antes e após a ingestão de *T. majus* por um período maior de tempo e para um grupo mais representativo de voluntários humanos pode contribuir para entender melhor o motivo e significância da diminuição observada neste estudo.

Numa perspectiva de sustentabilidade, estima-se que existam cerca de 27 mil espécies vegetais com potencial alimentar no mundo, no entanto, apenas cerca de 103 espécies vegetais são responsáveis por 90% da oferta mundial de alimentos (36). Ou seja, existem muitas espécies com potencial alimentar que são negligenciadas. Muitas foram utilizadas no passado, mas com os processos de industrialização e urbanização o seu uso foi abandonado. Nos últimos anos, várias destas espécies têm-se destacado como PANCs nutritivas com elevado impacto em países da América Latina e Ibero-americanos, nomeadamente Brasil e Portugal, sendo a *T. majus* uma delas (12). Percebe-se, assim, que são importantes mais estudos sobre a sua aceitação, segurança e valor nutricional para entender qualquer relação benefício/risco para seu uso na dieta humana.

No contexto da globalização, a "Estratégia da quinta ao prato" está no centro do Pacto Verde Europeu para tornar os sistemas alimentares justos, sustentáveis e saudáveis. O papel das PANCs nesse caminho é indiscutível, mas aumentar a adoção de dietas saudáveis e sustentáveis não significa aderir a todas as PANCs disponíveis oferecidas sem nenhum critério (37). A necessidade de antecipar os riscos emergentes para o consumo de flores comestíveis foi trazida para a agenda da EFSA (European Food Safety Authority). A garantia de informações claras é um requisito do consumidor

clear information is a consumer demand which shall be satisfied, a purpose that should unite universities/researchers and authorities, applying the Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for the safety assessment of botanicals and botanical preparations published by EFSA (38). As an example of UFPs approach, we recall that EFSA was asked very recently by the European Commission whether there are duly reasoned safety objections to the placing on the market dried flowers of *Clitoria ternatea* L. as a traditional food (TF), known as butterfly pea, from a third country within the European Union (39). EFSA noted the *in vitro* haemolytic and cytotoxic effects reported for some cyclotides (circular proteins) as well as data indicating possible effects on the immune system, and uterus (although these cyclotides responsible for these effects have not been detected in *Clitoria ternatea*). Given the potential exposure to cyclotides resulting from the use of *C. ternatea* for the preparation of herbal infusions and the unknown toxicological profile of the cyclotides present in these edible flowers, the EFSA considered that could have some risk to human health. Thus, EFSA raised safety objections to the placing on the EU market of the dried flowers of *Clitoria ternatea*.

Considering the UFP *T. majus*, the *a priori* guidance of the EFSA for the safety assessment of plants and botanical preparations intended to be used as ingredients in food supplements applies (40), which provides that plants or botanical preparations for which an adequate body of knowledge exists can benefit from a 'presumption of safety (QPS)' without the need for further testing. In this situation, the QPS decision for *T. majus* can be based on available data on the history of safe use at traditional exposure levels, i.e., data regarding the safety of aqueous extracts of *T. majus* and consumption of the whole flower, with no reports of adverse effects (41).

In the particular case of *T. majus* flowers, there is evidence for the acceptable safety of its use as a wholly natural ingredient or dietary supplement in daily meals, well supported by studies of aqueous extracts (typical culinary medium) in animals and here in humans for the first time. However, since there are warnings in the literature about potential additional concerns related to the reproductive effects of ethanol extracts, it is advisable that further research should be carried out in search of a substance or group of substances for which a value should be defined as a limit related to observable health effects. Taking into account that the existing

que deve ser atendido, propósito que deve unir universidades/pesquisadores e autoridades, aplicando a abordagem da Presunção de Segurança Qualificada (QPS) para a avaliação de segurança de preparações botânicas publicadas pela EFSA (38). Como exemplo para a abordagem das PANCs, a EFSA foi questionada muito recentemente pela Comissão Europeia se existiam objeções de segurança devidamente fundamentadas à colocação no mercado de flores secas de *Clitoria ternatea* L. alimento tradicional conhecido como ervilha borboleta por parte de um país terceiro da União Europeia (39). A EFSA observou efeitos hemolíticos e citotóxicos *in vitro* relatados para alguns ciclotidos (proteínas circulares), bem como dados indicando possíveis efeitos no sistema imunológico e no útero (embora os ciclotidos responsáveis por estes efeitos não tenham sido detectados em *Clitoria ternatea*). Mesmo assim, dada a potencial exposição a ciclotidos resultante do uso de *C. ternatea* para a preparação de infusões de ervas e o perfil toxicológico desconhecido dos ciclotidos presentes nessas flores comestíveis, a EFSA considerou que poderia existir algum risco para a saúde humana. Assim, a EFSA levantou objeções de segurança à colocação no mercado da UE das flores secas de *Clitoria ternatea*.

Considerando a PANC *T. majus*, aplica-se a orientação *a priori* da EFSA para a avaliação da segurança de plantas e preparações botânicas destinadas a serem usadas como ingredientes em suplementos alimentares (40), que prevê que plantas ou preparações botânicas para as quais existe um corpo de conhecimento adequado podem beneficiar de uma "presunção de segurança (QPS)" sem necessidade de mais testes. Nesta situação, a decisão do QPS para *T. majus* pode ser baseada em dados disponíveis sobre o histórico de uso seguro em níveis de exposição tradicionais, ou seja, dados seguros para extratos aquosos de *T. majus* e consumo da flor inteira, sem relato de efeitos adversos (41).

No caso particular das flores de *T. majus*, há evidências da segurança aceitável de seu uso como ingrediente totalmente natural ou suplemento alimentar nas refeições diárias, bem apoiada por estudos de extratos aquosos (meio culinário típico) em animais e aqui em humanos pela primeira vez. No entanto, uma vez que existem alertas na literatura sobre potenciais preocupações adicionais relacionadas com os efeitos reprodutivos dos extratos etanólicos, é aconselhável que mais pesquisas sejam realizadas em busca de uma substância ou grupo de substâncias para o qual um valor deva ser definido como limite relacionado com os efeitos observáveis na saúde. Tendo em conta

quality and toxicity data are insufficient to derive such a value, and *T. majus* concentrates obtained in alcohol seem unsuitable for unrestricted food use, the safety assessment of *T. majus* should be further developed for its various extracts.

Finally, it is important to recognize that, as this is a pilot exploratory work, there are some limitations in this study: 1) the limited number of participants (six) whose recruitment has been harmed by a study in pandemic phase; 2) the heterogeneous distribution of sex and age of the participants; 3) the lack of a control group and 4) lack of estimation of energy and nutrient intake, although the frequency of consumption and food portion size were already evaluated.

Conclusion

Results obtained indicate that *T. majus* flowers are well accepted when added to different meals and corroborate the information in the literature about its use being safe for humans. This is the first exploratory study referring to the safety of consumption of *T. majus* flowers in healthy humans, alerting to the importance of designing additional, more complete studies to confirm the promising results in a larger number of volunteers.

que os dados de qualidade e toxicidade existentes são insuficientes para derivar tal valor, e os concentrados de *T. majus* obtidos em álcool não parecem adequados para uso alimentar irrestrito, a avaliação de segurança de *T. majus* deve ser desenvolvida para os seus diversos extratos.

Por fim, é importante reconhecer que, por se tratar de um trabalho piloto exploratório, existem algumas limitações neste estudo: 1) número limitado de participantes (seis) cujo recrutamento foi prejudicado por um estudo em fase de pandemia; 2) distribuição heterogênea de sexo e idade dos participantes; 3) falta de um grupo controle e 4) falta de estimativa da ingestão de energia e nutrientes, embora a frequência de consumo e o tamanho da porção dos alimentos já tenham sido avaliados.

Conclusão

Os resultados obtidos indicam que as flores de *T. majus* são bem aceitas quando adicionadas a diferentes refeições e corroboram as informações da literatura sobre seu uso ser seguro para humanos. Este é o primeiro estudo exploratório referente à segurança do consumo de flores de *T. majus* em humanos saudáveis, alertando para a importância de serem desenhados estudos adicionais mais completos para confirmar os resultados promissores em um número maior de voluntários.

Authors' Contributions Statement

SFA, MCC, MGLS, and RGT undertook the experimental procedures. SFA, RGT, APS, LMR, and MCC executed and discussed the statistical analysis and wrote and corrected the manuscript in its final version.

Acknowledgements

This research is funded by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) through grant UIDB/04567/2020 to CBIOS. Sérgio Faloni de Andrade is funded by Foundation for Science and Technology (FCT) - Scientific Employment Stimulus contract with the reference number CEEC/CBIOS/PMHD/2018.

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 de Contribuições dos Autores

As contribuições dos autores foram: SFA, MCC, MGLS e RGT realizaram procedimentos experimentais. SFA, RGT, APS, LMR e MCC realizaram a análise estatística, redigiram e corrigiram o manuscrito em sua versão final.

Agradecimentos

Esta investigação é financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através da bolsa UIDB/04567/2020 ao CBIOS. Sérgio Faloni de Andrade é financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) - Contrato de Estímulo ao Emprego Científico com a referência CEEC/CBIOS/PMHD/2018.

Conflito de interesses

Os editores envolvidos na autoria deste manuscrito não tiveram participação no 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.

References / Referências

- Jakubczyk, K., Janda, K., Watychowicz, K., Lukasiak, J., & Wolska, J. (2018). Garden nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) - a source of mineral elements and bioactive compounds. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 69(2), 119-126.
- Tropaeolum majus*: info from PIER (PIER species info). (2021). Retrieved 7 December 2021, from http://www.hear.org/pier/species/tropaeolum_majus.htm
- Tropaeolum majus* L. (2021). Retrieved 7 December 2021, from <https://www.gbif.org/species/2889934>
- Gomes, C., Lourenço, E., Liuti, É., Duque, A., Nihi, F., & Lourenço, A. et al. (2012). Evaluation of subchronic toxicity of the hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* in Wistar rats. *Journal Of Ethnopharmacology*, 142(2), 481-487. doi: <https://10.1016/j.jep.2012.05.023>
- Gasparotto Junior, A., Gasparotto, F., Lourenço, E., Crestani, S., Stefanello, M., & Salvador, M. et al. (2011). Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(2), 363-372. doi: <https://10.1016/j.jep.2010.12.026>
- Barboza, L., Prando, T., Dalsenter, P., Gasparotto, F., Gasparotto, F., & Jacomassi, E. et al. (2014). Prolonged Diuretic Activity and Calcium-Sparing Effect of *Tropaeolum majus*: Evidence in the Prevention of Osteoporosis. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*, 2014, 1-6. doi: <https://10.1155/2014/958291>
- Kim, G., Kim, J., Kim, G., & Choi, S. (2017). Anti-adipogenic effects of *Tropaeolum majus* (nasturtium) ethanol extract on 3T3-L1 cells. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1339555. doi: <https://10.1080/16546628.2017.1339555>
- Araújo, V., Andreotti, C., Reis, M., de Lima, D., Pauli, K., & Nunes, B. et al. (2018). 90-Day Oral Toxicity Assessment of *Tropaeolum majus* L. in Rodents and Lagomorphs. *Journal Of Medicinal Food*, 21(8), 823-831. doi: <https://10.1089/jmf.2017.0128>
- Traesel, G., Machado, C., Tirloni, C., Menetrier, J., dos Reis Livero, F., & Lourenço, E. et al. (2017). Safety Assessment and Botanical Standardization of an Edible Species from South America. *Journal of Medicinal Food*, 20(5), 519-525. doi: <https://10.1089/jmf.2016.0143>
- Khorsandi, L., & Oroojan, A. (2018). Toxic effect of *Tropaeolum majus* L. leaves on spermatogenesis in mice. *JBRA Assisted Reproduction*. doi: <https://10.5935/1518-0557.20180035>
- Korim, K., Arbid, M., & El-Gendy, N. (2010). The protective role of *Tropaeolum majus* on blood and liver toxicity induced by diethyl maleate in rats. *Toxicology Mechanisms And Methods*, 20(9), 579-586. doi: <https://10.3109/15376516.2010.518171>
- Mazon, S., Menin, D., Cella, B., Lise, C., Vargas, T., & Daltoé, M. (2020). Exploring consumers' knowledge and perceptions of unconventional food plants: case study of addition of *Pereskia aculeata* Miller to ice cream. *Food Science And Technology*, 40(1), 215-221. doi: <https://10.1590/fst.39218>
- Garzón, G., & Wrolstad, R. (2009). Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*). *Food Chemistry*, 114(1), 44-49. doi: <https://10.1016/j.foodchem.2008.09.013>
- Mlcek, J., & Rop, O. (2011). Fresh edible flowers of ornamental plants – A new source of nutraceutical foods. *Trends In Food Science & Technology*, 22(10), 561-569. doi: <https://10.1016/j.tifs.2011.04.006>
- Navarro-González, I., González-Barrio, R., García-Valverde, V., Bautista-Ortín, A., & Periago, M. (2014). Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterisation of Phenolic Compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn. *International Journal Of Molecular Sciences*, 16(1), 805-822. doi: <https://10.3390/ijms16010805>
- Niizu, P., & Rodriguez-Amaya, D. (2006). Flowers and Leaves of *Tropaeolum majus* L. as Rich Sources of Lutein. *Journal Of Food Science*, 70(9), S605-S609. doi: <https://10.1111/j.1365-2621.2005.tb08336.x>
- World Medical Association Declaration of Helsinki. (2013). *JAMA*, 310(20), 2191.
- Lopes, C., Aro, A., Azevedo, A., Ramos, E., & Barros, H. (2007). Intake and Adipose Tissue Composition of Fatty Acids and Risk of Myocardial Infarction in a Male Portuguese Community Sample. *Journal of the American Dietetic Association*, 107(2), 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2006.11.008>
- Roda dos Alimentos, PNPAS. (2022). Retrieved 2 January 2022, from <https://alimentacaosaudavel.dgs.pt/roda-dos-alimentos/>
- Silva, C.L. (2011). Repositório Institucional da UnB: Página inicial. https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/9899/1/2011_ClislianLuziaSilva.pdf
- Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Gatenby, P., Gerbi, V., & Janssens, J. et al. (2013). Cancer prevention in Europe. *European Journal Of Cancer Prevention*, 22(1), 90-95. doi: 10.1097/cej.0b013e328354d2d7
- Da Silva, A., Valente, A., Chaves, C., Matos, A., Gil, A., & Santos, A. et al. (2018). Characterization of Portuguese Centenarian Eating Habits, Nutritional Biomarkers, and Cardiovascular Risk: A Case Control Study. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2018, 1-10. doi: 10.1155/2018/5296168
- Pereira da Silva, A., Costa, M., Aguiar, L., Matos, A., Gil, Á., & Gorjão-Clara, J. et al. (2020). Impact on Longevity of Genetic Cardiovascular Risk and Lifestyle including Red Meat Consumption. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2020, 1-14. doi: 10.1155/2020/130541324.
- Mosconi, L., Murray, J., Davies, M., Williams, S., Pirraglia, E., & Spector, N. et al. (2014). Nutrient intake and brain biomarkers of Alzheimer's disease in at-risk cognitively normal individuals: a cross-sectional neuroimaging pilot study. *BMJ Open*, 4(6), e004850-e004850. doi: 10.1136/bmjopen-2014-004850
- Virmani, A., Pinto, L., Binienda, Z., & Ali, S. (2013). Food, Nutrigenomics, and Neurodegeneration—Neuroprotection by What You Eat!. *Molecular Neurobiology*, 48(2), 353-362. doi: 10.1007/s12035-013-8498-3
- WHO, "Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases," World Health Organ Technical Report Series, vol. 916, pp. 1–149, 2003
- Mlcek, J., Plaskova, A., Jurikova, T., Sochor, J., Baron, M., & Ercisli, S. (2021). Chemical, Nutritional and Sensory Characteristics of Six Ornamental Edible Flowers Species. *Foods*, 10(9), 2053. <https://doi.org/10.3390/foods10092053>
- Yao, Z., Zhang, Y., & Wu, H. (2019). Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation. *Inflammation Research*, 68(10), 815-823. doi: 10.1007/s00011-019-01269-1
- Avan, A., Tavakoly Sany, S., Ghayour-Mobarhan, M., Rahimi, H., Tajfard, M., & Ferns, G. (2018). Serum C-reactive protein in the prediction of cardiovascular diseases: Overview of the latest clinical studies and public health practice. *Journal Of Cellular Physiology*, 233(11), 8508-8525. doi: 10.1002/jcp.26791
- Dujmović, M., Radman, S., Opačić, N., Fabek Uher, S., Mikuličin, V., Voća, S., & Šic Žlabur, J. (2022). Edible Flower Species as a Promising Source of Specialized Metabolites. *Plants*, 11(19), 2529. <https://doi.org/10.3390/plants1119252>
- Tran, H., Márton, M., Herz, C., Maul, R., Baldermann, S., Schreiner, M., & Lamy, E. (2016). Nasturtium (Indian cress, *Tropaeolum majus* nanum) dually blocks the COX and LOX pathway in primary human immune cells. *Phytomedicine*, 23(6), 611-620. doi: 10.1016/j.phymed.2016.02.025
- Breme K, Fernandez X, Meierhenrich UJ, Brevard H, Joulain D. Identification of new, odor-active thiocarbamates in cress extracts and structure-activity studies on synthesized homologues. *J Agric Food Chem*. 2007 Mar 7;55(5):1932-8. doi: 10.1021/jf062856e. Epub 2007 Feb 2. PMID: 17269787
- Barba, F. J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelifa, A., Zhu, Z., & Koubaa, M. (2016). Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. *Frontiers in Nutrition*, 3. <https://doi:10.3389/fnut.2016.00024>
- Soundararajan P, Kim JS. Anti-Carcinogenic Glucosinolates in Cruciferous Vegetables and Their Antagonistic Effects on Prevention of Cancers. *Molecules*. 2018; 23(11):2983. <https://doi.org/10.3390/molecules23112983>

35. Platz, S., Kühn, C., Schiess, S., Schreiner, M., Kemper, M., Pivovarova, O., Pfeiffer, A. F. H., & Rohn, S. (2015). Bioavailability and metabolism of benzyl glucosinolate in humans consuming Indian cress (*Tropaeolum majus* L.). *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(3), 652–660. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500633>
36. Leal, M., Alves, R., & Hanazaki, N. (2018). Knowledge, use, and disuse of unconventional food plants. *Journal Of Ethnobiology And Ethnomedicine*, 14(1). doi: 10.1186/s13002-018-0209-8
37. The European Green Deal: opportunities to anticipate and address emerging risks. (2022). Retrieved 2 January 2022, from <https://summitdialogues.org/dialogue/18790>
38. EFSA (European Food Safety Authority), (2014). Scientific Opinion on a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for the safety assessment of botanicals and botanical preparations. *EFSA Journal*, 12(3). doi: <https://10.2903/j.efsa.2014.3593>
39. EFSA (European Food Safety Authority), (2022). Notification of dried flowers of *Clitoria ternatea* L. as a traditional food from a third country pursuant to Article 14 of Regulation (EU) 2015/2283. EFSA supporting publication 2022:EN-7084. 17pp. doi:10.2903/sp.efsa.2022.EN-7084 ISSN: 2397-8325
40. EFSA (European Food Safety Authority), (2009). Guidance on Safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as ingredients in food supplements. *EFSA Journal*, 7(9). doi: <https://10.2903/j.efsa.2009.1249>
41. EFSA Scientific Committee, More, S.J., Bampidis, V., Benford, D., Bragard, C., Halldorsson, T.I., Hernandez-Jerez, A.F., Hougaard, B.S., Koutsoumanis, K.P., Machera, K., Naegeli, H., Nielsen, S.S., Schlatter, J.R., Schrenk, D., Silano, V., Turck, D., Younes, M., Gundert-Remy, U., Kass, G.E.N., Kleiner, J., Rossi, A.M., Serafimova, R., Reilly, L. and Wallace, H.M. (2019). Guidance on the use of the Threshold of Toxicological Concern approach in food safety assessment. *EFSA Journal*;17(6):5708, 17 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5708>

Grape Pomace Flour: from winemaking by-product to sustainable alternative for health benefits

Farinha de Bagaço de Uva: de subproduto da vinificação a alternativa sustentável para benefícios à saúde

Raphaela Cassol Piccoli ¹, Paula Pereira ^{2,3,4}, Marisa Nicolai ², Maria Lídia Palma ²,
Francieli Moro Stefanello ⁵, Rejane Tavares Giacomelli ^{1,2,5*}

¹Postgraduation Program in Food and Nutrition, College of Nutrition, Federal University of Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brazil; ²Center for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona, 1749-024 Lisboa, 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 1749-024 Lisboa, Portugal; ⁵Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Science (CCQFA), Federal University of Pelotas, Campus Universitário S/N, 96160-000, Pelotas-RS, Brazil

corresponding author / autor para correspondência: tavares.rejane@gmail.com

Abstract

Grape pomace (GP) is a by-product of wine industry that despite its substantial bioactive compounds content is vastly discarded during winemaking process. The present review aimed to summarize recent evidence on the biological, metabolic, nutritional and sensory properties of grape pomace flour (GPF) supplemented foods administered to different models. In this sense, the search was carried out in the electronic databases “PubMed”, “Google Scholar” and “SCOPUS” and comprised studies that used grape pomace as its totality for the flour productions. GPF demonstrated a high dietary fiber and polyphenolic content that caused notable changes in organoleptic characteristics such as the color and texture of fortified foods and metabolic features. In some pre-clinical and clinical studies, an increase in antioxidant and anti-glycemic profile and a decrease in blood pressure have been observed, suggesting GPF as a possible health promoting agent when used as a food fortifier.

Keywords: grape pomace flour, fortified foods, phenolic compound, dietary fiber

Resumo

O bagaço de uva (BU) é um subproduto da indústria vinícola que, apesar de seu conteúdo em compostos bioativos ser significativo, é amplamente descartado durante o processo de vinificação. A presente revisão teve como objetivo resumir evidências recentes sobre as propriedades biológicas, metabólicas, nutricionais e sensoriais de alimentos suplementados com farinha de bagaço de uva (FBU) na sua totalidade administrados a diferentes modelos. Nesse sentido, a pesquisa foi realizada nas bases de dados eletrônicas “PubMed”, “Google Scholar” e “SCOPUS” e compreendeu estudos que utilizaram bagaço de uva na sua totalidade para a produção de farinha. A FBU demonstrou ter um elevado teor de fibra alimentar e polifenóis que originou mudanças consideráveis nas características organolépticas, como na cor e textura de alimentos fortificados, e parâmetros metabólicos. Nalguns estudos pré-clínicos e clínicos, observou-se um aumento no perfil antioxidante e anti glicêmico e um decréscimo na pressão arterial, o que sugere a FBU como um possível agente promotor da saúde quando usado como fortificante de alimentos.

Palavras-chave: farinha do bagaço de uva, alimentos fortificados, compostos fenólicos, fibra dietética

Introduction

Grapes (*Vitis vinifera*) are one of the most extensively cultivated crops all around the world. According to the International Organization of Vine and Wine (1), the world's production of fresh grapes in 2019 was approximately 85 million tons. Over 50% of the harvest of this product is used in wine production. After juice extraction, about 25% of the processed grape is essentially a solid waste called wine pomace or grape pomace (GP) (2,3). This residue results from the pressing of fresh grapes, fermented or not, during the winemaking process, and is composed of pressed grapes, peels, seeds, small pieces of stalks, and yeast cells (3-5).

Although the GP presents different uses, such as fertilization, it is still the main raw material for the production of alcohol, pomace spirit, and alcoholic beverages and used in animal feed (3). A large amount of this by-product is deliberately discarded annually by the industry, resulting in serious problems to the environment, such as soil and water pollution. On the other hand, GP contains significant amounts of dietary fiber and phytochemicals such as flavonoids, (for example catechins and anthocyanins), stilbenes and phenolic acids, which remain in the pomace after the winemaking process (6,7).

Considering the environmental context, the most sustainable alternative of the reuse of GP seems to be in the form of grape pomace flour (GPF), which is obtained after bagasse drying and milling (5). Recently, the effects of GPF been studied at the metabolic level and in its use as a fortifying ingredient in foods, with a view to improving sensory properties, increasing nutritional value and as a potential health-promoting agent (7).

Thus, the aim of this review is to summarize recent evidence on the biological, metabolic, nutritional, and sensory properties of GPF-supplemented foods and administration to different models. Given the relevant environmental issue, we summarized the evidence that evaluated the totality of this by-product dried and milled due to the practicality and low cost of this process.

Introdução

A uva (*Vitis vinifera*) é uma das culturas mais cultivadas em todo o mundo. De acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (1), a produção anual mundial de uvas frescas em 2019 foi de cerca de 85 milhões de toneladas. Mais de 50% da colheita deste produto é utilizada na produção de vinho. Após a extração do sumo, aproximadamente 25% da uva processada constitui um resíduo sólido denominado como bagaço de vinho ou bagaço de uva (BU) (2,3). Este resíduo é resultado da prensagem de uvas frescas, fermentadas ou não, durante o processo de vinificação, sendo composto por uvas prensadas, películas, sementes, pedúnculos e células fermentadas (3-5).

Embora o BU apresente diferentes usos tais como a adubação é ainda e, principalmente, matéria-prima para a produção de álcool, aguardente bagaceira, bebidas alcoólicas e utilizada em ração animal (3); anualmente, uma grande quantidade deste subproduto é deliberadamente descartado pela indústria e traz sérios problemas ao meio ambiente, como poluição do solo e das águas. Por outro lado, o BU contém quantidades significativas de fibra alimentar e fitoquímicos como flavonoides (por exemplo catequinas e antocianinas), estilbenos e ácidos fenólicos, que permanecem no bagaço após o processo de vinificação (6,7).

No que diz respeito ao contexto ambiental e nutricional a alternativa mais sustentável para o reaproveitamento do BU parece ser na forma de farinha de bagaço de uva (FBU), que é obtida após a secagem e moagem do bagaço (5). Recentemente, têm sido estudados os efeitos da FBU a nível metabólico e a sua utilização como ingrediente fortificante em alimentos, com vista a melhorar as propriedades sensoriais, aumentar o valor nutricional e como potencial agente promotor da saúde (7).

Assim, temos como objetivo rever as evidências recentes sobre as propriedades biológicas, metabólicas, nutricionais e sensoriais de alimentos suplementados com FBU e a sua administração a diferentes modelos. Diante da relevante questão ambiental, resumimos as evidências que avaliaram a totalidade desse subproduto seco e moído devido à praticidade e baixo custo desse processo.

Materials and Methods

Data sources and search strategy

The present review was carried out from the search for scientific articles indexed in the electronic databases PubMed, Google Scholar, and SCOPUS using the English descriptors “grape pomace flour” and “grape pomace.” The articles used in this review were from 2010 to 2022. The bibliographic references of the selected articles were also evaluated to identify other potentially relevant studies.

Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria were: 1. Studies that investigated metabolic, biochemistry, sensorial or physicochemical aspects of administration, or formulation of products with GPF; 2. GP used as its totality (not isolating a single part of the pomace); 3. Publication as a full text in the English language. All articles that did not meet the inclusion criteria were excluded.

Study selection

The selection of articles included in this review followed the sequence: 1. Launching of descriptors in the databases; 2. Selection by titles; 3. Reading the abstracts of the articles as selected by title (pre-selection); 4. A complete reading of articles pre-selected by review of the abstract; 5. Inclusion of articles with relevant data; 6. Articles used in this review were from 2010 to 2022. The initial search yielded 32 articles. After reviewing titles and retaining only articles that met the review criteria, 13 articles remained for review. Among those, two were selected from SCOPUS, two from Google Scholar and nine from PubMed.

Results and Discussion

General characteristics

Tables 1, 2 and 3 presents the main characteristics and results of the studies included in the present review and are divided according to the study design, as follows: preclinical studies, observational studies and sensory evaluation of foods, respectively. The studies were published between 2014 and 2021. Four of the studies were conducted in Chile, three in Brazil, two in Portugal, one in Tunisia, one in Thailand, one in the United States and one in Spain.

Material e métodos

Fontes de dados e estratégia de pesquisa

A presente revisão foi realizada a partir da pesquisa de artigos indexados nas bases de dados eletrônicas PubMed, Google acadêmico e SCOPUS utilizando-se as palavras-chave em inglês “grape pomace flour” e “grape pomace”. Foram utilizados os artigos publicados entre 2010 e 2022. Também foi realizada uma análise das referências bibliográficas dos artigos selecionados para identificar outros estudos potencialmente relevantes.

Crítérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram: 1. Estudos que investigassem aspectos metabólicos, bioquímicos, sensoriais ou físico-químicos da administração ou formulação de produtos com farinha de bagaço de uva; 2. BU utilizado na sua totalidade (não partes isoladas ou frações do bagaço); 3. Publicação como texto completo em língua inglesa. Foram excluídos todos os artigos que não atendiam aos critérios de inclusão.

Seleção de estudos

A seleção dos artigos incluídos nesta revisão seguiu a sequência: 1. introdução dos descritores nas bases de dados; 2. Seleção por títulos; 3. Leitura dos resumos dos artigos selecionados pelo título (pré-seleção); 4. Leitura na íntegra dos artigos pré-selecionados pelo revisor; 5. Inclusão de artigos com dados relevantes; 6. Artigos publicados entre 2010 e 2022. A busca inicial resultou em 32 artigos. Após a revisão dos títulos e avaliação do atendimento aos critérios de inclusão, 13 artigos foram selecionados e incluídos na revisão. Sendo que dois foram encontrados no SCOPUS, dois no Google Scholar e nove no PubMed.

Resultados e Discussão

Características gerais

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam as principais características e resultados dos estudos que foram incluídos na presente revisão e estão divididas de acordo com os tipos de estudo: pré-clínicos, observacionais e de avaliação sensorial de alimentos, respectivamente. Os estudos foram publicados entre 2014 e 2021. Quatro dos estudos foram conduzidos no Chile, três no Brasil, dois em Portugal, um na Tunísia, um na Tailândia, um nos Estados Unidos e um em Espanha.

Preclinical studies

In 2015, Hernández-Salinas *et al.* (8) performed a study to investigate whether GPF supplementation for sixteen weeks may prevent the disturbances caused by a high fructose diet-fed animal model of metabolic syndrome (MS) on glucose metabolism and oxidative stress in rats. The animals were fed with a control diet, control diet plus 20% of GPF, control diet plus 50% of a fructose diet or a control diet plus 50% fructose diet plus 20% of GPF. The authors then measured blood glucose, insulin and triglycerides, arterial blood pressure, and body weight. The homeostasis model assessment (HOMA) index was also calculated, a glucose tolerance test was performed, and oxidative stress index was measured in the plasma and kidney. At the end of the experimental protocol the authors could observe that GPF supplementation was able to prevent the increase of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in plasma and renal tissue caused by the administration of a high fructose diet. Furthermore, it also prevented the increase of HOMA index, fasting blood glucose, which ranged from 104.3 ± 2.8 in the untreated fructose group to $91. \pm 2.84$ mg/dL in the fructose group that received GPF and plasma insulin, which ranged from 912.2 ± 1.3 to 8.9 ± 0.7 μ U/mL compared with the untreated intervention group. Although arterial blood pressure and body weight were evaluated, none of the groups presented significant differences in those parameters.

According to the authors, high fructose concentrations stimulate uric acid production at the time of its metabolization. In extracellular environment, uric acid performs an antioxidant activity, but inside the cell environment, it may induce an oxidative cascade, mediated by NADPH oxidase. This mechanism is dose-dependent and can lead to an oxidative stress (OS) state (8). In addition, according to the literature, a hyperglycemic ambient induces the installation of inflammatory pathways through the stimulation of proinflammatory cytokines release such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 β . OS and inflammation are closely related to the development of chronic diseases. In this sense, previous studies in the literature have indicated that dietary polyphenols may suppress system inflammation, and consequently OS, through the modulation of the activities of key transcription factors that regulate cellular responses to OS and inflammation such as proinflammatory cytokines release, the regulation

Estudos pré-clínicos

Em 2015, Hernández-Salinas *et al.* (8) realizaram um estudo para investigar os efeitos da suplementação de FBU durante dezesseis semanas no metabolismo da glicose e *stress* oxidativo num modelo animal de síndrome metabólica (SM) induzida por uma dieta rica em frutose. Neste sentido, foi comparada uma dieta controle com: uma dieta controle mais 20% de FBU, dieta controle mais 50% de frutose e dieta controle mais 50% de frutose e 20% de FBU. Os parâmetros avaliados foram os níveis séricos de glicose, insulina e triglicérides, a pressão arterial e o peso corporal. Foi ainda calculado o índice de avaliação do modelo de homeostase (HOMA), foi realizado o teste de tolerância à glicose e o índice de *stress* oxidativo foi medido no plasma e no rim. No final do protocolo experimental observou-se que a suplementação de FBU foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma e no tecido renal causados pela administração de uma dieta rica em frutose. Além disso, também preveniu o aumento do índice HOMA, glicemia de jejum, que variou de 104.3 ± 2.8 no grupo frutose não tratado para $91. \pm 2.84$ mg/dL no grupo frutose que recebeu FBU e insulina plasmática que variou de 912.2 ± 1.3 para 8.9 ± 0.7 μ U/mL comparado com o grupo de intervenção não tratado. Embora tenham sido avaliados pressão arterial e peso corporal, não foram observadas diferenças significativas nestes parâmetros em nenhum dos grupos.

Segundo os autores, altas concentrações de frutose estimulam a produção de ácido úrico no momento de sua metabolização. No meio extracelular, o ácido úrico exerce atividade antioxidante, mas no meio intracelular pode induzir uma cascata oxidativa, mediada pela NADPH oxidase. Este mecanismo é dose-dependente e pode levar a um estado de estresse oxidativo (EO) (8). Além disso, segundo a literatura, um ambiente hiperglicêmico induz a instalação de vias inflamatórias por meio da estimulação da liberação de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e IL-1 β . EO e inflamação estão intimamente relacionados com o desenvolvimento de doenças crônicas. Nesse sentido, estudos anteriores na literatura já mostraram que os polifenóis da dieta podem suprimir a inflamação sistêmica e, conseqüentemente, o EO, por meio da modulação das atividades dos principais fatores de transcrição que regulam as respostas celulares ao estresse oxidativo e à inflamação como a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a regulação das vias de

of inflammation-related signaling pathways and proinflammatory enzymes such as COX-2, MAPK and protein-c kinase (9).

Charradi *et al.* (2017) (10) reported the potential anti-lipotoxic effect of grape seed and skin flour (GSSF) in the brain of either female or male obese rats induced by a high-fat diet (HFD), with an emphasis on the protection against lipotoxicity-induced oxidative stress and inflammation. The animals' diet was mixed with 5% GSSF for eight weeks. At the end of the experimental period, the authors observed that this supplementation resulted in protection against the increase of LDL-cholesterol accumulation in plasma and brain, lipoperoxidation, protein carbonylation and a decrease of antioxidant activity caused by the HFD. GSSF also cancels the disturbances caused by the HFD in transition metals and associated enzymes, intracellular mediators and associated enzymes, peripheral adipokines and lipid brain deposition. The gender-dependence of the effects of HFD is known, more significantly altering brain lipotoxicity in male than female rats, and the lower probability of females developing inflammatory-related brain diseases is suggested to be linked with the anti-inflammatory role of estrogens. However, the GSSF supplementation efficiently protected both sexes.

An experimental study designed by Souza *et al.* (2019) (11) evaluate whether dietary supplementation with GPF for ten weeks was able to prevent or reduce the hepatic oxidative damage of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) experimentally infected by *Pseudomonas aeruginosa*. In this sense, the authors included 150 or 300 mg/kg of GPF in the basal diet of the fish. The authors evaluated the effects of the administration of two different concentrations of GPF, only the 300 mg/kg supplementation demonstrated significant results. In this sense, they observed an increase of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems due to a significant upregulation of hepatic enzymes Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) activities and on hepatic total antioxidant activity against peroxy radicals (ACAP) levels, demonstrating a high capacity to scavenge the peroxy radical. Additionally, the levels of reactive oxygen species (ROS), metabolites of nitric oxide (Nox), and TBARS of the treated animals remained similar to the control groups, while the non-treated showed significantly higher concentrations of those markers, demonstrating that the prophylactic supplementation was able to protect the liver against oxidative damage.

sinalização relacionadas à inflamação e a atividade de enzimas proinflamatórias como a COX-2, MAPK e proteína-C quinase (9).

Charradi *et al.* (2017) (10) relataram o potencial efeito anti lipotóxico de farinha da semente e películas de uva (FSPU) no cérebro de ratos fêmeas ou machos obesos induzidos por uma dieta rica em gordura (DRG), com ênfase na proteção contra o *stress* oxidativo e inflamação induzidos por lipotoxicidade. A dieta dos animais foi misturada com 5% da FSPU por oito semanas. No final do período experimental, os autores puderam observar que essa suplementação resultou na proteção contra o aumento da deposição da fração LDL-colesterol no plasma e no cérebro, lipoperoxidação, carbonilação de proteínas e diminuição da atividade antioxidante causada pela DRG. A FSPU também anulou os distúrbios causados pela DRG no que respeita aos metais de transição e enzimas associadas, mediadores intracelulares e enzimas associadas, adipocinas periféricas e deposição de lipídios no cérebro. Sabendo que a lipotoxicidade cerebral dependente da DRG é mais significativa em ratos machos do que nas fêmeas, devido ao efeito protetor anti-inflamatório dos estrogênios a suplementação com FSPU protegeu eficientemente ambos os sexos.

Um estudo experimental desenvolvido por Souza *et al.* (2019) (11) avaliou se a suplementação dietética com FBU durante 10 semanas foi capaz de prevenir ou reduzir o dano oxidativo hepático de carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) infetadas experimentalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse sentido, os autores incluíram 150 ou 300 mg/kg de FBU na dieta basal dos peixes. Embora os autores tenham avaliado os efeitos de duas diferentes concentrações de FBU, apenas a suplementação de 300 mg/kg demonstrou resultados significativos. Nesse sentido, foi observado um aumento do sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático devido a um aumento significativo nas atividades hepáticas das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e nos níveis hepáticos da atividade antioxidante total contra radicais peróxil (ACAP), demonstrando uma alta capacidade de sequestrar o radical peróxil. Além disso, os níveis de espécies reativas ao oxigênio (ROS), metabólitos do óxido nítrico (Nox) e TBARS dos animais tratados permaneceram semelhantes aos dos grupos controle, já os não tratados apresentaram concentrações significativamente maiores desses marcadores, demonstrando que a suplementação profilática foi capaz de proteger o fígado contra danos oxidativos.

Table 1. Detailed description of each preclinical study included in this review. (n=6)

Identification	Location	Sample	Duration	Intervention	Control	Principal results	Principal effects
Hernandez-Salinas et al., 2015	Chile	29 male Sprague-Dawley rats submitted to a diet-induced model of metabolic syndrome beyond the administration of a high fructose diet.	16 weeks	Control plus 20 % of wine grape pomace flour, 50% fructose plus 20 % of GFP	Animals received the control diet or high fructose diet (without the addition of GFP)	↓ the increase in glucose, triglycerides and insulin levels, prevented the ↑ of the area under curve of the glucose tolerance test, insulin concentration and HOMA-IR index caused by the experimental diet. Also, prevented the ↑ of TBARS levels on plasma and kidneys and the ↓ of mSOD levels on the kidney	Anti-hyperglycemic and antioxidant
Charradi et al., 2017	Tunisia	18 male and female induced obesity – Wistar rats	8 weeks	The animals were fed with an HFD or HFD + GSSF (5%)	The animals were fed with a standard diet	Prevented ↑ superoxide anion and hydroxyl radical through HFD effect, abrogates LDL-accumulation on brain and plasma of male rats, corrected lipoperoxidation, protein carbonylation and ↓NPSH in male. Also ↓ GPx and SOD activity. Abrogates the disturbances caused by the HFD in transition metals and associated enzymes, intracellular mediators and associated enzymes, peripheral adipokines and lipid brain deposition	Protected brain against lipid deposition
Souza et al., 2019	Brazil	108 juvenile grass carp divided into six groups. Groups D to F were experimentally infected via an intramuscular route with 100µL of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain	10 weeks	Groups B and E received a diet containing 150 mg of GFP/kg of feed, while groups C and F received a diet containing 300 mg of GFP/kg of feed, twice a day	Groups A and D received the basal diet (without GFP supplementation),	Hepatic ACAP levels observed in infected fish	Hepatoprotection and stimulation of antioxidant defense system
Alba et al., 2019	Brazil	27 multiparous lactating sheep	2 weeks	Supply of 1% or 2% of GFP. Each animal received 0.8 kg/d of concentrate, divided into 2 daily feedings	Control without GFP	↑ in milk production and ↑ protein and fat in milk concentration (2% GFP) at the 15th day of experiment. ↓ the somatic cell count (in milk), ↓ lipid peroxidation concentrations and ↑ total antioxidant capacity in milk and serum. In serum ↑ antioxidant enzymes activity.	Antioxidant and anti-inflammatory
Rivera et al., 2019	Chile	60 SR-B1 KO/ApoER6 ^{10h} male and female mice submitted to a diet-induced model of occlusive atherosclerosis by the administration of an HFC-atherogenic diet	1 or 2 weeks	A high-fat diet was supplemented with 20% of RGPF or 10% chow/10% oat fibre	Animals were fed with a high-fat diet supplemented with 20% chow	Improvement on mice lifespan, prevented the ↑ of TNF-α and IL-10 levels and enlarged spleens after 7 days of administration. Dietary supplementation of RGPF for 14 days prevents ↓ in plasma antioxidant activity, decrease DHR oxidation to baseline levels, ↓ the formation of atherosclerotic plaques and promotes the restoration of systolic heart.	Antioxidant, anti-atherosclerotic and inflammation-modulative
Harikrishnan et al., 2021	Thailand	600 healthy rohu, <i>L. rohita</i> fish infected or not with <i>Flavobacterium columnaris</i>	8 weeks	Fish were fed with 100, 200, or 300 mg/kg ⁻¹ of GFP diets, twice a day, and received or not a administration of <i>Flavobacterium columnaris</i> intramuscularly (1.m.) at 1.2 × 10 ⁻⁷ CFU ml ⁻¹ , respectively	Animals were fed with a normal fish basal diet without GFP. The positive and negative controls were injected with 50 µl of phosphate buffer saline or 50 µl of <i>F. columnaris</i> intramuscularly (1.m.) at 1.2 × 10 ⁻⁷ CFU ml ⁻¹ , respectively	Challenged or unchallenged 200 and 300 mg GFP diets resulted in ↑ GSH, SOD, GPx, RB and ACP. IgM activity. The Lyz, β-2M, CC3 and IgM expression were higher on 200 and 300mg treated groups. The mRNA transcripts level of SOD ↑ in the unchallenged fish fed with 200 mg diet when compared with challenged ones fed with the same diet. The GPx mRNA transcripts ↑ in the normal fish treated with 200 mg diet as compared with other groups fed with 200 or 300 mg GFP diets. ↑ Nrf2 and NKEF-β in both groups (200 and 300 mg GFP diets). Expressions of TLR22 and hepcidin mRNA ↑ significantly in the unchallenged and challenged fish fed with 200 and 300 mg GFP diet	Antioxidant, immune and anti-inflammatory gene-modulative

ACAP: capacity against peroxyl radicals; ACP: alternative pathway complement; CAT: catalase; CC3: Complement C3; DHR: dihydroethodamine; GFP: grape pomace flour; GPx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione; GSSF: grape seed and skin flour; HFC: high fat, high cholesterol, and cholic acid-containing; HFD: high fat diet; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance; IL-10: interleukin-10; IgM: immunoglobulin M; LDL: low density lipoprotein; Lyz: lysozyme; mRNA: messenger RNA; mSOD: mitochondrial superoxide dismutase; NKEF-β: natural killer-cell enhancing factor β; Nox: nitric oxide; NPSH: non protein thiol; Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; RB: respiratory burst; RGPF: Red grape pomace flour; ROS: reactive oxygen species; SOD: superoxide dismutase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; TLR22: toll-like receptor-22; TNFα: tumour necrosis factor alpha; β-2M: β-2 microglobulin. The up arrow ↑ represents increase, down arrow ↓ represents decrease.

Tabela 1. Descrição detalhada de cada estudo pré-clínico incluído nesta revisão. (n=6)

Identificação	Localização	Amostra	Duração	Intervenção	Controle	Resultados principais	Efeitos principais
Hernandez-Salinas et al., 2015	Chile	29 ratos Sprague-Dawley machos submetidos a um modelo de síndrome metabólica induzido pela administração de uma dieta rica em frutose	16 semanas	Controle com 20% de FBU, 50% de frutose e 20% de FBU	Os animais foram alimentados com uma dieta controlada ou dieta rica em frutose (sem adição de FBU)	<p>↓ o aumento dos níveis de glicose, triglicéridos e insulina, impediu o ↑ da área sob a curva do teste de tolerância à glicose; concentração de insulina e índice HOMA-IR causados pela dieta experimental. Além disso, preveniu o ↑ dos níveis de TBARS no plasma e nos rins e ↓ dos níveis de mSOD no rim</p>	Anti-hiperglicêmico e anti-oxidante
Charraoui et al., 2017	Tunísia	18 ratos Wistar machos e fêmeas com obesidade induzida	8 semanas	Os animais foram alimentados com HFD ou HFD+ FSPU (5%)	Os animais foram alimentados com uma dieta padrão	<p>Preveniu o ↑ do antiox superóxido e do radical hidroxilo através do efeito da dieta hiperlipídica, ↓ a acumulação de LDL no cérebro e no plasma de ratos machos, corrigiu a hiperoxidação, a carbonilação de proteínas e a ↑ NPSH nos machos. Também ↓ da atividade de GPx e SOD. Anula os distúrbios causados pela HFD em metais de transição e enzimas associadas, nos mediadores intracelulares e enzimas associadas, nas adipocinas peritéricas e deposição cerebral de lipídios</p>	Proteção frente a deposição cerebral de lipídios
Souza et al., 2019	Brasil	108 carpas juvenis foram divididas em seis grupos (A-F, n = 6 por grupo, em triplicado). Os grupos D a F foram injetados experimentalmente por via intramuscular com 100 µL de cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 semanas	Os grupos B e E foram alimentados com uma dieta contendo 150 mg de FBU/kg de ração, enquanto os grupos C e F receberam uma dieta contendo 300 mg de FBU/kg de ração, duas vezes ao dia	Os grupos A e D receberam a A suplementação com 300 mg/kg de FBU preventiu o ↑ dos níveis hepáticos de ROS, NOx e TBARS, da atividade hepática de SOD e CAT e preveniu o ↑ dos níveis hepáticos de ACAP observados em peixes infectados	Hepatoproteção e estímulo da defesa antioxidante	
Alba et al., 2019	Brasil	Virte e sete ovelhas multiparas em lactação	2 semanas	Fornecimento de 1% ou 2% de FBU na dieta. Cada animal recebeu 0,8 kg/dia, dividido em 2 alimentações diárias	Dieta sem FBU	<p>↑ na produção de leite e ↑ concentração de proteína e gordura no leite (FBU 2%) no 15^o dia do ensaio. ↓ da contagem de células somáticas (no leite), ↓ das concentrações de peroxidação lipídica e ↑ da capacidade antioxidante total no leite e no soro. No soro também ↑ a atividade de enzimas antioxidantes</p>	Antioxidante e anti-inflamatório
Rivera et al., 2019	Chile	60 SR-B1 KO/ApoE671/h camundongos machos e fêmeas submetidos a um modelo de aterosclerose occlusiva induzida por dieta aterogênica HFC.	1 or 2 semanas	Uma dieta rica em gordura foi suplementada com 20% de FBU ou 10% ração padrão/ 10% de fibra de aveia	Os animais foram alimentados com uma dieta hiperlipídica suplementada com 20% de ração padrão	<p>Melhoria na expectativa de vida dos camundongos, preveniu o ↑ dos níveis de TNF-α e IL-10 e do baco após 7 dias de administração. A suplementação dietética de FBU por 14 dias previne a ↓ na atividade antioxidante no plasma, diminui a oxidação de DHR aos níveis basais, ↓ a formação de placas ateroscleróticas e promove a restauração da função cardíaca sistólica</p>	Antioxidante, anti-aterosclerótico e modulador inflamatório
Harikrishnan et al., 2021	Tailândia	600 peixes rolinh, <i>L. rohita</i> saudáveis, infectados ou não com <i>Flavobacterium columnaris</i>	8 semanas	Os peixes foram alimentados com dietas suplementadas por 100, 200 ou 300 mg/kg ⁻¹ de FBU, duas vezes ao dia, e recebem ou não administração de <i>F. columnaris</i>	Os animais foram alimentados com dieta basal de peixe normal sem FBU. Os controles positivo e negativo foram injetados com 50µl de solução salina de tampão fosfato ou 50µl de <i>F. columnaris</i> por via intramuscular a 1,2 × 10 ⁷ UFC/ml ⁻¹ , respectivamente	<p>Dieta suplementada por 200 e 300 mg de FBU, desafiados ou não por infecção bacteriana experimental resultaram num ↑ significativo na atividade de GSH, SOD, GPx, RB e ACP, IgM. A expressão de Lyz, β-2M, CC3 e IgM foi superior nos grupos tratados com 200 e 300 mg. O nível de transcritos de mRNA de SOD foi ↑ nos peixes não desafiados alimentados com 200 mg de FBU quando comparados com os desafiados alimentados com a mesma dieta. Os transcritos de mRNA de GPx foram ↑ nos peixes normais tratados com dieta de 200 mg em comparação com outros grupos alimentados com dietas de 200 ou 300 mg de FBU. ↑ NH2 e NKEF-β em ambos os grupos (200 e 300 mg de FBU). Expressões de mRNA de TLR22 e hepditina ↑ significativamente nos peixes não desafiados e desafiados alimentados com dietas de 200 e 300 mg de FBU.</p>	Modulação de genes antioxidantes, imunológicos e anti-inflamatórios

ACAP: capacidade contra radicais peroxílo; ACP: complemento de via alternativa; CAT: catalase; CC3: Complemento C3; DHR: dihidrorodamina; FBU: farinha de bagaço de uva; FBU1: farinha de bagaço de uva tinte; FSPU: farinha de semente e pellicula de uva; GPx: glutatona peroxidase; GSH: glutatona; HFC: alto teor de gordura, colesterol alto e ácido colico; HFD: dieta com alto teor de gordura; HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; IgM: imunoglobulina M; IL-10: interleucina-10; LDL: lipoproteína de baixa densidade; Lyz: lisozima; mRNA: RNA mensageiro; mSOD: Superóxido dismutase mitocondrial; NKEF-β: fator β de aumento de células assassinas naturais; NOx: óxido nítrico; NPSH: tióis não próticos; NrF2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2; RB: explosão oxidativa respiratória; ROS: espécies reativas de oxigênio; SOD: superóxido dismutase; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TLR22: receptor-22 tipo toll; TNFα: fator de necrose tumoral α; β-2M: β-2 microglobulina. A seta para cima ↑ representa aumento e a seta para baixo ↓ representa diminuição.

According to the literature, several pieces of evidence have demonstrated that the bioactive compounds of grapes exert hepatoprotective effects, sometimes via synergistic action. Even so, resveratrol, the main component of red grapes is considered the main responsible for the antioxidant actions that can be observed in these crops (12). Among the means of action of resveratrol is the suppression of ROS synthesis by inhibiting enzyme depletion or by chelating trace elements involved in free radical production, scavenging ROS and up-regulating or protecting the antioxidant defense and activating defense pathway factors (11). On the other hand, despite the solid scientific data indicating resveratrol's health benefits, this polyphenol use still raises doubts due to its low oral bioavailability despite its high bioactivity. Resveratrol's oral poor bioavailability is attributed to its lower aqueous solubility, membrane permeability, and metabolic stability (13). In this sense, studies have been conducted in order to list administration routes, concentration, and classes of derivatives that provide better bioavailability and, consequently, efficacy. Therefore, although this compound is abundantly present in the chemical composition of GPF and has demonstrated effects as an isolated compound in *in vitro* protocols (14,15), studies are still needed to elucidate its effects and metabolism from GPF in isolation.

Also in 2019, Alba *et al.* (16) conducted an experimental design to evaluate the effects of GPF on antioxidant activity, biochemistry variables, components of the immune system and milk production and quality of Lacaune sheep in heat stress. The animals received 0.8 kg/day of a concentrate of 1 or 2% of GPF, twice a day, for two weeks. The authors demonstrated that the concentrate supplementation resulted in an elevated antioxidant response in the sheep serum. In addition, serum levels of urea were reduced (from 38.0 in the control group to 27.6 mg/dL) while serum glucose (from 54.7 to 66.6 mg/dL) and triglyceride (from 20.1 to 36.9 mg/dL) concentrations were higher in animals supplemented with 2% GPF, which could be explained by the increase in the amount of ether extract in the diet containing 2% GPF (16). The ether extract is related to higher percent of energy in the diet.

This study demonstrated that the experimental

De acordo com a literatura, várias evidências têm demonstrado que os compostos bioativos da uva exercem efeitos hepatoprotetores, às vezes, por ação sinérgica. Ainda assim, o resveratrol, que é o principal componente da uva tinta, é considerado o principal responsável pelas ações antioxidantes que podem ser observadas nestas culturas (12). Entre os mecanismos de ação propostos para o resveratrol está a supressão da síntese de ROS pela inibição da depleção enzimática ou pela quelatação de oligoelementos envolvidos na produção de radicais livres, eliminação de ROS, a regulação ou proteção da defesa antioxidante e ativação de fatores da via de defesa (11). Por outro lado, apesar dos sólidos dados científicos que indicam os benefícios do resveratrol à saúde, o uso desse polifenol ainda gera dúvidas devido à sua baixa biodisponibilidade via oral, apesar de sua alta bioatividade. A baixa biodisponibilidade oral do resveratrol é direcionada à sua menor solubilidade aquosa, permeabilidade da membrana e estabilidade metabólica (13). Nesse sentido, estudos têm sido realizados a fim de listar vias de administração, concentração e classes de derivados que proporcionem melhor biodisponibilidade e, conseqüentemente, eficácia. Portanto, embora este composto esteja abundantemente presente na composição química do FBU e tenha demonstrado efeitos como composto isolado em protocolos *in vitro* (14,15), ainda são necessários estudos para elucidar seus efeitos e metabolização da FBU isoladamente.

Também em 2019, Alba *et al.* (16) avaliaram os efeitos da FBU na produção e qualidade do leite de ovelhas Lacaune sob *stress* térmico. As variáveis estudadas foram a atividade antioxidante, os níveis séricos de alguns marcadores bioquímicos, e componentes do sistema imunológico. Os animais receberam 0,8 kg/dia de um composto concentrado com 1 ou 2% da FBU, dividido em duas administrações ao dia durante duas semanas. Os autores puderam demonstrar que a suplementação concentrada resultou numa elevada resposta antioxidante no soro das ovelhas. Além disso, os níveis séricos de ureia foram reduzidos (de 38.0 no grupo controle para 27.6mg/dL) enquanto as concentrações séricas de glicose (de 54.7 para 66.6mg/dL) e de triglicérides (de 20.1 para 36.9 mg/dL) foram superiores nos animais suplementados com 2% de FBU, o que pode ser explicado pelo aumento na concentração de extrato etéreo na dieta com 2% de FBU (16). O extrato etéreo está relacionado com maior percentual de energia na dieta.

administration of GPF resulted in greater control of oxidative stress, an increase in productive efficiency (around 18%), and an improvement in sheep health. In this sense, it was observed that the increased serum concentrations further support the upregulation of antioxidant capacity in the milk after the GPF administration, which is related to antioxidants, such as quercetin, resveratrol, and phenols that constitute the chemical composition of the grape. Besides, the authors assume that the increase in productive efficiency after the inclusion of GPF may be a result of the greater control of oxidative stress and decrease of free radicals concentration. In addition, it is hypothesized that as the GPF supplementation exerted protection against milk lipid peroxidation, it could potentially increase the shelf life of milk and its derivative products (16).

In 2019, Rivera *et al.* (17) led an experimental study to investigate the impact of dietary supplementation of GPF during one or two weeks in a model of lethal ischemic heart disease. In this sense, male and female SR-B1 KO/ApoER61^{h/h} were administrated 20% high fat, high cholesterol, and cholic acid-containing atherogenic diet mixture to the basal diet, 20% red wine pomace flour (RGPF) plus the experimental diet or 10% of oat fiber plus the atherogenic diet. After the experimental protocol, the authors could observe that RGPF supplementation showed a significant improvement in animal lifespan in comparison to the groups that did not receive the flour. When analyzing the plasma antioxidant capacity of the RGPF, the authors could observe that it decreased the levels of dihydrorhodamine (DHR) oxidation to baseline, while the experimental diet exerted an increase of more than 100% at this parameter. Finally, the authors evaluated heart disturbances caused by the administration of an atherogenic diet and the potential effects of the RGPF supplementation. In this sense, the RGPF group showed reduced formation of atherosclerotic plaques and Oil Red O-stained areas at the end of the experiment and significant restoration of systolic heart function at day 14 to normal levels. The findings elucidated by Rivera *et al.* (17) showed that in addition to increasing mice lifespan, RGPF consumption was associated with a significant reduction in atherosclerotic lesions and ischemic heart disease and exhibited an antioxidant effect. These results indicate that the effect of RGPF on a diversity of targets is not only related to the abundant presence of fiber since the oat fiber-fed group did not demonstrate the same effects as the RGPF, but is likely related to other specific components within the RGPF flour.

Este estudo pode demonstrar que com a administração experimental de FBU obteve-se um maior controle do *stress* oxidativo, um aumento da eficiência produtiva (aproximadamente 18%) e uma melhoria na saúde dos ovinos. Nesse sentido, pode-se observar que o aumento das concentrações séricas sustenta ainda mais a regulação positiva da capacidade antioxidante do leite após a administração da FBU, que está relacionada com os antioxidantes, tais como a quercetina, resveratrol e fenóis que constituem a composição química da uva. Além disso, os autores assumem que o aumento da eficiência produtiva após a adição da FBU pode ser resultado do maior controle do *stress* oxidativo e diminuição da concentração de radicais livres; pelo que se coloca a hipótese que a suplementação de FBU poder aumentar a vida útil do leite e seus derivados (16).

Em 2019, Rivera *et al.* (17) lideraram um estudo experimental para investigar o impacto de uma suplementação dietética de FBU, durante uma ou duas semanas, num modelo de cardiopatia isquêmica letal. Nesse sentido, compararam, em machos e fêmeas SR-B1 KO/ApoER61^{h/h}, o efeito da adição de 20% de uma dieta aterogénica (com elevado teor de gordura, colesterol e ácido cólico) à dieta basal, com 20% de farinha de bagaço de vinho tinto (FBVT) versus a dieta aterogénica e 10% de fibra de aveia. Os autores observaram que a suplementação com FBVT apresentou uma melhoria significativa na expectativa de vida dos animais em comparação com os grupos que não receberam a farinha. Ao analisar a capacidade antioxidante plasmática da FBVT, os autores constataram a diminuição dos níveis de oxidação de dihidrorodamina (DHR) para valores basais, enquanto, a dieta experimental exerceu um aumento de mais de 100% neste parâmetro. Por fim, os autores avaliaram os distúrbios cardíacos causados pela administração de uma dieta aterogénica e os potenciais efeitos da suplementação de FBVT. Nesse sentido, no final do estudo, o grupo alimentado com FBVT apresentou uma menor formação de placas ateroscleróticas e áreas coradas com Oil Red O, assim como uma melhoria significativa da função cardíaca sistólica para níveis normais no dia 14. Os resultados obtidos por Rivera *et al.* (17) mostraram que, mais do que aumentar a vida útil dos camundongos, o consumo de FBVT foi associado a uma redução significativa nas lesões ateroscleróticas e na doença isquêmica do coração para além do efeito antioxidante. Os resultados encontrados pelo presente artigo indicam que o efeito da FBVT observado, numa diversidade de alvos, não está relacionado apenas com o elevado conteúdo em fibra, uma vez que o grupo alimentado com farinha de aveia não demonstrou os mesmos efeitos que os alimentados

Recently, in 2021, Harikrishnan *et al.* (18) evaluated the effects of dietary inclusion of GPF for eight weeks on growth, antioxidant and anti-inflammatory profile, innate-adaptive immunity, and immune genes expression in *Labeo rohita* against *Flavobacterium columnaris*. The animals were separated into four different groups which received 0 (control group), 100, 200, or 300 mg/kg of the GPF supplemented on the basal diet. After the 60 days experimental protocol, the authors could observe that the 200 mg/kg GPF inclusion diet exhibited the most significant results on growth rate, antioxidant status, and immune defense mechanisms than other concentrations of the flour. The authors could observe a significant increase in parameters such as SOD (from 4.76 ± 0.25 in the infected control group to 6.63 ± 0.36 and 6.33 ± 0.31 U/mg⁻¹ in the groups supplemented with 220 and 300 mg/kg, respectively), glutathione peroxidase (GPx) (from 25.14 ± 2.15 to 41.60 ± 2.40 and 34.14 ± 1.67 U/mg⁻¹ in the groups supplemented with 200 and 300 mg/kg, respectively), glutathione (GSH) (from 4.11 ± 0.25 to 8.23 ± 0.44 and 6.75 ± 0.3 mg/g⁻¹ of protein) and phagocytic (PC) activity, respiratory burst (RB), alternative complement pathway (ACP), lysozyme (Lyz), total immunoglobulin M (IgM), toll-like receptor-22 (TLR22) and hepcidin mRNA expression on the groups supplemented with 200 or 300 mg/kg of GPF. According to the present work, GPF was capable of improving the antioxidant enzymatic and non-enzymatic pathway through the increase of enzymes accompanied by a balance between synthesis and exclusion of ROS.

Clinical/observational human model studies

In 2015, Urquiaga *et al.* (19) designed a prospective, randomized controlled parallel-group trial to evaluate the effect of GPF on components of MS in humans. In this sense, male workers who regularly consumed an omnivorous diet and presented at least one component of MS were recruited as volunteers. After the selection of the participants of the study, they were randomly assigned to either intervention or control groups. Both groups were asked to maintain their regular eating and lifestyle habits, with the exception of the intervention group which was also directed to consume 20 g of GPF/day during the 16 weeks of the study. GPF was consumed in bread or biscuits or diluted in water. Participants

com FBVT, fato que está provavelmente relacionado com outros componentes específicos desta farinha.

Recentemente, em 2021, Harikrishnan *et al.* (18) avaliaram os efeitos da inclusão dietética de FBU, durante oito semanas, no crescimento, perfil antioxidante e anti-inflamatório, imunidade inata-adaptativa e expressão de genes imunes em *Labeo rohita* contra *Flavobacterium columnaris*. Os animais foram separados em quatro grupos diferentes que receberam 0 (grupo controle), 100, 200 ou 300 mg/kg da FBU suplementada na dieta basal. Após o protocolo experimental, de 60 dias, os autores puderam observar que a dieta com 200 mg/kg de FBU foi a que obteve resultados mais significativos na taxa de crescimento, status antioxidante e mecanismos de defesa imunológica. Nesse sentido, houve um aumento significativo de SOD (de 4.76 ± 0.25 no grupo controle infectado para 6.63 ± 0.36 e 6.33 ± 0.31 U/mg⁻¹ nos grupos suplementados com 220 e 300 mg/kg, respectivamente), glutathione peroxidase (GPx) (de 25.14 ± 2.15 para 41.60 ± 2.40 e 34.14 ± 1.67 U/mg⁻¹ nos grupos suplementados com 200 e 300 mg/kg, respectivamente), glutathione (GSH) (de 4.11 ± 0.25 para 8.23 ± 0.44 e 6.75 ± 0.3 mg/g⁻¹ de proteína), atividade fagocitária (PC), explosão oxidativa respiratória (RB), via alternativa do complemento (ACP), lisozima (Lyz), e imunoglobulina M total (IgM) nos grupos suplementados com 200 ou 300 mg/kg de FBU. De acordo com o presente trabalho, a FBU foi capaz de aumentar a via antioxidante enzimática e não enzimática através do aumento de enzimas acompanhado de um equilíbrio entre síntese e exclusão de ROS.

Estudos clínicos/observacionais em modelos humanos

Em 2015, Urquiaga *et al.* (19) num estudo prospectivo, randomizado e controlado de grupos paralelos avaliaram o efeito da FBU nos marcadores da SM em humanos. Nesse sentido, foram recrutados trabalhadores do sexo masculino que se voluntariaram para o estudo e que consumiam regularmente uma dieta onívora e apresentavam pelo menos um marcador da SM. Após a seleção dos participantes do estudo, eles foram aleatoriamente designados para grupo intervenção ou controle. Ambos os grupos foram orientados a manter os seus hábitos alimentares e estilo de vida regulares, com exceção do grupo de intervenção a que se adicionou 20 g de FBU/dia durante as 16 semanas. A FBU foi consumida em pão, biscoitos ou diluída em água. Os participantes passaram por avaliações clínicas, nutricionais, antropométricas e laboratoriais no início e no final do estudo. No final do estudo, os autores puderam

Table 2. Detailed description of each observational study included in this review. (n=2)

Identification	Location	Sample	Age	Duration	Intervention	Control	Principal results	Principal effects
Urquiaga et al., 2015	Chile	38 male volunteers, workers who regularly consumed an omnivorous diet having at least one of the five components of metabolic syndrome	From 30 to 65 years	16 weeks	20 g of GPF prepared from a <i>cabernet sauvignon</i> wine making by product, consumed in bread, cookies or as flour mixed with water during lunch, daily	Maintained their regular eating habits and lifestyles during the 16-weeks period	↓ systolic, diastolic, high blood pressure, fasting glucose and ↓ the average number of metabolic syndrome components present (1.84 ± 1.62/ participant to 1.48 ± 1.29/ participant) . ↑ Vitamin C, γ-tocopherol and α-tocopherol levels and ↓ DPPH levels from the baseline to the end of the study. Also ↓ protein damage (carbonyl groups) in plasma proteins decreased significantly by the end of the study.	Antioxidant, anti-hyperglycemic and protein damage protective
Urquiaga et al., 2018	Chile	27 male volunteers, workers who regularly consumed an omnivorous diet, each with at least one component of metabolic syndrome and a body mass index between 25.0 and 39.9 kg/m ²	From 25 to 65 years	Two treatment periods of 4 weeks, separated by a third four-week wash-out period	1 burger of 100 g formulated with 7% of GPF prepared from a <i>cabernet sauvignon</i> wine making by product, daily	Identical beef burgers (100 g) made with the same raw beef daily during the washing period	↓ glycemia and HOMA index significantly during the experimental period and remained low throughout the wash-out period. During the period of GPF consumption, ↑ vitamin C plasma levels and ↓ oxLDL, uric acid, DPPH and AOPP concentration.	Anti-hyperglycemic and antioxidant

AOPP: advanced oxidation protein products; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; GPF: grape pomace flour; HOMA: homeostasis model assessment; oxLDL: oxidized low-density lipoprotein. The up arrow ↑ represents increase, down arrow ↓ represents decrease.

Tabela 2. Descrição detalhada de cada estudo observacional incluído nesta revisão. (n=2)

Identificação	Localização	Amostra	Idade	Duração	Intervenção	Controle	Resultados principais	Efeitos principais
Urquiaga et al., 2015	Chile	38 voluntários do sexo masculino, trabalhadores, que consumiam regularmente uma dieta onívora com pelo menos um dos cinco componentes da síndrome metabólica	De 30 a 65 anos	16 semanas	20g de FBU elaborado a partir de um subproduto da vinificação da casta de <i>cabernet sauvignon</i> , consumida diariamente, no pão, biscoitos ou misturada com água durante o almoço.	Manteve seus hábitos alimentares e estilos de vida regulares durante o período de 16 semanas	↓ da pressão arterial sistólica, diastólica, hipertensão arterial, glicemia de jejum e ↓ do número médio de componentes da síndrome metabólica presentes (1,84 ± 1,62/participante para 1,48 ± 1,29/participante). ↑ dos níveis de vitamina C, γ-tocoteroil e α-tocoteroil. ↓ níveis de DPPH desde o começo até o final do estudo. Além disso, ↓ do dano proteico (grupos carbonílo) das proteínas plasmáticas ↓ significativamente no grupo FBU no final do estudo.	Antioxidante, anti-hiperglicêmico e protetção ao dano proteico
Urquiaga et al., 2018	Chile	27 voluntários do sexo masculino, trabalhadores, que consumiam regularmente uma dieta onívora, cada um com pelo menos um componente da síndrome metabólica e índice de massa corporal entre 25,0 e 39,9 kg/m ²	De 25 a 65 anos	Dois períodos de tratamento de 4 semanas, separados por um terceiro período <i>Wash-out</i> de quatro semanas	1 hambúrguer de 100 g formulado com 7% de FBU elaborado a partir de um subproduto da vinificação da casta de <i>cabernet sauvignon</i> , diariamente	Hambúrgueres de carne idênticos (100 g) feitos com a mesma carne crua, diariamente durante o período de <i>wash-out</i>	↓ da glicemia e o índice HOMA significativamente durante o período experimental e permaneceram baixos durante todo o período de <i>wash-out</i> . Durante o período de consumo de FBU, ↑ dos níveis plasmáticos de vitamina C e ↓ oxLDL, ácido úrico, DPPH e AOPP.	Anti-hiperglicêmico e antioxidante

AOPP: produtos de proteína de oxidação avançada; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; HOMA: modelo de avaliação da homeostase; FBU: farinha de bagaço de uva; oxLDL: lipoproteína de baixa densidade oxidada. A seta para cima ↑ representa aumento e a seta para baixo ↓ representa diminuição.

completed clinical, nutritional, anthropometric and laboratory evaluations at the beginning and end of the study. At the end of the study, the authors could observe that the control group showed a statistically significant increase in body mass index (BMI) (from 27.9 ± 3.5 to $28.3 \pm 3.6 \text{ kg/m}^2$ at the end of the experimental period), while no significant differences were observed in anthropometric characteristics of the intervention group. GPF consumption resulted in a significant decrease in systolic (from 127.1 ± 11.5 to $122.8 \pm 8.5 \text{ mmHg}$) and diastolic blood pressure (from 79.7 ± 8.3 to $74.4 \pm 5.6 \text{ mmHg}$), fasting glucose levels (from 92.7 ± 5.8 to $89.4 \pm 7.9 \text{ mg/dL}$) and protein damage measured as carbonyl groups in plasma proteins (from 0.56 ± 0.18 to $0.44 \pm 0.19 \text{ nmol/mg protein}$), while γ -tocopherol (from 1.80 ± 0.74 to $2.40 \pm 1.36 \text{ }\mu\text{M}$), δ -tocopherol (from 0.70 ± 0.13 to $0.79 \pm 0.23 \text{ }\mu\text{M}$) and α -tocopherol (from 31.67 ± 8.58 to $32.48 \pm 8.73 \text{ }\mu\text{M}$) increased significantly in GPF supplemented group (19).

More recently, in 2018, Urquiaga *et al.* (20) designed a three-month longitudinal trial consisting of two treatment periods of four weeks, separated by a third four-week wash-out period. Male workers who regularly consumed an omnivorous diet and presented at least one component of MS and a BMI between 25.0 and 39.9 kg/m^2 were recruited as volunteers. Participants were asked to maintain their regular eating habits and lifestyle during the study, except for the daily intake of GPF-burgers containing 7 g of GPF during the first and last four weeks of the experimental protocol. Participants had clinical, nutritional, and anthropometric evaluations at the beginning and end of the study. After the 16 weeks, the authors could observe that GPF-burger consumption resulted in a significant decrease in glycemia and HOMA index value throughout the experimental period and remained low during the washout period. A decreasing trend in plasma insulin levels was observed during the GPF-burger period that remained low during the washout period. According to plasma antioxidants, GPF-burgers consumption period resulted in an increased concentration of vitamin C and decrease of plasma uric acid levels and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) radical scavenging capacity. In addition, GPF-burgers consumption exerted a significant decrease on advanced oxidation protein products (AOPP) and oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) levels. No

observar que o grupo controle apresentou um aumento estatisticamente significativo, no índice de massa corporal (IMC) (de 27.9 ± 3.5 para $28.3 \pm 3.6 \text{ kg/m}^2$ ao final do período experimental), enquanto não foram observadas diferenças significativas nas características antropométricas do grupo de intervenção. O consumo de FBU resultou numa diminuição significativa da pressão arterial sistólica (de 127.1 ± 11.5 para $122.8 \pm 8.5 \text{ mmHg}$) e diastólica (de 79.7 ± 8.3 to $74.4 \pm 5.6 \text{ mmHg}$), níveis de glicose em jejum (de 92.7 ± 5.8 para $89.4 \pm 7.9 \text{ mg/dL}$) e danos proteicos medidos através de grupos carbonilo em proteínas plasmáticas (de 0.56 ± 0.18 para $0.44 \pm 0.19 \text{ nmol/mg de proteína}$), para além disso o γ -tocopherol (de 1.80 ± 0.74 para $2.40 \pm 1.36 \text{ }\mu\text{M}$), δ -tocopherol (de 0.70 ± 0.13 para $0.79 \pm 0.23 \text{ }\mu\text{M}$) e α -tocopherol (de 31.67 ± 8.58 para $32.48 \pm 8.73 \text{ }\mu\text{M}$) aumentaram significativamente no grupo suplementado com FBU (19).

Mais recentemente, em 2018, Urquiaga *et al.* (20) desenharam um ensaio longitudinal de três meses consistindo em dois períodos de tratamento de quatro semanas, separados por um terceiro período de *wash-out* de quatro semanas. Foram recrutados trabalhadores voluntários do sexo masculino que consumiam regularmente uma dieta onívora e apresentavam pelo menos um marcador de SM e índice de massa corporal (IMC) entre 25,0 e $39,9 \text{ kg/m}^2$. Foi solicitado aos participantes para a manterem os seus hábitos alimentares e estilo de vida regulares durante o estudo, exceto a adição diária de hambúrgueres contendo 7 g de FBU durante as primeiras e últimas quatro semanas do protocolo experimental. Os participantes tiveram avaliações clínicas, nutricionais e antropométricas no início e no final do estudo. Após as 16 semanas, os autores puderam observar que o consumo do hambúrguer suplementado com FBU resultou numa diminuição significativa, ao longo do período experimental, no valor da glicemia, valores de insulina plasmática e do índice HOMA, as quais permaneceram baixas durante o período de *wash-out*. Observou-se ainda um aumento dos antioxidantes plasmáticos, no período de consumo dos hambúrgueres suplementados com FBU, nomeadamente na concentração de vitamina C e diminuição dos níveis plasmáticos de ácido úrico e capacidade de eliminação de radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH \cdot). Além disso, o consumo de hambúrgueres suplementados com FBU exerceu uma diminuição significativa sobre os níveis de produtos oxidação avançada de proteínas (AOPP) e lipoproteína oxidada de baixa densidade (oxLDL). Em relação as características antropométricas dos participantes, não

significant change in anthropometric characteristics of the participants was observed over the intervention period, and there were no variations in the number of individuals with normal weight, overweight or obesity.

It is interesting to mention that both studies evaluated the effect of GPF supplementation in a cohort of individuals with MS. According to the authors, the main objective was to test the hypothesis that the consumption of GPF (rich in dietary fiber and bioactive compounds) could exert beneficial effects on biochemical parameters and markers of oxidative stress in MS, considering that the deregulation of these parameters results in a higher risk for the development of non-communicable chronic diseases, such as cardiovascular diseases and diabetes. In addition, overall food intake was assessed in both articles using a fourteen-item self-reported questionnaire that measured adherence to the Mediterranean diet in Chile, based on eating habits from countries in the Mediterranean region, with modifications that include Chilean habits. The score ranges from 0 (minimum adherence) to 14 points (maximum adherence), and no significant differences in scores were observed between groups.

According to metabolic parameters, the authors could observe a reduction in fasting glucose levels and, as GPF are rich in antioxidant dietary fiber, a known substance that is resistant to digestion by human gastrointestinal enzymes, evidence exists relating its consumption to an improvement on carbohydrate metabolism. However, the mechanism associated with these beneficial effects are not yet known, and it is hypothesized that the dietary fiber acts in synergy with the phenolic content of GPF (20). In addition, observed a statistically significant lowering of blood pressure was observed following GPF intake. Previous data from the literature associate the consumption of grape extracts, which are rich in phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, stilbenes, and lipids, with antihypertensive effects and, consequently, cardio protector features (21). Additionally, fiber-associated antioxidant products that are released by colonic fermentation might explain the reduction in blood pressure that was observed following GPF supplementation (19).

According to the results observed by Urquiaga *et al.* 2015 and 2018 (19, 20), GPF consumption led to increased antioxidant defenses and a reduction

foram observadas mudanças significativas ao longo do período de intervenção, bem como não houve variações no número de indivíduos com peso normal, sobrepeso ou obesidade.

É interessante mencionar que ambos os estudos avaliaram o efeito da suplementação com FBU em uma coorte de indivíduos com SM. Segundo os autores, o objetivo principal era testar a hipótese de que o consumo de FBU (rica em fibras alimentares e compostos bioativos) poderia exercer efeitos benéficos sobre parâmetros bioquímicos e marcadores de estresse oxidativo na SM, considerando que a desregulação desses parâmetros resulta em maior risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como doenças cardiovasculares e diabetes. Além disso, em ambos os artigos, a ingestão alimentar geral foi avaliada por meio de um questionário autorreferido com quatorze itens que mediu a adesão à dieta mediterrânea no Chile, baseada no hábito alimentar de países da região Mediterrânea, com modificações que abrangem os hábitos chilenos. A pontuação varia de 0 (mínima aderência) a 14 pontos (máxima aderência), e não foram observadas diferenças significativas de pontuação entre os grupos.

Em relação aos parâmetros metabólicos, em ambos os estudos, os autores puderam observar uma redução nos níveis de glicemia de jejum e, além da FBU ser rico em fibra dietética antioxidante, conhecida pela sua resistência à digestão pelas enzimas gastrointestinais humanas, já existem evidências que relacionam o seu consumo com uma melhoria no metabolismo dos hidratos de carbono. Todavia, o mecanismo associado a esses efeitos benéficos ainda não é conhecido, coloca-se a hipótese que a fibra alimentar atue em sinergismo com o conteúdo fenólico das FBU (20). Além disso, pode-se observar uma redução estatisticamente significativa da pressão arterial após a ingestão de FBU. Dados anteriores da literatura associam o consumo de extratos de uva, ricos em ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas, estilbenos e lipídios, com efeitos anti-hipertensivos e, conseqüentemente, cardioprotetores (21). Além disso, produtos antioxidantes associados a fibras que são liberados pela fermentação no colon podem explicar a redução na pressão arterial observada após a suplementação de FBU (19).

in oxidative and protein damage markers, which enhances the antioxidant capacity of grapes as previously indicated in the literature (21). Finally, some of the participants reported side effects during the experimental protocol when they were oriented to consume GPF: 7 reported an increase of intestinal gas, 6 reported heartburn, 7 reported regularization of intestinal transit, 6 reported softer stools, 3 reported increased appetite, 2 reported dyspepsia and 2 reported gastroesophageal reflux (19). GPF has high polyphenol content and non-soluble dietary fiber that is resistant to digestion by human gastrointestinal enzymes. This fact may have contributed to the observed side effects. In addition, polyphenols, such as proanthocyanidins, when partially fermented by bacterial microflora, may generate intestinal gas. Further studies are needed to test this hypothesis (19). Although GPF consumption demonstrated beneficial effects on human individuals as described in the previous studies included in this review, the authors highlight that there was some limitations in those studies, including: the low number of participants that were able to finish the protocol, the bias that might have occurred due to the open-label scope of the protocols, the differences of calorie intake and dietary composition of each participant that influences the final results mentioned above (19,20). Those enforce the need of developing new studies that involve larger numbers of participants and investigate different features such as diabetes and cardiovascular diseases on human scopes in order to better understand the potential effects of GPF supplementation.

Applications of grape pomace flour in the food industry

In 2014, Walker *et al.* (22) headed a study to evaluate the effects of fortification of baked good, including breads, muffins, and brownies with Pinot Noir (RGPF) or Pinot Grigio (WGPF) grape pomace flour in concentration range 5-20%. RGPF and WGPF substituted wheat flour at concentration of 5%, 10%, and 15% for bread, 10%, 15%, 20%, and 25% RGPF for brownies, and 5%, 10%, and 15% RGPF or 10%, 15%, and 20% WGPF for muffins. The final products were then evaluated for total phenolic content, radical scavenging activity, dietary fiber content and physicochemical and sensory proprieties. For the sensory evaluation, the participants received two samples of each baked good and rated the likeness of established parameters on a 9-point hedonic scale. Physicochemical properties and bioactive compounds analyses were performed according to the established methodology to each parameter. Regarding to physicochemical and sensory characteristics, both

De acordo com os resultados observados por Urquiaga *et al.* 2015 e 2018 (19, 20), o consumo de FBU levou a um aumento das defesas antioxidantes e uma redução nos marcadores de danos oxidativos e proteicos, o que reforça o efeito antioxidante das uvas conforme referenciado anteriormente (21). Por fim, alguns dos participantes relataram efeitos colaterais, durante o protocolo experimental, com o consumo de FBU: 7 participantes relataram aumento de gases intestinais, 6 azia, 7 regularização do trânsito intestinal, 6 fezes mais moles, 3 aumento do apetite, 2 dispepsia e 2 refluxo gastroesofágico (19). FBU apresenta alto teor de polifenóis e fibra alimentar não solúvel, resistente à digestão por enzimas gastrointestinais humanas. Este fato pode ter contribuído para os efeitos colaterais observados. Além disso, os polifenóis, como as proantocianidinas, quando parcialmente fermentados pela microflora bacteriana, podem gerar gases intestinais. Estudos adicionais são necessários para testar esta hipótese (19). Embora o consumo de FBU tenha demonstrado efeitos benéficos em humanos, como descrito nos estudos anteriores incluídos nesta revisão, os autores destacam que houveram algumas limitações tais como: o baixo número de participantes, que conseguiram terminar o protocolo, o viés que pode ter ocorrido devido ao âmbito aberto dos protocolos, às diferenças de ingestão calórica e composição alimentar de cada participante que influenciam os resultados finais mencionados acima (19, 20), fatos que reforçam a necessidade de desenvolver novos estudos que envolvam um maior número de participantes e investigar as diferentes características, como diabetes e doenças cardiovasculares em humanos, a fim de compreender melhor os potenciais efeitos da suplementação de FBU.

Aplicações da farinha de bagaço de uva na indústria alimentar

Em 2014, Walker *et al.* (22) lideraram um estudo para avaliar os efeitos da fortificação de produtos assados, incluindo pães, muffins e brownies com farinha de bagaço de uva Pinot Noir (FBUPN) ou Pinot Grigio (FBUPG) na faixa de concentração de 5-20%. FBUPN e FBUPG substituíram a farinha de trigo na concentração de 5%, 10% e 15% para pão, 10%, 15%, 20% e 25% FBUPN para brownies e 5%, 10% e 15% FBUPN ou 10%, 15% e 20% FBUPG para muffins. Os produtos finais foram então avaliados quanto ao teor de fenólicos totais, atividade de eliminação de radicais, teor de fibra alimentares e propriedades físico-químicas e sensoriais. Para a avaliação sensorial, os participantes receberam duas amostras de cada produto assado e avaliaram a semelhança dos parâmetros estabelecidos em uma escala

bread and muffins (5% or 10% GPF) and brownies (15% RGPF) were found to be acceptable and to be accepted by consumers when compared to control. About the bioactive composition, it could be observed that the total phenolic content and radical scavenging activity of breads increased as the GPF percent raised as well. For the bread and muffins, the total phenolic content followed the same trend as the increase of GPF was presented, except that the WGPF samples had significantly lower radical scavenging values when compared to RGPF ones. Similarly, the radical scavenging activity of brownies was only significantly higher in 10 and 25% RGPF fortified samples. In general, breads and muffins fortified with 10% RGPF increased their total phenolic content and radical scavenging activity by 5.86% and 194.38%, and 176.42% and 1144.87%, respectively, compared to the control. As for the dietary fiber content, there was a trend of increase as the percentage of GPF increased as well. Bread and muffins fortified with 10% RWGP increased their content 31.61% and 15.02%, respectively, when compared to the control. At 15% RGPF fortification, brownies had a 6.94% increase in dietary fiber content. Finally, the consumer acceptance of RGPF fortified baked good demonstrated that 5 and 10% breads presented a lower rating for mouth feel, what suggests that these samples was a little dry, as expected after the water activity and holding. Regarding the muffin samples, the 5% formulation presented the most acceptable color as the 10% demonstrated significantly higher scores and the control lower, indicating that these samples were too dark and light, respectively. As for the aroma rating, the 5% RGPF muffins presented the highest scores of the fortified samples, while the most appreciated was the control one. For the brownies, the less appreciated sample regarding texture was the 20% RGPF, which according to the panelists, presented big particle size of the pomace which interfered with this attribute.

Ortega-Heras *et al.* 2019 (23) designed a study to evaluate the adequacy of sensory attributes, nutritional, color, and texture proprieties of muffins fortified with red (RGPF) and white (WGPF) grape pomace flour. Five formulations of muffins were analyzed: a control muffin composed of 100% whole-wheat flour and muffins made with 10 and 20% of RGPF or WGPF (free of seeds). For the sensory analysis, participants received one muffin of each formulation and were asked to indicate the degree of preference using a nine-point hedonic scale, ranging from “disliked extremely” to “like extremely”. The evaluated attributes were surface color, crumb color, sweetness, hardness, chewiness, and flavor using a five-point bipolar scale. In addition, were

hedônica de 9 pontos. As análises das propriedades físico-químicas e dos compostos bioativos foram realizadas de acordo com a metodologia estabelecida para cada parâmetro. Em relação às características físico-químicas e sensoriais, tanto pães e muffins (5% ou 10% FBU) quanto brownies (15% FBUPN) mostraram-se aceitáveis e aceitos pelos consumidores quando comparados ao controle. Sobre a composição bioativa, pode-se observar que o teor de fenólicos totais e a atividade sequestrante de radicais dos pães aumentaram à medida que o percentual de FBU aumentou. Para os pães e muffins, o teor de fenólicos totais seguiu a mesma tendência que o aumento de FBU foi apresentado, exceto que as amostras de FBUPG que apresentaram valores de eliminação de radicais significativamente menores quando comparadas às de FBUPN. Da mesma forma, a atividade de eliminação de radicais em brownies só foi significativamente maior em amostras fortificadas com 10 e 25% de FBUPN. Em geral, pães e muffins fortificados com 10% de FBUPN aumentaram seu conteúdo fenólico total e atividade sequestrante de radicais em 5,86% e 194,38%, e 176,42% e 1144,87%, respectivamente, em relação ao controle. Quanto ao teor de fibra alimentar, houve uma tendência de aumento à medida que o percentual de GPF aumentou também. Pães e muffins fortificados com 10% FBUPN aumentaram seu conteúdo em 31,61% e 15,02%, respectivamente, quando comparados ao controle. Na fortificação de 15% FBUPN, os brownies tiveram um aumento de 6,94% no teor de fibra alimentar. Por fim, a aceitação do consumidor do produto de panificação fortificado com FBUPN demonstrou que os pães de 5 e 10% apresentaram menor classificação para sensação na boca, o que sugere que essas amostras ficaram mais secas, de acordo com os valores de atividade da água e retenção avaliadas. Em relação às amostras de muffins, a formulação de 5% apresentou a cor mais aceitável comparativamente às percentagens de 10% e do controle. Quanto à classificação de preferência pelo aroma, os muffins 5% FBUPN apresentaram as maiores pontuações das amostras fortificadas, enquanto o mais apreciado foi o controle. Para os brownies, a amostra menos apreciada relativamente à textura foi o de 20% FBUPN, que segundo os provadores, apresentou uma elevada granulometria, o que interferiu neste atributo.

Ortega-Heras *et al.* 2019 (23) avaliou a adequação dos atributos sensoriais, das propriedades nutricionais, da cor e da textura de muffins fortificados com FBU tinta (FBUT) e branca (FBUB). Para isso, foram analisadas cinco formulações de muffins: um muffin controle composto por 100% de farinha de trigo integral e muffins elaborados com 10 e 20% de FBUT ou FBUB (sem

Table 3. Detailed description of each sensorial study included in this review. (n=5)

Identification	Location	Sample	Age	Study design	Intervention	Principal results	Principal effects
Walker et al., 2014	United States	Graduate students and staff in the Department of Food Science & Technology	From 18 to 30 years	Sensory evaluation, physicochemical, bioactive, and sensory properties	For the sensory evaluation, the participants received 2 samples of RGPF and WGPF substituted wheat flour at concentration of 5%, 10%, and 15% for bread, 10%, 15%, 20%, and 25% of RGPF for brownies, and 5%, 10%, and 15% of RGPF or 10%, 15%, and 20% of WGPF for muffins. Physicochemical properties and bioactive compounds analyses were performed according to the literature to each parameter.	According to the total phenolic content, the radical scavenging activity, and the dietary fibre content the highest values were observed in 15% fortified samples with RGPF. For the brownies, the highest levels of radical scavenging activity were observed on 10% RGPF fortified brownies and the dietary fibre on the 25% fortified ones. Sensory evaluation concluded that there is no difference in overall liking of 5% and 10% RGPF breads and muffins or 15% and 20% WGPF brownies compared to the controls	↑ antioxidant dietary fibre of baked goods
Ortega-Heras et al., 2019	Spain	104 untrained judges, habitual consumers (who consumes muffins at least once every week)	From 18 to 55 years	Sensory evaluations	Participants received five different formulations of muffins: a control muffin with 100% of whole-wheat flour and muffins with 10 and 20% of WGPF or RGPF replacing the part corresponding to whole-wheat flour with the product	↑ content of fibre and fat, were darker, showing lower lightness values, both in the crust and in the crumb. The muffins with 10% of WGPF or RGPF had higher liking scores than those with 20% incorporation	Enriched the muffins nutritionally and altered the color
Cilli et al., 2019	Brazil	110 untrained individuals recruited from the staff at the Federal University of São Paulo	From 18 to 56 years	Sensory evaluation, microbiological properties, <i>in vitro</i> cytotoxicity and characterization of GPF	Participants received approximately 10g of three different formulations of salmon burger: a control negative and the addition of 1 or 2% of GPF. Microbiological properties, <i>in vitro</i> cytotoxicity and characterization of GPF were performed according to each methodology	↑ dietary fibre content, demonstrated to be secure for human consumption as it only presented cytotoxic effects on mouse fibroblasts at 800 mg/ml, whereas the formulation of the burgers presented 100 or 200 mg/ml of GPF. According to the sensory evaluation, the 1% GPF formulated salmon burger has the highest acceptability when compared to the 2% samples, but both has lower scores when compared to the control burgers. According to the TBARS content on burgers, the researchers found out that the GPF exerted a ↓ of it after frozen storage.	Enriched burgers' nutritionally
Palma et al., 2020	Portugal	53 untrained individuals (male and female), mainly students and researchers who voluntarily agreed to participate on this test	From 14 to 83 years	Sensory evaluation by applying a hedonic test	Participants received four different formulations with the incorporation of GPF to evaluate: cracker with 5% or 10% incorporation of Arinto variety GPF and cracker with 5% or 10% incorporation of Touriga Nacional variety GPF	The most appreciated crackers by the sensory evaluation characteristics were 10% Arinto GPF, with the higher scores of colour, aroma, flavor and texture. The second most appreciated cracker were 10% Touriga Nacional GPF. The "least liked" cracker was the 5% Touriga Nacional GPF and the "most liked" were 10% Touriga Nacional GPF.	Influenced colour, aroma, flavor, and texture of crackers, and influenced the acceptability
Palma et al., 2021	Portugal	149 untrained individuals of both sexes randomly recruited at the university campus on the testing days	From 18 to 88 years	Sensory test	Participants received five different formulations of sweet cookies with the incorporation of GPF to evaluate: cracker with 15% and 20% incorporation of Arinto or Touriga Nacional variety GPF and a control preparation	Regarding color, the lowest scores were obtained for the two different incorporations of Touriga Nacional variety GPF and the lowest flavor score was obtained for the 15% Touriga Nacional GPF incorporation cookie. Both 20% of GPF formulation cookie were described as the least favorite flavor. The 15% Touriga Nacional GPF incorporation cookie was the most accepted texture	Influenced colour, aroma, flavor, and texture of cookies, and influenced the acceptability

GPF: grape pomace flour; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; WGPF; White grape pomace flour' RGPF; Red grape pomace flour. The up arrow ↑ represents increase, down arrow ↓ represents decrease

Tabela 3. Descrição detalhada de cada estudo sensorial incluído nesta revisão. (n=5)

Identificação	Localização	Amostra	Idade	Design de estudo	Intervenção	Resultados principais	Efeitos principais
Walker et al., 2014	Estados Unidos	Alunos licenciados e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos	De 18 a 30 anos	Avaliação sensorial, propriedades físico-químicas, bioativas e sensoriais	Para a avaliação sensorial, os participantes receberam 2 amostras substituindo a farinha de trigo por FBUPN ou FBUPG na concentração de 5%, 10% e 15% para pão, 10%, 15%, 20% e 25% FBUPN para biscoitos e 5%, 10%, 15% e 20% FBUPN ou 10%, 15% e 20% FBUPG para muffins. As análises das propriedades físico-químicas e dos compostos bioativos foram realizadas de acordo com a literatura para cada parâmetro	De acordo com o teor de fenólicos totais, a atividade antioxidante e o teor de fibra alimentar, os maiores valores foram observados nas amostras fortificadas com 15% com FBUPN de pães e muffins. Para os biscoitos, os maiores níveis de atividade antioxidante foram observados nos biscoitos fortificados com 10% FBUPN e a fibra alimentar nos fortificados com 25%. A avaliação sensorial concluiu que em geral não há diferença na preferência dos pães e muffins com 5% e 10% FBUPN ou biscoitos 15% e 20% FBUPG em comparação com os controles.	↑ fibra anti-oxidante dietética dos produtos
Ortega-Heras et al., 2019	Espanha	104 participantes não treinados, consumidores habituais de muffins (pelo menos uma vez por semana)	De 18 a 55 anos	Avaliações sensoriais	Os participantes receberam cinco formulações diferentes de muffins: muffin controle com 100% de farinha de trigo integral e muffins com 10 e 20% de FBUB ou FBUT substituindo a parte correspondente à farinha de trigo integral no produto	Todos os muffins elaborados com subprodutos de uva apresentaram ↑ teor de fibra e gordura do que o controle. Além disso, os muffins elaborados com as FBUB foram mais escuros que os muffins controle, apresentando ↓ valores de luminosidade, tanto na crosta quanto no miolo. Os muffins com 10% de FBUB ou FBUT tiveram pontuações de preferência mais ↑ do que aqueles com 20% de incorporação	Enriqueceu os muffins nutricionalmente e modificou a coloração
Cilli et al., 2019	Brasil	110 indivíduos não treinados recrutados entre os funcionários da Universidade Federal de São Paulo	De 18 a 56 anos	Avaliação sensorial, propriedades microbiológicas, citotoxicidade <i>in vitro</i> e caracterização de FBU	Os participantes receberam aproximadamente 10 g de três diferentes formulações de hambúrguer de salmão: um controle e a adição de 1 ou 2% de incorporação de FBU. As propriedades microbiológicas, citotoxicidade <i>in vitro</i> e caracterização da FBU foram realizadas de acordo com cada metodologia	Os hambúrgueres fortificados apresentaram ↑ teor de fibra alimentar quando comparados às amostras controle. Além disso, o FBU mostrou-se seguro para consumo humano, pois apresentou efeitos citotóxicos em fibroblastos de camundongos apenas a 800 mg/ml, enquanto a formulação de dos hambúrgueres apresentou 100 ou 200 mg/ml de FBU. De acordo com a avaliação sensorial, o hambúrguer de salmão formulado com 1% FBU tem a ↑ aceitabilidade quando comparado às amostras de 2%, mas ambos apresentam pontuações inferiores quando comparados aos hambúrgueres controle. Os autores observaram que a incorporação de FBU ↓ o teor de TBARS originados durante período de armazenamento.	Enriqueceu os hambúrgueres nutricionalmente
Palma et al., 2020	Portugal	53 indivíduos não treinados (homens e mulheres), principalmente estudantes e investigadores que concordaram voluntariamente em participar neste teste	De 14 a 83 anos	Avaliação sensorial através da aplicação de um teste hedônico	Os participantes testaram quatro formulações diferentes de incorporação FBUT para avaliar: biscoitos salgados com 5%, 10% de farinha da casta Arinto e Touriga Nacional.	Os biscoitos mais apreciados pelas características de avaliação sensorial foram 10% Arinto, com as maiores pontuações de cor, aroma, sabor e textura. O segundo biscoito mais apreciado foi a Touriga Nacional 10%. O biscoito "menos apreciado" foi o Touriga Nacional 5% e o "mais apreciado" foi o Touriga Nacional 10%	Aterrou coloração, aroma, sabor e textura dos biscoitos, e influenciou a aceitabilidade
Palma et al., 2021	Portugal	149 indivíduos não treinados de ambos os sexos recrutados aleatoriamente no campus universitário nos dias do ensaio	De 18 a 88 anos	Avaliação sensorial através da aplicação de um teste hedônico	Os participantes receberam cinco formulações diferentes de biscoitos doces com incorporação de FBUT para avaliar: biscoito com 15% e 20% de incorporação de FBUT castas Arinto ou Touriga Nacional e uma preparação de controle	Em relação à cor, as menores notas foram obtidas pelas duas diferentes incorporações de FBUT da casta Touriga Nacional, e a menor valor de sabor foi obtida para o biscoito com 15% de incorporação de FBUT Touriga Nacional. Ambos as formulações com 20% de FBUT foram descritas como sabor menos preferido. O biscoito com 15% de incorporação de FBUT Touriga Nacional foi a textura mais aceite	Aterrou coloração, aroma, sabor e textura dos biscoitos, e influenciou a aceitabilidade

FBU: farinha de bagaço de uva; FBUB: farinha de bagaço de uva branca; FBUPG : farinha do bagaço de uva Pinot Grigio; FBUPN: farinha do bagaço de uva Pinot Noir; FBUT: farinha de bagaço de uva tinta; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. A seta para cima ↑ representa aumento e a seta para baixo ↓ representa diminuição.

evaluated the nutritional composition, height increase and weight loss, color and texture profile analysis of the muffins, according to each previously proposed methodology. In terms of nutritional composition, it was observed that the GPF-fortified muffins had higher fiber content, which ranged from 5.67 ± 0.44 in the control formulation to 9.56 ± 0.55 and 11.9 ± 0.3 in the 10 and 20% WGPF formulations, respectively and 8.24 ± 0.64 and 11.2 ± 0.7 in the 10 and 20% RGPF formulations, respectively, and fat which ranged from 26.7 ± 2.1 in the control muffins to 31.0 ± 3.9 and 32.4 ± 1.2 in 10 and 20% WGPF, respectively and 33.3 ± 1.9 and 33.8 ± 1.1 in 10 and 20% RGPF formulations, while the control muffins showed the highest height increase (23.0 ± 2.6) and the 20% fortified muffins showed the highest weight loss scores (14.8 ± 1.7 for WGPF and 13.8 ± 1.4 for RGPF). Regarding colour and texture parameters, muffins prepared with GPF were darker and firmer when compared to the control muffin. Furthermore, the addition of GPF resulted in an increase in chewiness (from 3.08 ± 1.02 in the control muffins and 9.10 ± 5.88 in the muffins fortified with 20% WGPF) and a decrease in resilience as the percentage of GPF increased (0.224 ± 0.006 in 10% WGPF, 0.194 ± 0.014 20% WGPF, 0.225 ± 0.018 10% RGPF and 0.197 ± 0.033 20% RGPF). Finally, the 20% GPF concentrations resulted in a significant reduction in muffin elasticity (from 0.609 ± 0.009 in 10% WGPF to 0.541 ± 0.014 in 20% WGPF and 0.604 ± 0.015 in RGPF 10% to 0.561 ± 0.081 in RGPF 20%). After sensory analysis, the authors observed that the most liked muffin was the control (7.05 ± 1.11), followed by the 10% RGPF or WGPF formulations (6.34 ± 1.29 and 6.24 ± 1.42 , respectively). The organoleptic analyses showed that the fortified muffins had "much more" color and flavor, especially in the formulation with RGPF 20% (41% e 29%). According to the perception of sweetness, the WGPF formulations showed poorer results.

In 2019, Cilli *et al.* (24) evaluated the antioxidant potential of GPF in a frozen salmon burger. Volunteers were recruited to participate in a sensory evaluation in which they received approximately 10 g of three burgers with different formulations: the control, and 1 or 2% GPF incorporation. Each was evaluated in terms of color, odor, taste, texture, appearance, and overall quality using a 9-point verbal hedonic scale. Participants were also asked to give their opinion

sementes). Para a análise sensorial, os participantes receberam um muffin de cada formulação e foram solicitados a indicar o grau de preferência por meio de uma escala hedônica de 9 pontos, variando de "desgostei extremamente" a "gostei extremamente". Os atributos avaliados foram: cor da superfície, cor do miolo, doçura, dureza, esponjosidade e sabor, utilizando uma escala bipolar de 5 pontos. Além disso, foram avaliadas a composição nutricional, aumento de altura e perda de peso, análise do perfil de cor e textura dos muffins. Os resultados, em termos da composição nutricional, observou-se que os muffins fortificados com FBU apresentaram maior teor de fibra, que variou de 5.67 ± 0.44 na formulação controle para 9.56 ± 0.55 e 11.9 ± 0.3 nas formulações FBUB 10 e 20%, respectivamente e 8.24 ± 0.64 e 11.2 ± 0.7 nas formulações FUBT 10 e 20%, respectivamente, e gordura que variou de 26.7 ± 2 nos muffins controle para 31.0 ± 3.9 e 32.4 ± 1.2 no FBUB 10 e 20%, respectivamente e 33.3 ± 1.9 e 33.8 ± 1.1 nas formulações 10 e 20% da FBUT, enquanto os muffins controle apresentaram o maior aumento de altura (23.0 ± 2.6) e os muffins fortificados 20% apresentaram os maiores escores de perda de peso (14.8 ± 1.7 para FBUB e 13.8 ± 1.4 para FBUT). Em relação aos parâmetros de cor e textura, os muffins elaborados com FBU foram mais escuros e firmes quando comparados ao muffin controle. Além disso, a adição de FBU resultou num aumento da mastigabilidade (de 3.08 ± 1.02 quando nos muffins controle e 9.10 ± 5.88 nos fortificados com FBUB 20%) e uma diminuição da resiliência à medida que a percentagem de FBU aumentou (sendo 0.224 ± 0.006 na FBUB 10%, 0.194 ± 0.014 na FBUB 20%, 0.225 ± 0.018 FBUT na 10% e 0.197 ± 0.033 FBUT na 20%). Por fim, as concentrações de 20% de FBU sofreram uma redução significativa da elasticidade dos muffins (de 0.609 ± 0.009 na FBUB 10% para 0.541 ± 0.014 na FBUB 20% e 0.604 ± 0.015 na FBUT 10% para 0.561 ± 0.081 na FBUT 20%). Após a análise sensorial, os autores observaram que o muffin mais apreciado foi o controle (7.05 ± 1.11), seguido da formulação a 10% de FBUT ou FBUB (6.34 ± 1.29 e 6.24 ± 1.42 , respectivamente). As análises organolépticas mostraram que os muffins fortificados tinham "muito mais" cor e sabor, principalmente na formulação com FBUT 20% (41% e 29%). De acordo com a percepção de doçura, pode-se observar que as formulações de FBUB apresentaram piores resultados.

Em 2019, Cilli *et al.* (24) avaliaram o potencial antioxidante da FBU num hambúrguer de salmão congelado. Nesse sentido, foram recrutados voluntários para participar numa avaliação sensorial na qual

on purchase intention using a 5-point scale. The authors also analyzed the TBARS content and *in vitro* cytotoxicity of GPF according to the methodology accepted in the literature. According to the cytotoxicity, the GPF showed a good cytocompatibility when exposed to mouse fibroblasts cells, exerting cytotoxic effects only at 800 mg of GPF/ml, which means that the 1 and 2% formulations of burgers are safe as represents 100 and 200 mg of GPF/ml, respectively. The proximate composition of the burgers showed that GPF addition improved the dietary fiber content from 4.60 on control formulation to 4.90 and 5.20 in supplemented burgers, respectively, and darkness, which was evaluated through lightness diminution, from 70.77 ± 0.47 for the control sample to 66.29 ± 0.46 in the 100 mg and 63.08 ± 0.32 in the 200 mg of GPF/ml supplementation. As for the sensory evaluation of salmon burgers, the researchers could observe that both the supplementation of GPF was less appreciated for appearance from 7.75 ± 0.12 on the control to 6.55 ± 0.15 and 6.20 ± 0.18 on the supplemented, from 7.73 ± 0.12 to 6.57 ± 0.15 and 6.25 ± 0.18 of color, and overall quality of salmon burgers from 7.79 ± 0.10 to 7.12 ± 0.14 and 6.85 ± 0.16 as compared to the negative control. In general, the 1% GPF formulation of burger was more accepted by the consumers and presented a higher purchase intention, representing 23.64% of the participants that would certainly buy it, when compared to the 2% samples (20.91%). Finally, the authors could observe that GPF supplementation in the salmon burgers resulted in a decrease of TBARS content during storage without negatively compromising the nutritional or microbiological characteristics.

In 2020, Palma *et al.* (5) performed a sensory evaluation of salty biscuits fortified with GPF at percentages of 5 and 10%. The participants received five different formulations of biscuits: flour of the Arinto and Touriga Nacional variety (5 and 10% of the amount of wheat flour), and a control of the same formulation, without GPF. The attributes evaluated by the volunteers were: color, aroma, flavor, texture, and global impression using a 5-point hedonic scale. Parameterized purchase intention was also assessed according to a 5-point scale. Participants were also asked to choose which biscuits they "like the most" and which they "like the least". At the end of the sensory evaluation, the authors could observe that the Arinto 10% biscuit had the highest scores of which represented 4.32 points, 3.72 for aroma, 4.32 for flavor, 3.92 for texture, 4.32 for overall appreciation and 4.32 of purchase intention when compared to the other biscuits, although none of these results are statistically significant. It could also be observed that

receberam aproximadamente 10 g de três hambúrgueres com diferentes formulações: o controle, e 1 ou 2% de incorporação de FBU que foram avaliados em termos da cor, odor, sabor, textura, aparência e qualidade geral, usando uma escala hedônica verbal de 9 pontos. Os participantes foram também convidados a dar sua opinião sobre a intenção de compra usando uma escala de 5 pontos. Os autores analisaram também o teor de TBARS e a citotoxicidade *in vitro* da FBU de acordo com a metodologia aceite na literatura. Em termos de citotoxicidade, a FBU apresentou boa citocompatibilidade quando exposto a células de fibroblastos de camundongo, exercendo efeitos citotóxicos apenas com 800 mg de FBU/ml, o que significa que as formulações com incorporações de 1 e 2% de hambúrgueres são seguras, pois representam 100 e 200 mg de FBU/ml, respectivamente. A composição centesimal dos hambúrgueres mostrou que a adição de FBU melhorou o teor de fibra alimentar de 4,60 na formulação controle para 4,90 e 5,20 nos hambúrgueres suplementados, respectivamente, e o escurecimento que foi avaliada pela diminuição da luminosidade, de $70,77 \pm 0,47$ na amostra controle para $66,29 \pm 0,46$ em 100mg e $63,08 \pm 0,32$ em 200mg de suplementação de GPF/ml. Quanto à avaliação sensorial dos hambúrgueres de salmão, os autores observaram que a incorporação com FBU foi menos apreciada pela aparência de $7,75 \pm 0,12$ no controle para $6,55 \pm 0,15$ e $6,20 \pm 0,18$ no suplementado, de $7,73 \pm 0,12$ para $6,57 \pm 0,15$ e $6,25 \pm 0,18$ de cor, e qualidade geral dos hambúrgueres de salmão de $7,79 \pm 0,10$ a $7,12 \pm 0,14$ e $6,85 \pm 0,16$ em relação ao controle negativo. No geral, a formulação de hambúrguer com 1% GPF foi mais aceita pelos consumidores e apresentou maior intenção de compra, representando 23,64% dos participantes que certamente comprariam, quando comparada com as amostras de 2% (20,91%). Por fim, os autores constataram que, durante o armazenamento, a incorporação de FBU originou uma diminuição do teor de TBARS, sem comprometer negativamente as características nutricionais ou microbiológicas.

Em 2020, Palma *et al.* (5) realizaram uma avaliação sensorial de biscoitos salgados fortificados com FBU nas percentagens de 5 e 10%. Os participantes receberam cinco formulações diferentes de biscoitos: farinha da variedade Arinto e Touriga Nacional (5 e 10% da quantidade de farinha de trigo), e um controle da mesma formulação sem FBU. Os atributos avaliados pelos voluntários foram: cor, aroma, sabor, textura e impressão global utilizando uma escala hedônica de 5 pontos. Foi ainda avaliada a intenção de compra parametrizada de acordo com uma escala

the formulations with the lowest concentrations of GPF were less appreciated by the participants (Arinto 5% and Touriga Nacional 5% representing 30.20% and 41.50% of the participants, respectively). Finally, the most and least liked biscuits choice question resulted in a highest number of votes to GPF Touriga Nacional 10% as the “best liked” biscuit, representing 39.60% of the participants and GPF Touriga Nacional 5% as the “least liked,” representing 41.50%.

Similarly, in 2021, Palma *et al.* (25) aimed to evaluate the acceptability of sweet biscuits fortified with Arinto or Touriga Nacional GPF, with a higher percentage of incorporation and with a wider range of volunteers than the previous work. The participants received five biscuits with different formulations: GPF from the Arinto variety and GPF from the Touriga Nacional variety in 15 and 20% incorporations and control biscuits without GPF supplementation. The tests were conducted on two different days and the participants were given a questionnaire to evaluate parameters such as color, taste, texture, aroma and general impression, purchase intention and preference, in which the participants were asked to rate the biscuits as “most liked”, “liked more or less” and “least liked”. In this study, the highest scores were assigned to the control biscuit. Meanwhile, both Touriga Nacional GPF formulations presented a lower score related to color and flavor (scoring 3,83 out of 5 points), however they presented the highest texture scores. According to purchase intention, the highest percentages were attributed to the Arinto GPF incorporations of 15 and 20% (representing 32,1% each) and the biscuits with the lowest purchase intention were those of the control formulation (6,4% of the participants referred that would certainly not buy it). Finally, the choice preferences showed that the most appreciated biscuit was the control, and among the fortified biscuits, the highest scores were those of Touriga Nacional GPF 15 and 20% followed by Arinto GPF 20 and 15%.

Based on the results presented by the previous mentioned studies, it could be observed that different incorporation ratio of GPF on different recipes of baked goods (salty

de 5 pontos. Foi também solicitado aos participantes que escolhessem qual dos biscoitos “mais gostam” e de qual “menos gostam”. No final da avaliação sensorial, os autores puderam observar que o biscoito Arinto 10% apresentou as maiores pontuações na cor, o que representou 4,32 pontos, 3,72 em aroma, 4,32 em sabor, 3,92 em textura, 4,32 de apreciação global e 4,32 de intenção de compra quando comparado aos restantes biscoitos, embora nenhum desses resultados tenha sido estatisticamente significativo. Adicionalmente, observou-se que as formulações com menores percentagens de FBU foram as menos apreciadas pelos participantes (Arinto 5% e Touriga Nacional 5%, representando 30,20% e 41,50% dos participantes, respectivamente). Por fim, a questão de escolha dos biscoitos mais e menos apreciada resultou num maior número de votos para a Touriga Nacional 10% como o biscoito “mais apreciado” que representou 39,60% dos participantes e a Touriga Nacional 5% como o “menos apreciado”, representando 41,50%.

Da mesma forma, em 2021, Palma *et al.* (25) teve como objetivo avaliar a aceitabilidade de biscoitos doces fortificados com FBU Arinto ou Touriga Nacional, com uma maior percentagem de incorporação e com maior abrangência de voluntários do que o trabalho anterior. Os participantes receberam cinco biscoitos com diferentes formulações: FBU da casta Arinto e FBU da casta Touriga Nacional nas incorporações de 15 e 20% e biscoitos controlo sem suplementação de FBU. Os testes foram realizados em dois dias diferentes e os participantes receberam um questionário para avaliar os parâmetros como a cor, sabor, textura, aroma e impressão geral, intenção de compra e preferência, no qual os participantes foram solicitados a classificar os biscoitos como “mais gostei”, “gostei mais ou menos” e “menos gostei”. Neste estudo, as maiores pontuações foram atribuídas ao biscoito controlo. Enquanto isso, ambas as formulações de FBU Touriga Nacional apresentaram uma menor pontuação relacionada com a cor e sabor, pontuando 3,83 de 5, contudo apresentaram as maiores pontuações de textura. De acordo com a intenção de compra, as maiores percentagens foram atribuídas às incorporações da FBU Arinto de 15 e 20%, representando 32,1%, cada, e os biscoitos com menor intenção de compra foram os da formulação controlo, sendo que 6,4% dos participantes informaram que certamente não comprariam. Por fim, as preferências de escolha demonstraram que o biscoito mais apreciado foi

and sweet ones) and salmon burgers demonstrated a heterogeneous preference for the control or fortified samples. In general, the addition of GPF interferes with the organoleptic characteristics such as color, in which the final product tends to be darker as the percentage of flour increases and to present a feature similar to the grape cast, which means that it acquires a purple to red color when fortified with RGPF and a yellow to brown color when added the WGPF. The capacity of GPF to influence the color of the products represents a beneficial attribute because, according to the literature, consumers tend to associate darker baked goods as healthier ones, being the preferred choice when seeking functional food (22). Furthermore, GPF presented a higher content of dietary fiber when compared to the control formulations investigated in the studies mentioned, increasing as the percentage of GPF was increased. According to the literature, dietary fiber intake is associated with decreased risk of cardiovascular disease (26) and other chronic diseases, in addition to an association with lower body weight, what represents benefits to health (27).

Furthermore, the chemical composition analyses demonstrated that GPF is rich in bioactive compounds, as its concentrations were generally higher than those in control formulations. As for the final products the phenolic composition tends to increase as the percentage of GPF is increased. Other characteristics of fortified baked goods are hardness and chewiness, in which the panelists indicated that those samples presented a dryer texture, which can be explained by the flour's lower water activity and water retention, which results in incomplete hydration of the flour and might attribute to its harder texture (22).

Finally, the authors could observe that even though a fortified baked good presented lower single characteristics such as color and texture scores, when compared to the control, the same samples could achieve higher values of purchase intention or likeness. According to the literature, it could be explained as consumers do not always answer "like and dislike" questions the same as specific ones due to emotional influence (5,25). In this sense, the need of evaluating the same formulation with different methods and the necessity of new studies investigating different concentrations and preparations using GPF and a larger scope of volunteers is emphasized to better

o controlo, e entre os biscoitos fortificados, as pontuações mais elevadas foram os da FBU Touriga Nacional 15 e 20% seguida da FBU Arinto 20 e 15%.

De acordo com os estudos mencionados anteriormente, pode-se verificar que diferentes percentagens de incorporação de FBU em diferentes produtos de panificação (salgados e doces) e hambúrguer demonstraram uma preferência heterogênea entre as amostras controlo ou fortificadas. Em geral, a adição de FBU interfere nas características organolépticas como a cor, já que, o produto final tende a ser mais escuro à medida que a percentagem de farinha aumenta de acordo com a característica da casta da uva utilizada, o que faz com que adquira uma coloração roxo escuro a vermelha quando fortificada com FBUT e uma cor amarela a marrom quando adicionadas as farinhas FBUB. A capacidade da FBU de influenciar na cor dos produtos representa um atributo benéfico, pois, segundo a literatura, os consumidores tendem a associar os produtos mais escuros aos mais saudáveis, sendo estes a escolha preferencial na busca por um alimento funcional (22). Além disso, a FBU apresentou maior teor de fibra alimentar quando comparado às formulações controlo investigadas nos estudos citados anteriormente, aumentando de acordo com a percentagem de FBU usada. De acordo com a literatura, a ingestão de fibras alimentares está associada à diminuição do risco de doenças cardiovasculares (26) e outras doenças crónicas, além de uma associação com menor peso corporal, o que representa benefícios para a saúde (27).

Além disso, as análises de composição química demonstraram que as FBU são ricas em compostos bioativos, pois as suas concentrações foram geralmente superiores às encontradas nas formulações controlo. Quanto aos produtos finais, a composição fenólica tende a aumentar à medida que a percentagem de FBU aumenta. Outra característica dos produtos de panificação fortificados é a dureza e a mastigabilidade, para as quais os participantes indicaram que as amostras fortificadas apresentavam uma textura mais seca, o que pode ser explicado pela menor atividade de água e retenção de água das farinhas, que resulta numa hidratação incompleta que pode estar relacionada com uma textura mais dura (22).

Por fim, os autores observaram que alguns dos produtos de panificação fortificados apresentaram pontuações mais baixas do que as amostras controlo, ao analisar características isoladas como a cor e textura. No entanto as mesmas amostras poderiam atingir valores mais elevados de intenção de compra ou preferência. De acordo com a literatura, pode ser explicado devido aos

understand general preferences for the introduction of its consumption as a functional food.

Conclusion

GPF is a by-product of the wine industry that represents a valuable source of important nutrients with healthy antioxidant, cardio protective, and anti-hyperglycemic-promoting activities. GPF also represents an alternative to inadequate GP disposal, which might lead to environmental problems. Recent evidence is demonstrating that this by-product may have an important effect in the optimization of health benefits and minimizing possible negative health markers. In addition, the incorporation of fiber-rich GPF in different recipes results in higher nutritional value and sensory properties of the final product. Although there are preclinical and clinical studies observing that some mechanisms played by its chemical composition may act as cardio and neuroprotective, more investigations are needed regarding the targets and pathways by which the effects of GPF can act to improve health and food nutritional quality to better understand its molecular interaction on systemic biochemical parameters and food shelf life and sensory characteristics.

Authors Contributions Statement

RCP - study design, data analyses, writing; PP - supervision, revision; MN- supervision, revision; MLP -supervision, revision; RGT - study design, supervision, final revision

Conflict of Interests

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

consumidores nem sempre responderem às questões “gostei e desgostei” da mesma forma que as específicas devido à influência emocional (5,25). Nesse sentido, realça-se a necessidade de avaliar a mesma formulação com métodos diferentes e serem necessários novos estudos com diferentes percentagens de incorporação de FBU e um maior numero de voluntários cuja compreensão seja melhor acerca da introdução destes produtos como alimento funcional.

Conclusão

A FBU é um subproduto da indústria do vinho que representa uma fonte valiosa de importantes nutrientes com atividades promotoras de saúde, como antioxidante, cardioprotetora e anti-hiperglicêmica. Além disso, representa uma alternativa ao descarte inadequado de BU, que pode acarretar em problemas ambientais. Evidências recentes demonstram que esse subproduto pode desempenhar um efeito importante na otimização dos benefícios à saúde e na minimização de possíveis marcadores negativos de saúde. Além disso, a incorporação de FBU rico em fibras em diferentes receitas resulta em maior valor nutricional e propriedades sensoriais do produto final. Embora existam estudos pré-clínicos e clínicos observando que alguns mecanismos desempenhados por sua composição química podem atuar como cardio e neuroprotetores, mais investigações sobre os alvos e vias pelas quais os efeitos da FBU podem atuar para melhorar a saúde e a qualidade nutricional dos alimentos são necessárias para entender melhor sua interação molecular em parâmetros bioquímicos sistêmicos e vida de prateleira de alimentos e características sensoriais.

Declaração sobre as contribuições do autor

RCP - desenho do estudo, análise de dados, redação; PP - supervisão, revisão; MN- supervisão, revisão; MLP - supervisão, revisão; RGT - desenho do estudo, supervisão, revisão final

Conflito de Interesses

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

References / Referências

1. OIV, "International Organisation of Vine and Wine," Report, 2019, [Online]. Available: <http://www.oiv.int/>. [Accessed: 15-set-2022].
2. Özvural, E.B. & Vural, H. (2014) Which is the best grape seed additive for frankfurters: extract, oil or flour? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(4), 792–797. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6442>
3. Garcia-Lomillo, J. & Gonzalez-Sanjos, M.L. (2017) Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions. *Comprehensive Reviews on Food Science and Food Safety*. 16(1), 3–22. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12238>
4. Averilla, J. N., Oh, J., Kim, H.J., Kim, J.S. & Kim, J.-S. (2019) Potential health benefits of phenolic compounds in grape processing by-products. *Food Science and Biotechnology*;28(6),1607-1615. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00628-2>
5. Palma, M.L., Nunes, M.C., Gameiro, R., Rodrigues, M., Gothe, S., Tavares, N., Pego, C., Nicolai, M. & Pereira, P. (2020) Preliminary sensory evaluation of salty biscuits with grape pomace flour. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*. 17(1), 33–43. doi: 10.19277/bbr.17.1.222
6. Šporin, M., Avbelj, M., Kovač, B. & Možina, S.S. (2018) Quality characteristics of wheat flour dough and bread containing grape pomace flour. *Food Science and Technology International*. 24(3),251-263. doi:[10.1177/1082013217745398](https://doi.org/10.1177/1082013217745398)
7. Antonić, B., Jančíková, S., Dordević, D. & Tremlová, B. (2020) Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods*. 9(11), 1-20. <https://doi.org/10.3390/foods9111627>
8. Hernández-Salinas, R., Decap, V., Leguina, A., Cáceres, P., Perez, D., Urquiaga, I., Iturriaga, R. & Velarde, V. (2015) Antioxidant and anti hyperglycemic role of wine grape powder in rats fed with a high fructose diet. *Biological Research*. 48, 1–9. doi 10.1186/s40659-015-0045-4
9. Rudrapal, M., Khairnar, S.J., Khan, J., Dukhyil, A.B., Ansari, M.A., Alomary, M.N., Alshabrm, F.M., Palai, Deb, P.K. & Devi. R. (2022) Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Frontiers in Pharmacology*. 13, 1-15. doi: 10.3389/fphar.2022.806470
10. Charradi, K., Mahmoudi, M., Bedhafi, T., Kadri, S., Elkahoui, S., Limam, F. & Aouani, E. (2017) Dietary supplementation of grape seed and skin flour mitigates brain oxidative damage induced by a high-fat diet in rat: Gender dependency. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 87, 519–526. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.015
11. Souza, C.F., Baldissera, M.D., Descovi, S.N., Zeppenfeld, C.C., Verdi, C.M., Santos, R.C.V., Silva, A.S. & Baldisserotto, B. (2019) Grape pomace flour alleviates *Pseudomonas aeruginosa*-induced hepatic oxidative stress in grass carp by improving antioxidant defense. *Microbial Pathogenesis*, 129, 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.024>
12. Peixoto, C. M., Dias, M.L., Alves, M.J., Calhelha, R.C., Barros, L., Pinho, S.P. & Ferreira, I.C.F.R. (2018). *Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties*. *Food Chemistry*;253, 132-138. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.163.
13. Luca, S.V., Macovei, I., Bujor, A. Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., Aprotosoae, A.C., Trifon, A. (2019) Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1-35. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546669>
14. Meng, T., Xiao, D., Muhammed, A., Deng, J., Chen, L., He, J. (2021) Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. *Molecules*. 5;26(1):229. doi: 10.3390/molecules26010229.
15. Hartogh, D.J.D., Tsiani, E. (2019) Health Benefits of Resveratrol in Kidney Disease: Evidence from In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrients*. 11(7), 1624. <https://doi.org/10.3390/nu11071624>
16. Alba, D.F., Campigotto, G., Cazarotto, C.J., Santos, D.S., Gebert, R.R., Reis, J.H., Souza, C.F., Baldissera, M.D., Gindri, A.L., Kempka, A.P., Palmer, E.A., Vedovatto, M. & Silva, A.S. (2019) Use of grape residue flour in lactating dairy sheep in heat stress: Effects on health, milk production and quality. *Journal of Thermal Biology* 82, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.04.007>
17. Rivera, K., Salas-Pérez, F., Echeverría, G., Urquiaga, I., Dicenta, S., Pérez, D., de la Cerda, P., González, L., Andia, M.E., Uribe, S., Tejos, C., Martínez, G., Busso, D., Irrarázaval, P. & Rigotti, A. (2019) Red Wine Grape Pomace Attenuates Atherosclerosis and Myocardial Damage and Increases Survival in Association with Improved Plasma Antioxidant Activity in a Murine Model of Lethal Ischemic Heart Disease. *Nutrients*. 11(9), 2135. 1-17. doi:10.3390/nu1109213.
18. Hari Krishnan, R., Devi, G., Doan, H.V., Balasundaram, C., Esteban, M.A. & Abdel-Tawwab, M. (2021) Impact of grape pomace flour (GPF) on immunity and immune-antioxidant-anti-inflammatory genes expression in *Labeo rohita* against *Flavobacterium columnaris*. *Fish and Shellfish Immunology*. 111, 69–82. doi: 10.1016/j.fsi.2021.01.011
19. Urquiaga, I., D'Acuña, S., Pérez, D., Dicenta, S., Escheverría, G., Rigotti, A. & Leighton, F. (2015) Wine grape pomace flour improves blood pressure, fasting glucose and protein damage in humans: a randomized controlled trial. *Biological Research*. 48 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0040-9>
20. Urquiaga, I., Troncoso, D., Mackenna, M.J., Urzúa, C., Pérez, D., Dicenta, S., de la Cerda, P.M., Amigo, L., Carreño, J.C., Echeverría, G. & Rigotti, A. (2018) The Consumption of Beef Burgers Prepared with Wine Grape Pomace Flour Improves Fasting Glucose, Plasma Antioxidant Levels, and Oxidative Damage Markers in Humans: A Controlled Trial. *Nutrients*. 10(10), 1-15. <https://doi.org/10.3390/nu10101388>
21. Sabra, A., Neticadan, T. & Wijekoon, C. (2021) Grape bioactive molecules, and the potential health benefits in reducing the risk of heart diseases. *Food Chemistry*. 12, 1-13 <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100149>
22. Walker, R., Tseg, A., Cavender, G, Ross, A. & Zhao, Y. (2014) Physicochemical, Nutritional, and Sensory Qualities of Wine Grape Pomace Fortified Baked Goods. *Journal of Food Science*, 79(9), 1811-1822. doi: 10.1111/1750-3841.12554
23. Ortigas-Heras, M., Gómez, I., de Pablos-Alcalde, S. & González-Sanjós, M.L. (2019) Application of the Just-About-Right Scales in the Development of New Healthy Whole-Wheat Muffins by the Addition of a Product Obtained from White and Red Grape Pomace. *Foods*, 8(8), 1-15. doi:10.3390/foods8090419
24. Cilli, L.P., Contini, L.R.F., Sinnecker, P., Lopes, P.S., Andreo, M.A., Neiva, C.R.P., Nascimento, M.S., Yoshida, C.M.P. & Venturini, A.C. (2020) Effects of grape pomace flour on quality parameters of salmon burger. *Journal of Food Processing and Preservation*. 44(2), 1-11. doi: 10.1111/jfpp.1432
25. Palma, M.L., Ferreira-Pêgo, C., Nicolai, M. & Pereira, P. (2021) Preliminary sensory evaluation of grape pomace flour sweet cookies. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*. 18(1), 92-102. doi: 10.19277/bbr.18.1.249
26. Soliman, G.A. (2019) Dietary Fiber, Atherosclerosis, and Cardiovascular Disease. *Nutrients*. 11(5), 1-11. doi: 10.3390/nu11051155
27. Dahl, W. & Stewart, M.L. (2015) Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Health Implications of Dietary Fiber. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 115(11), 1861-70. doi: 10.1016/j.jand.2015.09.003.

Ablation of Kex2 activity enhances proIAPP proteotoxicity in yeast

Ablação da atividade da Kex2 aumenta a proteotoxicidade induzida pelo proIAPP na levedura

Sofia Ferreira ^{1,2}, Ana F. Raimundo ^{3,4,5}, Inês Farrim ^{1,2}, Regina Menezes ^{1,3,4*}

¹CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ²Universidad de Alcalá, Escuela de Doctorado, Departamento de Ciencias Biomédicas, Madrid, Spain; ³iBET - Instituto de Biología Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal; ⁴NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas, NMS|FCM, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal; ⁵ITQB-NOVA, Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade NOVA Lisboa, Oeiras, Portugal

corresponding author / autor para correspondência: regina.menezes@ulusofona.pt

Abstract

Pancreatic deposition of Islet Amyloid PolyPeptide (IAPP) is a histopathological hallmark of type 2 diabetes. Inadequate processing of immature IAPP by proprotein convertases (PCs) leads to the accumulation of unprocessed forms, which in turn favors increased aggregate formation in pancreatic β -cells. Kexin 2 (Kex2) of *Saccharomyces cerevisiae* is the prototype of eukaryotic PCs family, but to date no direct correlations between Kex2 activity and preproIAPP processing in yeast have been reported. In this study we aimed to address the possible role of Kex2 on IAPP maturation as a tool to investigate the contribution of impaired processing towards IAPP proteotoxicity. Genetically modified *S. cerevisiae* models lacking the *KEX2* gene and carrying different chimeric fusions of human IAPP linked to GFP were used. The cytotoxic effects of Kex2 ablation were assessed by means of growth curve analysis and cell viability assays using flow cytometry. IAPP protein profile was evaluated by immunoblotting assays using an anti-IAPP antibody. Intracellular IAPP aggregates were monitored by confocal fluorescence microscopy. Data showed that *kex2* mutants exhibit growth defects, potentiated by preproIAPP-GFP, proIAPP-GFP and mature IAPP-GFP expression with an increased cytotoxicity for proIAPP-GFP. Notwithstanding, Kex2 absence does not seem to affect IAPP protein pattern nor the frequency/distribution of intracellular IAPP aggregates in yeast. Our findings suggest that Kex2 is not essential for IAPP processing in yeast, at least under the conditions tested.

Keywords: Amylin, Islet Amyloid Polypeptide (IAPP), Kexin 2, Prohormone processing, *Saccharomyces cerevisiae*

Resumo

A deposição pancreática do Polipéptido Amilóide dos Ilhéus (IAPP) é uma marca histopatológica da diabetes tipo 2. O processamento inadequado de IAPP imaturo pelas proproteínas convertases (PCs) despoleta a acumulação de formas não processadas que favorecem o aumento da formação de agregados nas células β . A Kexina 2 (Kex2) de *Saccharomyces cerevisiae* é o protótipo da família das PCs eucarióticas. Contudo, até ao momento, não existem evidências da ação da Kex2 no processamento do preproIAPP, em levedura. Neste estudo, pretendemos abordar o possível papel da Kex2 na maturação do IAPP como uma ferramenta para investigar a contribuição do processamento aberrante na proteotoxicidade deste péptido amiloidogénico. Foram utilizados modelos de *S. cerevisiae* que expressam diferentes fusões quiméricas de IAPP humano e nas quais o gene *KEX2* foi geneticamente deletado. Os efeitos citotóxicos da ablação da Kex2 foram avaliados através da análise de curvas de crescimento e ensaios de viabilidade celular por citometria de fluxo. O perfil de bandas do IAPP foi avaliado por ensaios de imunotransferência usando um anticorpo anti-IAPP. Agregados intracelulares de IAPP foram avaliados por microscopia confocal de fluorescência. Os dados mostraram que os mutantes *kex2* exibem defeitos de crescimento, potenciados pela expressão do preproIAPP-GFP, proIAPP-GFP e IAPP-GFP, havendo uma citotoxicidade aumentada para o proIAPP-GFP. No entanto, a ausência da Kex2 não parece afetar o padrão da proteína IAPP nem a frequência/distribuição dos seus agregados intracelulares em levedura. Estes resultados sugerem que a Kex2 não é essencial para o processamento do IAPP em levedura, pelo menos nas condições testadas.

Palavras-chave: Amilina, Polipéptido, Amilóide dos Ilhéus (IAPP), Kexina 2, Processamento de pro-hormonas, *Saccharomyces cerevisiae*

Introduction

Protein misfolding diseases cover a heterogeneous group of pathologies in which an amyloid-forming peptide acquires an alternative folding state, starts to oligomerize and to accumulate in tissues where the disease-specific damage occurs. This process can occur systemically or at the site of protein production, as it is the case of type 2 diabetes (T2D) (1). The uncontrolled deposition of Islet Amyloid PolyPeptide (IAPP) is a hallmark of T2D, being present in nearly 90% of the individuals at post-mortem (2) and in 50% of insulinomas (3). IAPP, or amylin, is a 37-amino acid peptide which has regulatory functions in metabolism and glucose homeostasis. It acts on muscle cells and fat tissue by stimulating the uptake of glucose and by slowing gastric emptying through signaling in the Central Nervous System (4). Concerning its synthesis, IAPP is expressed and processed concomitantly with insulin in pancreatic β -cells. The initial and immature form of IAPP (preproIAPP, ppIAPP) is comprised of a sequence of 89 amino acid residues with a signal peptide. The signal peptide of ppIAPP is removed throughout its transfer to the endoplasmic reticulum (ER), originating a proIAPP (pIAPP) molecule that matures in the late Golgi complex into IAPP through the cleavage of two flanking peptides by protein convertase (PC)1/3, PC2 and carboxypeptidase E. Amidation of the C-terminal end and the formation of a disulfide bridge also occur, contributing to the yield of an active IAPP hormone (5). Mature IAPP is then stored in tight ratios with insulin in secretory granules, being released upon glucose stimulation (6,7). Yet, when there is a high demand for insulin, β -cells are required to perform with high turnover and may lose the capacity to properly process all the insulin and IAPP. Consequently, immature IAPP forms arise in the islets of individuals with diabetes, which are seen as even more amyloidogenic than its mature form (8). In human IAPP transgenic mice, immunoelectron microscopy revealed the presence of fibrillar aggregates immunoreactive for pIAPP-specific sera in the secretory granules of β -cells (8). In addition, amyloid composed of proIAPP was observed in cells lacking both PCs. Such evidence was not documented in cell models carrying functional PC2 and PC1/3 where efficient processing occurred (9). Corroborating the relevance of aberrant processing

Introdução

As doenças de dobramento incorreto de proteínas abrangem um grupo heterogêneo de patologias nas quais um péptido amiloidogénico adquire uma estrutura tridimensional alternativa, oligomeriza e se acumula nos tecidos onde ocorre o dano específico da doença. Esse processo pode ocorrer sistemicamente ou no local da produção da proteína, como é o caso da diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (1). A deposição descontrolada do Polipéptido Amilóide dos Ilhéus (IAPP) é uma característica histopatológica da DM2, estando presente em quase 90% dos indivíduos após a sua morte (2) e em 50% dos insulinomas (3). O IAPP, ou amilina, é uma hormona de 37 aminoácidos que atua na regulação do metabolismo e na homeostasia da glucose. Atua nas células do músculo e no tecido adiposo estimulando a captação de glucose e retardando o esvaziamento gástrico através da sinalização no Sistema Nervoso Central (4). Relativamente à sua síntese, o IAPP é expresso e processado concomitantemente com a insulina nas células β pancreáticas. A forma inicial e imatura do IAPP (preproIAPP, ppIAPP) compreende uma sequência de 89 resíduos de aminoácidos com um péptido sinal. Ao longo do seu transporte para o retículo endoplasmático (RE), o péptido sinal é clivado, originando uma molécula de proIAPP (pIAPP) que é processada no complexo de Golgi tardio através da clivagem das regiões flanqueadoras pelas proteína convertases (PC) 1/3, PC 2 e carboxipeptidase E. Nesta etapa, ocorre também a amidação da extremidade C-terminal e a formação de uma ponte de dissulfeto, o que contribui para a produção de uma hormona de IAPP madura e ativa (5). O IAPP maduro é então armazenado juntamente com a insulina nos grânulos secretórios, sendo libertado após a estimulação da glucose (6,7). No entanto, quando existe uma alta demanda por insulina, as células β são obrigadas a funcionar com alta rotatividade e podem perder a capacidade de processar adequadamente toda a insulina e o IAPP. Consequentemente, formas de IAPP imaturas altamente amiloidogénicas surgem nas ilhas pancreáticas de indivíduos com diabetes (8). Experiências de microscopia imunoeletrónica, em ratinhos transgênicos para IAPP humano, revelaram a presença de agregados fibrilares imunorreativos a soros de pIAPP nos grânulos secretores das células β (8). Além disso, em células onde ambas as PCs não se encontram presentes, observou-se deposição de agregados de proIAPP. Tal evidência não foi documentada em modelos celulares contendo a PC2 e a PC1/3 completamente funcionais (9). Corroborando a relevância do processamento aberrante na acumulação de intermediários de IAPP imaturos e no progresso da

in the accumulation of immature IAPP intermediates and disease progress, the ratio of serum pIAPP/IAPP levels was found to be altered in individuals with T2D displaying impaired glucose regulation (10). Accumulation of IAPP intermediate species favors to the formation of oligomers that can act as trigger agents for β -cell depletion (4). These IAPP oligomers are thought to be involved in multiple toxic mechanisms. They have been described to disrupt cellular membrane dynamics (11-12), inhibit cell proliferation, impair autophagy (13), dysregulate calcium homeostasis (14) and induce overproduction of reactive oxygen species (4,15-16). Augmented concentrations of pIAPP in the ER have been reported to activate the unfolded protein response (UPR) and other ER stress pathways which, if not checked, can culminate in cell apoptosis (17-18). Despite that, the role of these incompletely processed forms within the plethora of cytotoxic effects attributed to IAPP is not yet fully understood.

Recently, we described a *Saccharomyces cerevisiae* model expressing differently processed forms of IAPP fused to Green Fluorescent Protein (GFP) (19). These models recapitulated the major molecular pathways related to IAPP aggregation, thus representing an unprecedented tool to study the molecular mechanisms affected by IAPP proteotoxicity. The same study showed that ppIAPP-GFP is at least partially processed towards its mature form, which implies the action of a protein convertase equivalent to PC1/3 and PC2 in β -cells. In that view, Kexin 2 (Kex2), appears as the most probable candidate to perform such processing. Kex2 has been described as a prohormone-processing protease that catalyzes the cleavage of peptides both in Lys-Arg and Arg-Arg motifs, in a Ca^{2+} -dependent manner (20). Selectively located to the late compartment of the Golgi complex in yeast, it contains a single transmembrane domain and a retention signal on C-terminal cytosolic tail sequence. Consistent with this compartmentalization, Kex2 has emerged as a protease that acts on a strict spectrum of target proteins in the late compartments of secretory pathway (e.g. precursors of prohormones, neuropeptides and integral membrane proteins) (21). Further supporting a possible role of Kex2 in IAPP processing, this convertase was shown to cleave the insulin precursor protein in the late secretory pathway of yeast (22). This is particularly interesting when considering that IAPP and insulin are co-processed by the same protein convertases in pancreatic β -cells (23).

doença, níveis alterados de pIAPP/IAPP no soro foram detetados em indivíduos com diabetes do tipo 2 e com um quadro de resposta deficiente ao estímulo de glucose (10). A acumulação de espécies intermediárias de IAPP favorece a formação de oligómeros que podem atuar como agentes desencadeadores da depleção das células β (4). Acredita-se que estes oligómeros de IAPP estejam envolvidos em vários mecanismos tóxicos, nomeadamente na disrupção estrutural da membrana celular (11-12), inibição da proliferação celular, desregulação da homeostasia do cálcio (14) e produção de espécies reativas de oxigénio (4,15-16). Foi relatado que concentrações aumentadas de pIAPP no RE ativam a *unfolded protein response* (UPR) e outras vias de stress do RE que, se não forem devidamente controladas, podem culminar na apoptose das células (17-18). Apesar destas evidências, o envolvimento destas formas não processadas nos efeitos citotóxicos atribuídos ao IAPP ainda não é totalmente compreendido.

Recentemente, descrevemos um modelo de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de expressar diferentes formas processadas de IAPP, fundidas à Proteína Verde Fluorescente (GFP) (19). Estes modelos recapitularam as principais vias moleculares relacionadas à agregação do IAPP, representando uma ferramenta robusta para estudar os mecanismos moleculares afetados pela toxicidade deste péptido amiloidogénico. O mesmo estudo mostrou que o preproIAPP-GFP é parcialmente processado até adquirir a sua forma madura, o que implica a ação de uma proteína convertase equivalente à PC 1/3 e PC2 nas células β . Neste sentido, a Kexina 2 (Kex2) aparece como a candidata mais provável para realizar tal processamento. A Kex2 foi descrita como sendo uma protease envolvida no processamento de pro-hormonas, que catalisa a clivagem de péptidos nos motivos Lys-Arg e Arg-Arg, num processo dependente de Ca^{2+} (20). Seletivamente localizada no compartimento tardio do complexo de Golgi, em levedura, a Kex2 contém um único domínio transmembranar e um sinal de retenção na sequência da sua cauda citosólica C-terminal. De acordo com esta compartimentalização, a Kex2 tem sido descrita como uma protease que atua num espectro estrito de proteínas alvo nos compartimentos tardios da via secretória (por exemplo, precursores de pro-hormonas, neuropéptidos e proteínas integrais de membrana) (21). Apoiando um possível papel da Kex2 no processamento do IAPP, esta convertase demonstrou ser capaz de clivar a proteína precursora da insulina na via secretória tardia (22). Tal dado é particularmente interessante uma vez que o IAPP e a insulina são coprocessados pelas mesmas proteínas convertases nas células β pancreáticas (23).

Although some proteins have been predicted as potential targets of Kex2, the number of substrates for which there is experimental evidence of cleavage by Kex2 remains scarce (24). In the scope of IAPP processing events, the substrate specificity of *Saccharomyces cerevisiae* Kex2 protease has great importance. Kex2 is considered the prototype for the family of eukaryotic subtilisin-like serine proprotein convertases that comprises the human PC1/3, PC2 and furin (25). Specifically, in regard to IAPP, no direct correlations between Kex2 activity and the processing of such amyloidogenic peptide have been reported to date. To fill this gap of knowledge, we used genetically modified *S. cerevisiae* models expressing different forms of human IAPP to investigate the possible involvement of Kex2 on IAPP enzymatic processing. By sharing conserved cellular and molecular mechanisms with human cells, yeast represents a versatile and powerful experimental model to study fundamental biological processes involved in human diseases (26). Thus, the use of yeast models to dissect Kex2 proteolytic action on IAPP may represent an important tool to elucidate the mechanisms underlying aberrant IAPP processing and consequent accumulation of immature species observed in disease scenarios.

Materials and methods

Strains and plasmids

The strain BY4741 *MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0* and the isogenic *kex2* mutant strain (EUROSCARF) were used. Both strains were transformed with different chimeric fusions of IAPP linked to GFP. Yeast transformation protocols were performed following the lithium acetate standard technique (27). The constructs used are indicated in Table 1.

Yeast growth conditions

Cells were maintained in synthetic dropout (SD)-glucose medium. Prior to experiments, an inoculum was made in SD-raffinose medium at 30°C for 24 h and under agitation. Cell cultures were diluted in new medium and incubated as indicated above until reaching an optical density of 0.5 ± 0.05 at 600 nm (OD_{600}). Measurements were acquired using a Biotek

Embora algumas proteínas tenham sido já descritas como potenciais alvos da Kex2, o número de substratos para os quais existe prova experimental de clivagem por parte desta protease permanece escasso (24). No que diz respeito ao processamento do IAPP, a especificidade do substrato da Kex2 é de extrema importância. A Kex2 de *Saccharomyces cerevisiae* é o protótipo da família das PCs eucarióticas encontradas em humanos, e que abrange a PC1/3, PC2 e a furina (25). Especificamente, no que diz respeito ao IAPP, nenhuma correlação direta entre a atividade da Kex2 e o processamento deste péptido amiloidogénico foi relatada até o momento. Para preencher esta lacuna de conhecimento, usámos modelos geneticamente modificados de *S. cerevisiae* capazes de expressar diferentes formas de IAPP humano a fim de investigar o possível envolvimento da Kex2 no processamento enzimático do IAPP. Partilhando mecanismos celulares e moleculares altamente conservados com as células humanas, a levedura representa um modelo experimental versátil para estudar os processos biológicos envolvidos em doenças humanas (26). Desta forma, o estudo da ação proteolítica da Kex2 no IAPP, em modelos de levedura, poderá representar uma ferramenta importante para elucidar os mecanismos subjacentes ao processamento aberrante do IAPP e consequente acumulação de espécies imaturas observada em cenários de doença.

Materiais e métodos

Estirpes de levedura e plasmídeos

A estirpe BY4741 *MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0* e a estirpe mutante isogénica *kex2* (EUROSCARF) foram usadas neste estudo. Ambas as estirpes foram transformadas com diferentes fusões quiméricas de IAPP ligadas a GFP. Os procedimentos de transformação das leveduras foram realizados conforme indicado no método de acetato de lítio (27). Os plasmídeos usados encontram-se listados na Tabela 1.

Condições de crescimento das culturas de levedura

As células foram mantidas em meio sintético com glucose. Antes de cada experiência, foi preparado um inóculo em meio sintético com rafinose a 30 °C, durante 24 h sob agitação orbital. As culturas de células foram diluídas em meio fresco e incubadas tal como acima indicado, até atingir uma densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) de 0.5 ± 0.05 . As leituras foram adquiridas usando o espectrofotómetro de microplacas Biotek

Table 1 - Plasmids used in this study.

Tabela 1 - Plasmídeos usados neste estudo.

Plasmid / Plasmídeo	Description / Descrição	Reference / Referência
p426*	<i>GAL1_{promoter}</i> , 2 μ , URA	ATCC 87341 ^{TM**}
p426-ppIAPP_GFP	<i>GAL1_{promoter}</i> , ppIAPP_GFP, 2 μ , URA	Raimundo et al, 2020
p426-pIAPP_GFP	<i>GAL1_{promoter}</i> , pIAPP_GFP, 2 μ , URA	Raimundo et al, 2020
p426-matIAPP_GFP	<i>GAL1_{promoter}</i> , matIAPP_GFP, 2 μ , URA	Raimundo et al, 2020

*Empty plasmid used as control / Plasmídeo vazio usado como controle

**American Type Culture Collection

Power Wave XS plate spectrophotometer (Winooski, VT, USA). Constructs expression was modulated by incubating the cells in SD medium with glucose (repression) or galactose (induction). Detailed protocols were previously described by our research group (19).

Flow cytometry

Cultures were diluted in SD-galactose to OD₆₀₀ 0.1 \pm 0.01 and maintained for 12 h at 30°C under orbital shaking. Flow cytometry was carried out using propidium iodide (PI) as previously described (19).

Protein extraction and Immunoblotting

Cultures were diluted in SD-galactose medium to OD₆₀₀ 0.1 \pm 0.01 and maintained at 30°C for 12 h under orbital shaking. Protein extraction and immunoblotting were performed as previously described (19) using the antibodies indicated in [Supplementary Table S1](#).

Growth Assays

For growth assays, yeast cells were diluted in SD-glucose or SD-galactose medium to OD₆₀₀ 0.05 \pm 0.005 and maintained at 30°C with agitation during 24 h. Yeast growth was checked hourly by reading OD₆₀₀ using a Biotek Power Wave XS Microplate Spectrophotometer.

Confocal microscopy

Cell cultures were diluted to OD₆₀₀ 0.1 \pm 0.01 in SD-galactose medium and incubated at 30°C for 12 h under orbital shaking. The culture was centrifuged at 3000 g for 3 min and resuspended in PBS. Slides were prepared using a mixture of 4 μ l of low melting point agarose and 4 μ l of cell suspension. GFP signal was monitored using a Carl Zeiss LSM 710 (Jena, Germany) for confocal microscopy or Leica Z2

Power Wave XS (Winooski, VT, EUA). A expressão do IAPP foi modulada através da incubação das células em meio sintético com glucose (repressão) ou com galactose (indução). O protocolo detalhado foi anteriormente descrito pelo nosso grupo (19).

Citometria de fluxo

As culturas celulares foram diluídas para uma OD₆₀₀ igual a 0,1 \pm 0,01 em meio sintético com galactose e incubadas a 30°C por 12 h sob agitação orbital. A citometria de fluxo foi realizada usando iodeto de propídio (PI) tal como descrito anteriormente (19).

Extração de Proteínas e Imunotransferência

As culturas celulares foram diluídas para uma OD₆₀₀ igual a 0,1 \pm 0,01 em meio sintético com galactose e incubadas a 30°C por 12 h sob agitação orbital. A extração de proteínas e a imunotransferência foram realizadas tal com anteriormente descrito (19) e usando os anticorpos indicados na [Tabela Suplementar S1](#).

Curvas de crescimento

Para as curvas de crescimento, as culturas foram diluídas para uma OD₆₀₀ igual 0,05 \pm 0,005 em meio sintético com glucose ou galactose, e foram incubadas a 30°C com agitação por 24 h. O crescimento foi monitorizado de hora a hora medindo a OD₆₀₀ com um espectrofotômetro de microplacas Biotek Power Wave XS.

Microscopia de fluorescência e confocal

As culturas celulares foram diluídas para uma OD₆₀₀ igual a 0,1 \pm 0,01 em meio sintético com galactose e incubadas a 30°C por 12 h sob agitação orbital. As células foram recolhidas por centrifugação a 3000 g por 3 min e ressuspendidas em PBS. As lâminas foram preparadas com 4 μ l de suspensão de células e misturadas com 4 μ l de agarose de baixo ponto de fusão. A fluorescência do

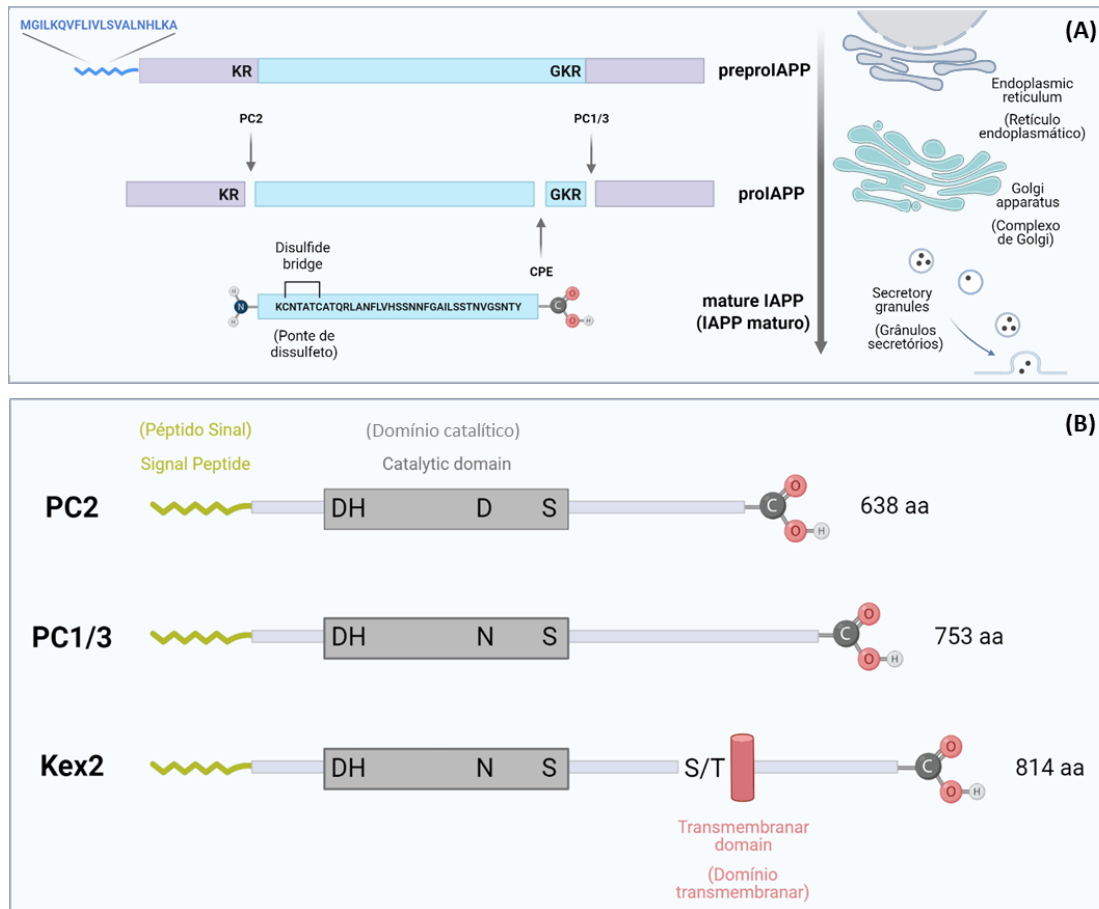


Figure 1 - Schematic representation of IAPP processing (A) and comparison of yeast and human prohormone convertases structural domains (B).

IAPP is synthesized as an 89-residue preprohormone that contains an endoplasmic reticulum signal peptide. In this organelle, this signal is cleaved originating a prohormone molecule. Once in late Golgi complex, N- and C-terminal flanking regions of proIAPP are excised by prohormone convertases (PC2 and PC1/3) and carboxypeptidase E. Amidation of the C-terminus and the formation of a disulfide bridge occur in a multistep process, leading to the formation of a mature IAPP molecule that is packaged and released in secretory granules. The processing enzymes of secretory pathway are related to subtilisin and to the yeast processing protease Kex2, and are known as subtilisin-like proprotein convertases (PCs). In mammals, few members of this family have been identified and characterized, as is the case of PC1/3 and PC2. Like subtilisin and kexin, the activation of these proteases occurs by autocatalytic cleavage of a N-terminal propeptide located between the signal peptide and the catalytic domain. The presence of a signal peptide, a prosegment, and a catalytic domain is shared by all convertases that display the characteristic catalytic triad residues Asp, His and Ser. In Kex2, the existence of a transmembrane domain is responsible for the retention of this protease in the late Golgi complex. The variable C-terminal regions of the PCs are less conserved and play a role in their subcellular routing. Schematic representation based on published data.

Figura 1 – Representação esquemática do processamento do IAPP (A) e comparação dos domínios estruturais das pro-hormona convertases humanas e de levedura (B).

O IAPP é sintetizado como uma preprohormona de 89 resíduos de aminoácidos contendo um péptido sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático. Neste organelo, o péptido sinal é clivado originando uma prohormona. Uma vez presente no complexo de Golgi, as regiões flaqueantes N- e C-terminal do proIAPP são excisadas pelas pro-hormona convertases (PC2 e PC1/3) e pela carboxipeptidase E. A amidação da região C-terminal e a formação da ponte de dissulfeto ocorrem posteriormente, levando à formação de uma molécula de IAPP madura que é empacotada nos grânulos secretórios. As enzimas de processamento da via secretória fazem parte de uma família de pro-proteínas convertases associadas à subtilisina. Alguns membros desta família foram identificados e caracterizados em mamíferos, como é o caso da PC1/3 e da PC2. À semelhança da subtilisina e da kexina, a ativação da PC1/3 e PC2 ocorre pela clivagem autocatalítica de um pro-péptido N-terminal localizado entre o péptido sinal e o domínio catalítico. A presença de um péptido sinal, de um pro-segmento e de um domínio catalítico é uma característica partilhada por todas as convertases que exibem os resíduos típicos da tríade catalítica Asp, His e Ser. Na Kex2, a existência de um domínio transmembranar é responsável pela retenção desta protease no complexo de Golgi. A região variável do C-terminal das PCs é menos conservada e desempenha um papel na sua localização subcelular. Representação esquemática baseada em dados publicados na literatura.

(Wetzlar, Germany) for fluorescence microscopy. The number of aggregates-containing cells was counted by visualizing at least 800 cells for each condition. Photos were counted using Fiji-ImageJ1.51j8 software (USA).

Statistical Analysis

GraphPad Prism 6 software was used to carry out the statistical analysis. Two-way ANOVA with the Tukey's multiple comparison test was used to access differences between conditions in the viability test. Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison analysis was applied to test for differences between conditions in immunoblotting and microscopy analysis.

Results And Discussion

Kex2 as a possible prohormone convertase involved in ppIAPP processing

IAPP is the main element of amyloid inclusions in pancreatic islets of diabetic patients. Like insulin, IAPP is produced as a prepropeptide in the ER and processed to the mature and active form in secretory granules before its extracellular release. IAPP is formed by exclusion of both C- and N-terminal flanking peptides at basic amino acids pairs, through the action of prohormone convertases (PC2 and PC1/3) that recognize specific and highly conserved sites of cleavage in the peptide sequence (5) (Figure 1A). In *S. cerevisiae*, Kex2 (or Kexin) appears as the yeast homolog of such processing enzymes. Kex2 cleaves target peptides at paired dibasic sites, being essential to generate the final and active forms of excreted proteins such as killer toxin, α -factor, insulin and, eventually, IAPP (28). Kex2 is a membrane-attached protein that is originally targeted to the ER. Ultimately, it acts at the trans-Golgi network (TGN), circulating between trans-Golgi vesicles and the late endosomal compartments (29,30). Structurally, it contains an ER signal peptide in the N-terminus, followed by a catalytic domain that bears most of the similarities between PC2, PC3 and Kex2 residue sequences. Within the first 600 amino acids, 34-45% of the residues are identical between any pair of these proteins. Beyond the first 600 residues, near the end of PC2, Kex2 contains a hyperglycosylated

GFP foi visualizada usando um microscópio Carl Zeiss LSM 710 (Jena, Alemanha) para microscopia confocal ou Leica Z2 (Wetzlar, Alemanha) para microscopia de fluorescência. O número de células com agregados foi avaliado através da monitorização de pelo menos 800 células para cada condição. As imagens foram analisadas usando o software Fiji-ImageJ1.51j8 (EUA).

Análise Estatística

O software *Graphpad Prism 6* foi usado para fazer a análise estatística dos resultados. A análise ANOVA bilateral com o teste de comparação múltipla de Tukey foi realizada para avaliar as diferenças entre as condições no ensaio de viabilidade celular. A análise ANOVA bilateral com o teste de comparação múltipla de Sidak foi realizada para avaliar as diferenças entre as condições nos ensaios de imunotransferência e microscopia.

Resultados e Discussão

Kex2 como potencial pro-hormona convertase envolvida no processamento do ppIAPP

O IAPP é o principal elemento dos depósitos amilóides encontrados nas ilhas pancreáticas de doentes diabéticos. Tal como a insulina, o IAPP é produzido no RE na forma de uma preprohormona, sendo depois convertido à forma madura nos grânulos de secreção antes da sua libertação extracelular. O IAPP é formado pela remoção das regiões flanqueadoras C- e N-terminais através da ação das prohormona convertases PC2 e PC1/3 que reconhecem sítios de clivagem específicos e altamente conservados na sequência peptídica (5) (Figura 1A). Na *S. cerevisiae*, a Kex2 (ou kexina) aparece como sendo o homólogo destas enzimas de processamento. A Kex2 cliva os péptidos alvo em sítios dibásicos, sendo a sua ação necessária para produzir as formas finais e ativas das proteínas secretadas, como o caso da toxina *killer*, o fator alfa, a insulina e, eventualmente, o IAPP (28). A Kex2 é uma proteína membranar que é inicialmente direcionada para o RE e que depois, funciona na rede trans-Golgi (TGN), circulando entre as vesículas trans-Golgi e os compartimentos endossomais tardios (29-30). Estruturalmente, a Kex2 contém um péptido sinal de endereçamento para o RE na extremidade N-terminal, seguido por um domínio catalítico que possui a maioria das semelhanças entre as sequências de aminoácidos da PC2, PC3 e Kex2. Dentro dos primeiros 600 aminoácidos, 34-45% dos resíduos são idênticos entre qualquer par dessas proteínas. Além dos primeiros 600 resíduos, a Kex2 contém ainda

serine/threonine rich region and a single transmembrane domain that is important for its function and localization as an integral membrane protein (Figure 1B) (30,31).

Absence of Kex2 protease increases cytotoxicity of proIAPP-GFP in yeast

In diabetes, the increased need for insulin production caused by increased blood glucose levels is accompanied by an overproduction of IAPP which completely overloads and impairs the β -cell processing machinery. Abnormal post-translational processing of IAPP precursor peptide has been associated to the buildup of intermediate immature forms of IAPP and consequent deposition of cytotoxic intracellular oligomers (1,4,5).

To address the impact of Kex2 lack on IAPP processing, we generated genetically modified yeast models that do not harbor the *KEX2* gene (*kex2* strain) and simultaneously express different chimeric constructs of human IAPP (p426-ppIAPP-GFP (ppIAPP-GFP), p426-pIAPP-GFP (pIAPP-GFP) and p426-matIAPP-GFP (matIAPP-GFP)) (19). In these constructs, each cDNA was cloned in fusion with GFP and under the regulation of a promoter inducible by galactose (*GALI*). For comparison, the isogenic strain BY4741 was used as a control encoding a functional processing machinery. These models were previously described and characterized, showing that expression and aggregation of immature ppIAPP species causes a marked cellular toxicity (19). The expression of IAPP constructs in the null-mutant strain was confirmed by the presence of GFP positive cells as checked by flow cytometry analysis ([Supplementary Figure S1](#)). Cell viability was next evaluated upon 12 h galactose induction of IAPP expression, through PI staining by flow cytometry. PI is membrane-impermeant and excluded from viable cells. It can only cross compromised cellular membranes, being therefore considered an indicator of membrane integrity (33). According to our previous data, at this timepoint only ppIAPP-GFP expression significantly reduced the cell viability in BY4741 cells, with other constructs showing lower levels of toxicity (19). Interestingly, genetic ablation of *KEX2* gene significantly increased pIAPP-GFP cytotoxicity, while no effects were observed in strains expressing the

uma região rica em serina/treonina hiperglicosilada e um único domínio transmembranar que é importante para a sua função e localização enquanto proteína de membrana integral (Figura 1B) (30-31).

A ausência da protease Kex2 aumenta a citotoxicidade do proIAPP-GFP em levedura

Na diabetes, a necessidade aumentada para a produção de insulina induzida por uma condição de hiperglicemia é acompanhada por uma produção exacerbada de IAPP que sobrecarrega a maquinaria de processamento das células β pancreáticas. Anomalias ao nível do processamento pós-traducional do péptido precursor do IAPP tem sido associado à acumulação de formas imaturas intermediárias de IAPP e consequente formação de oligómeros intracelulares tóxicos (1,4,5).

Para estudar o impacto da ausência da Kex2 no processamento do IAPP, desenvolvemos modelos de levedura geneticamente modificados que não possuem o gene *KEX2* (estirpe mutante *kex2*) e que expressam simultaneamente diferentes construções quiméricas de IAPP humano (p426-ppIAPP-GFP (ppIAPP-GFP), p426-pIAPP-GFP (pIAPP-GFP) e p426-matIAPP-GFP (matIAPP-GFP)) (19). Nestas construções, os respetivos cDNAs foram clonados em fusão com o GFP e sob a regulação do promotor induzido pela galactose (*GALI*). Para comparação, a estirpe isogénica BY4741 foi usada como controlo, uma vez que possui uma maquinaria de processamento totalmente funcional. Estes modelos foram previamente descritos e caracterizados, tendo mostrado que a expressão e agregação de espécies imaturas de ppIAPP causam uma marcada toxicidade celular (19). A expressão de fusões quiméricas de IAPP no mutante nulo foi confirmada pela presença de células que expressam GFP conforme verificado por citometria de fluxo ([Figura Suplementar S1](#)). Posteriormente, a viabilidade celular foi avaliada após 12 h de indução da expressão de IAPP com galactose, através de marcação com iodeto de propídio (PI) seguida de citometria de fluxo. Em condições normais, o PI não tem capacidade de penetrar a membrana celular, sendo excluído das células viáveis. Este composto apenas consegue atravessar membranas celulares comprometidas, sendo, portanto, considerado um indicador da integridade membranar (33). De modo consistente com dados anteriormente obtidos pelo nosso grupo, às 12 h de indução, apenas a expressão do ppIAPP-GFP reduziu significativamente a viabilidade celular em células BY4741, com as outras construções mostrando níveis de toxicidade mais baixos (19). Curiosamente, a ablação genética do gene *KEX2* aumentou significativamente a citotoxicidade do

other constructs. In mutant ppIAPP-expressing cells, PI levels remained unchanged suggesting that the absence of Kex2 protease *per se* is not sufficient to further exacerbate the toxicity of the most immature IAPP form (Figure 2). A plausible explanation is that signal peptide-mediated ppIAPP-GFP addressing to ER may exacerbate accumulation of immature forms and clog the secretory pathway creating a problem upstream to the cleavage by protein convertases.

The cellular membrane of yeast is known to be involved in major biological processes, serving as a barrier to solute(s) diffusion, stores energy as transmembrane ions and solute gradients, offers sites of enzyme pathways engaged in the synthesis of cell components, among others. These functions are crucial to maintain the intracellular homeostasis and gather the elements required for cell growth and division (34). Since PI analysis showed alterations in membrane integrity in certain conditions (Figure 2), we decided to address how the expression of different IAPP constructs impacts the growth of Kex2-lacking yeast. Growth curve analyses were performed for wild type and mutant strains (Figure 3A). Cultures of BY4741 expressing the differently processed IAPP species showed an initial lag phase that is well-matched with the change in the carbon source from raffinose to galactose. Subsequently, these strains resumed growth and behave similarly, with ppIAPP-GFP-expressing cells growing slower than the control cells after 12 h of galactose induction. Regarding the comparison

ppIAPP-GFP, enquanto nenhum efeito foi observado nas estirpes que expressam as restantes fusões. Em células mutantes que expressam o ppIAPP, os níveis de PI permaneceram inalterados, sugerindo que a ausência da protease Kex2, por si só, não é suficiente para exacerbar ainda mais a toxicidade da forma imatura do IAPP (Figura 2). Uma explicação plausível para este resultado relaciona-se com o facto do endereçamento do ppIAPP-GFP para o RE (mediado pelo péptido sinal) poder exacerbar a acumulação das formas imaturas de IAPP e, assim, obstruir a via secretória, criando um problema a montante da clivagem por ação das convertases.

A membrana celular da levedura é conhecida por estar envolvida nos principais processos biológicos, nomeadamente, serve como uma barreira para a difusão de solutos, armazena energia na forma de iões transmembranares e gradientes de soluto, fornece locais de vias enzimáticas envolvidas na síntese de componentes celulares, entre outros. Essas funções são cruciais para manter a homeostasia intracelular e reunir os elementos necessários para o crescimento e divisão celular (34). Uma vez que, em certas condições, a análise do PI mostrou alterações na integridade da membrana (Figura 2), decidimos avaliar de que forma a expressão de diferentes construções de IAPP poderia interferir no crescimento do mutante nulo. Para isso, foram analisadas as curvas de crescimento das estirpes *wild type* e mutante (Figura 3A). As culturas de BY4741 que expressam as três formas de IAPP exibiram um período de latência inicial compatível com a mudança da fonte de carbono de rafinose para galactose. Posteriormente, essas estirpes retomaram o seu crescimento e comportaram-se de maneira semelhante, à exceção das células que expressam o ppIAPP-GFP que cresceram mais lentamente do que as células controlo após 12 h de indução com galactose.

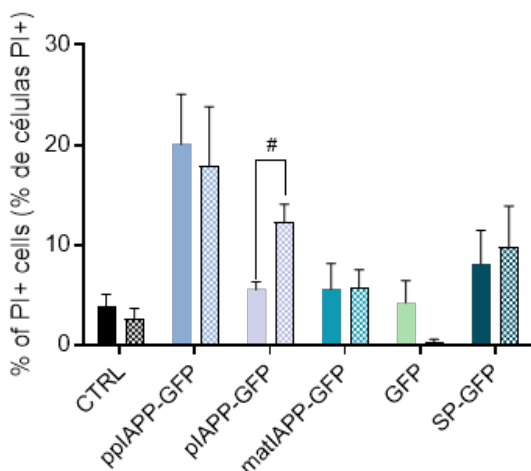


Figure 2 - The frequency of cells positive for propidium iodide (PI) staining of BY4741 and *kex2* cells expressing IAPP-GFP fusions (and the respective control) following 12 h incubation with galactose, as evaluated by flow cytometry. Absence of Kex2 enhances pIAPP-GFP cytotoxicity in this yeast model. # indicates $p < 0.05$ vs respective pIAPP-GFP.

Figura 2 - A frequência de células positivas para a coloração de iodeto de propídio (PI) de células BY4741 e *kex2* expressando fusões IAPP-GFP (e o respectivo controlo) após incubação com galactose durante 12 h, conforme analisada por citometria de fluxo. A ausência de Kex2 aumenta a citotoxicidade induzida pelo pIAPP-GFP neste modelo de levedura. # indica $p < 0.05$ vs respectivo pIAPP-GFP.

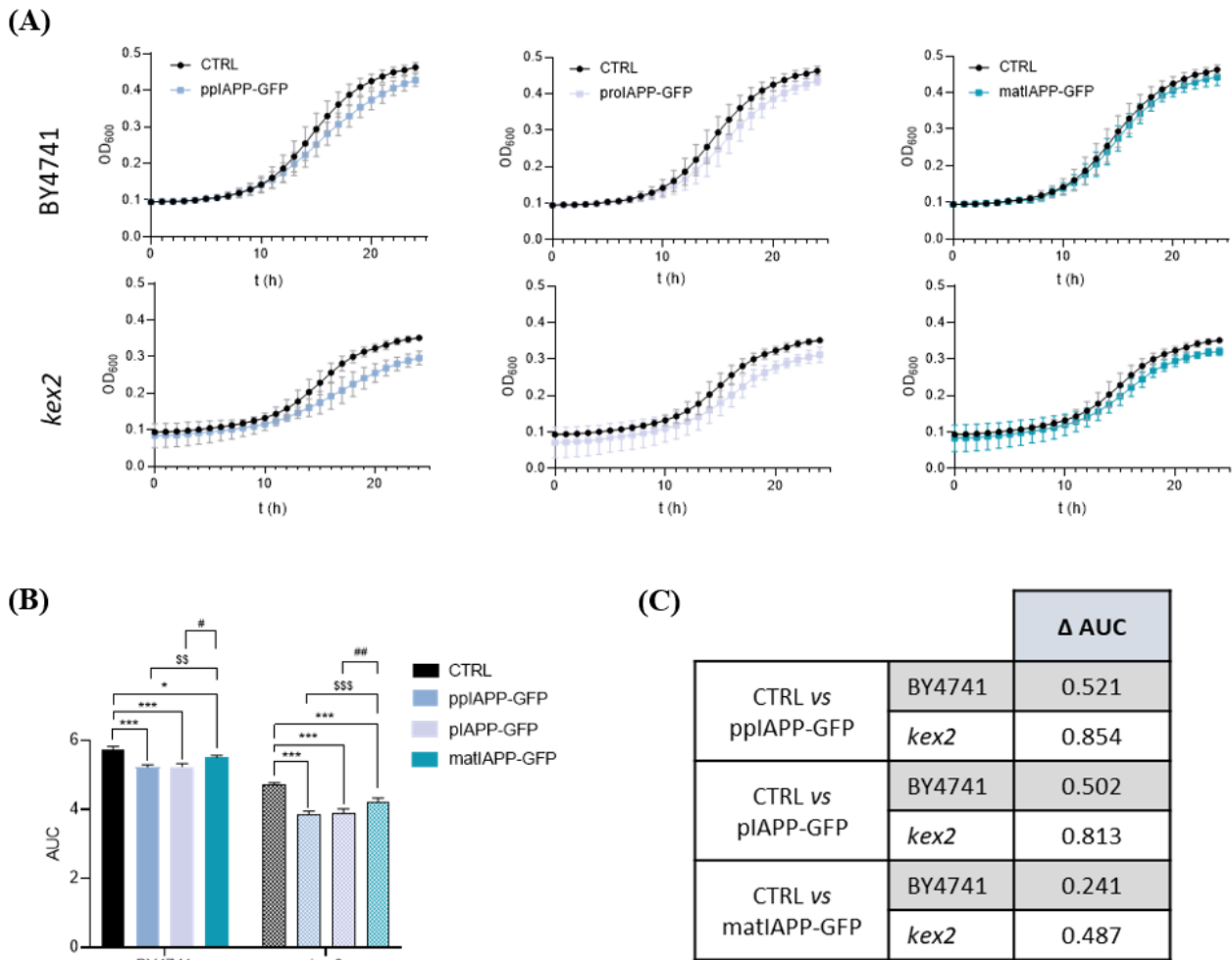


Figure 3 - Growth curve analysis established on culture optical density at 600 nm (OD_{600}) of wild type and *kex2* mutant strains expressing immature and mature IAPP forms. *kex2* mutant strain is represented by bars with patterns. AUC – Area Under the Curve. Values represent \pm SD from at least three independent experiments. Statistical differences are indicated as * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs respective control; $^{SS}p < 0.01$ and $^{SSS}p < 0.001$ vs respective pplAPP-GFP; $^{\#}p < 0.05$ and $^{\#\#}p < 0.01$ vs respective pIAPP-GFP.

Figura 3 - Análise da curva de crescimento com base na densidade ótica da cultura a 600 nm (OD_{600}) de estirpes *wild type* e mutantes *kex2* que expressam formas de IAPP imaturas e maduras. A estirpe mutante *kex2* encontra-se representada por barras preenchidas com padrão. AUC – Área Sob a Curva. Valores representam \pm SD de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatísticas estão indicadas por $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ vs respetivo controlo; $^{SS}p < 0.01$ e $^{SSS}p < 0.001$ vs respetivo pplAPP-GFP; $^{\#}p < 0.05$ e $^{\#\#}p < 0.01$ vs respetivo pIAPP-GFP.

between the growth curves of wild type and mutant strains, a marked difference was observed, with *kex2* cultures showing lower levels of final biomass. Under equal conditions, control BY4741 cultures reached an optical density of 0.43 ± 0.013 after 24 h induction with galactose, whereas control *kex2* culture attained values of 0.35 ± 0.008 at the same time point (Figure 3A). Monitoring of *kex2* culture growth also showed a reduced Area Under the Curve (AUC), when compared to BY4741 cells, supporting the occurrence of growth defects in the mutant strain (Figure 3B). Such results are in accordance with systematic studies showing that *kex2* mutant grows at slower rates in comparison to the isogenic wild type strain (35). Analysis of the AUC also revealed that the absence of Kex2 potentiates growth impairment mediated by ppIAPP-GFP, pIAPP-GFP and matIAPP-GFP expression as concluded by the increase of Δ AUC calculated as the difference between the AUC of the control and the respective IAPP construct (Figure 3C). These results were corroborated by the spot assays showing that cytotoxicity in all strains was enhanced in the *kex2* mutant, in particular in the strains expressing ppIAPP-GFP and pIAPP-GFP (Figure 4).

No que respeita à comparação entre as curvas de crescimento das estirpes *wild type* e mutante, observou-se uma diferença acentuada, com as culturas de *kex2* a apresentar menores valores de biomassa final. Em condições semelhantes, a cultura controlo da BY4741 atingiu uma densidade ótica de $0,43 \pm 0,013$ após 24 h de indução com galactose, enquanto a cultura controlo da *kex2* atingiu valores de $0,35 \pm 0,008$ no mesmo tempo de incubação (Figura 3A). A monitorização do crescimento da cultura *kex2* também mostrou uma área sob a curva (AUC) reduzida, quando comparada às células BY4741, suportando a ocorrência de defeitos no crescimento na estirpe mutante (Figura 3B). Estes resultados vão ao encontro de estudos sistemáticos publicados que mostram que o mutante *kex2* cresce a taxas mais lentas em comparação com a estirpe *wild type* (35). A análise da AUC também revelou que a ausência da Kex2 potencia o comprometimento do crescimento mediado pela expressão do ppIAPP-GFP, pIAPP-GFP e matIAPP-GFP, conforme concluído pelo aumento de Δ AUC calculado como a diferença entre a AUC do controlo e a AUC do respetiva fusão de IAPP (Figura 3C). Estes resultados foram corroborados pelos ensaios fenotípicos que mostraram que a citotoxicidade em todas as estirpes, em particular as que expressam ppIAPP-GFP e pIAPP-GFP, foi aumentada no mutante *kex2* (Figura 4).

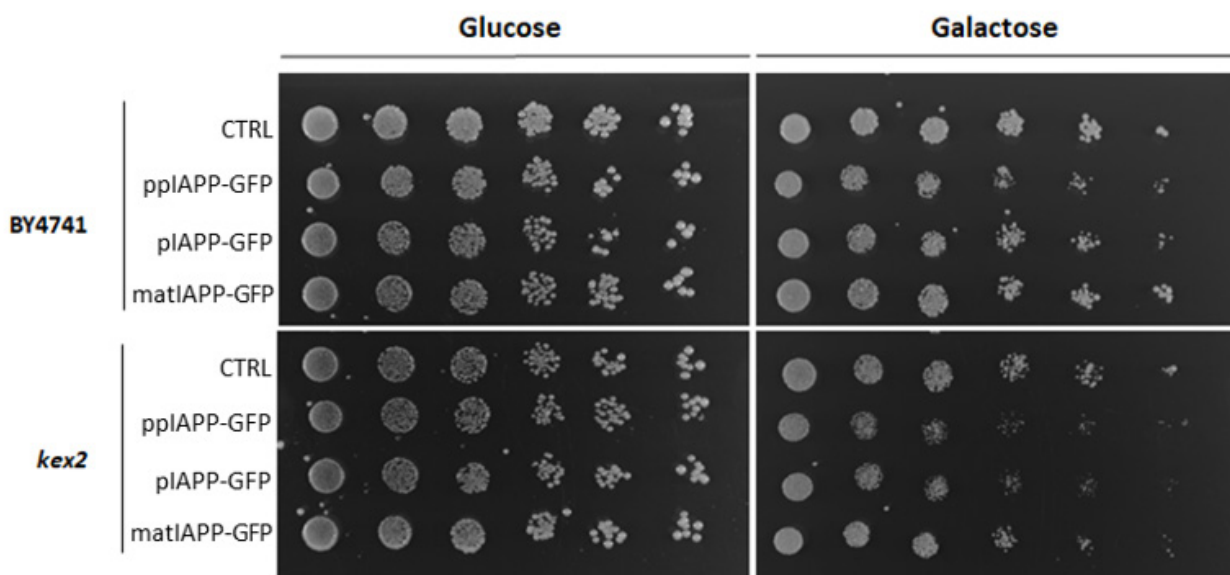


Figure 4 - Phenotypic assays of wild type and *kex2* mutant strains expressing immature and mature IAPP forms.
Figura 4 - Ensaio fenotípico das estirpes *wild type* e mutantes *kex2* que expressam formas de IAPP imaturas e maduras.

IAPP processing and intracellular distribution are not affected in kex2 mutants

Transmission electron microscopy studies of intracellular amyloid in human IAPP transgenic mice pancreas identified intragranular fibrils containing pIAPP molecules. Fibrils at this location were associated to prohormone processing impairment and consequent pIAPP accumulation (8). In β -cells containing functional processing machinery, expression of pIAPP did not lead to amyloid deposition. On the contrary, pIAPP expression in GHC4 cells lacking PC2 and PC1/3 resulted in amyloid composed of pIAPP

O processamento do IAPP e a sua distribuição intracelular não são afetados em mutantes kex2

Estudos de microscopia eletrônica de transmissão de depósitos amilóides no pâncreas de ratinhos transgênicos para IAPP humano identificaram a presença de fibrilas intragranulares contendo moléculas de pIAPP. As fibrilas presentes neste local foram associadas ao comprometimento do processamento de pro-hormonas e consequente acumulação de pIAPP (8). Em células β contendo uma maquinaria de processamento funcional, a expressão de pIAPP não resultou na formação de depósitos amilóides. Pelo contrário, a expressão de pIAPP em células GHC4 que não possuem as convertases PC2 e PC1/3 resultou na formação

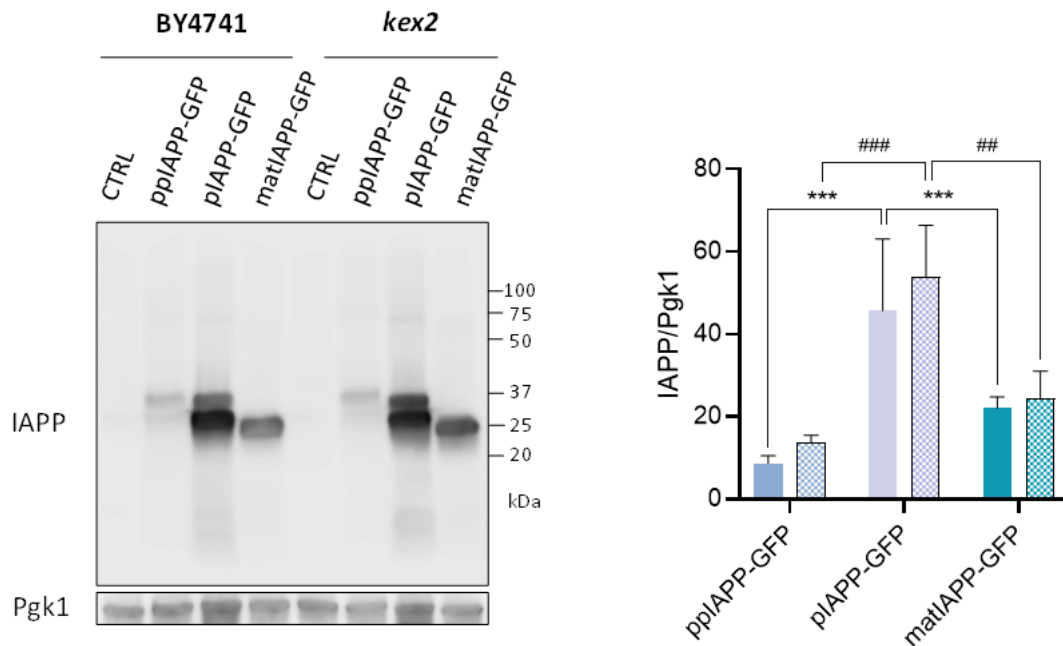


Figure 5 - Lack of Kex2 has no implications for intracellular IAPP processing. BY4741 and *kex2* cells expressing IAPP-GFP fusions and the control were induced for 12 h with galactose, and protein profile was evaluated by immunoblotting using an antibody against IAPP. Pgk1 was applied as loading control. *kex2* mutant strain is represented by bars with patterns. Representative images are displayed, and values represent \pm SD from at least three independent experiments. Statistical differences are indicated by $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ vs respective ppIAPP-GFP or pIAPP-GFP (BY4741); $##p < 0.01$ and $###p < 0.001$ vs respective ppIAPP-GFP or pIAPP-GFP (*kex2*).

Figura 5 - A ausência da proteína Kex2 não afeta o processamento do IAPP. Células BY4741 e *kex2* que expressam fusões de IAPP-GFP ou o vetor controle foram induzidas com galactose por 12 h. O perfil proteico foi avaliado por imunotransferência usando um anticorpo anti-IAPP. O Pgk1 foi usado como controle endógeno. A estirpe mutante *kex2* encontra-se representada por barras preenchidas com padrão. Imagens representativas são mostradas e os valores representam \pm SD de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatísticas são indicadas como $**p < 0.01$ e $***p < 0.001$ vs respectivo ppIAPP-GFP ou pIAPP-GFP (BY4741); $##p < 0.001$ e $###p < 0.001$ vs respectivo ppIAPP-GFP ou pIAPP-GFP (*kex2*).

(36), indicating that abnormal processing is a key factor for the accumulation of amyloidogenic pIAPP intermediates. To verify if increased pIAPP cytotoxicity in *kex2* mutants was linked to the accumulation of IAPP unprocessed forms, we performed immunoblotting assays. As shown in Figure 5, no visible differences were observed in IAPP profile between the two strains. In both cases, total protein samples from cells expressing the most immature form of IAPP showed the presence of a 38 kDa signal which is well-matched with the molecular weight of ppIAPP-GFP. An extra signal of ~32 kDa was also noticed in these samples (Figure 5). In a similar way, total protein samples from cells expressing pIAPP-GFP revealed the existence of a 36 kDa signal, corresponding to the molecular weight of the pIAPP-GFP. Two other signals of ~32 and ~70 kDa were also identified. In the light of these results, we hypothesize that such signals may be associated to the generation of processing intermediates (~32 kDa signals) and dimers (~70 kDa signal) of IAPP species. matIAPP-GFP total protein samples disclosed the existence of a 31 kDa-single signal that should match the polypeptide sequence of the mature construct. Comparable signals were detected in membranes probed with anti-GFP antibody ([Supplementary Figure S2](#)). Also, no significant differences were found in total levels of IAPP between wild type and mutant strains. In both strains, pIAPP-GFP-expressing cells showed higher levels of total IAPP (Figure 5), however with no significant effect on the number of GFP positive cells, as indicated by flow cytometry studies ([Supplementary Figure S1](#)). More robust techniques such as size exclusion chromatography should be useful to elucidate this question.

Confocal microscopy was then used to evaluate the impact of the absence of Kex2 on the subcellular distribution of chimeric proteins. At a first glance, it can be observed that *kex2* cells are larger than the wild type cells, a phenomenon previously reported in the literature. In addition to *S. cerevisiae*, a wide-ranging of phenotypes have been reported for *kex2* deletion mutants in other yeasts. The stated phenotypic descriptions of the respective mutants comprise morphological alterations that seems to be associated with the deficient activity of cell-wall modifying enzymes (24).

amilóide de pIAPP (36). Estes resultados apontaram o processamento anormal como um fator chave para a acumulação de intermediários amiloidogênicos de pIAPP. Para verificar se o aumento da citotoxicidade do pIAPP em mutantes *kex2* estava associado à acumulação de espécies de IAPP não processadas, realizamos ensaios de imunotransferência. Conforme ilustrado na Figura 5, não foram observadas diferenças visíveis no perfil de IAPP entre as duas estirpes. Em ambos os casos, os lisados de proteína total de células que expressam o ppIAPP-GFP revelaram a presença de um sinal de 38 kDa compatível com o peso molecular da fusão ppIAPP-GFP. Um sinal adicional específico de IAPP de ~32 kDa também foi detectado nessas amostras (Figura 5). De forma semelhante, os lisados de proteína de pIAPP-GFP revelaram a presença de um sinal de 36 kDa, correspondente ao peso molecular da fusão pIAPP-GFP. Dois outros sinais de ~32 e ~70 kDa foram também identificados. Tais sinais poderão representar intermediários de processamento (sinais de ~ 32 kDa) e dímeros (sinal de ~ 70 kDa) de espécies de IAPP. Lisados de proteína total de células que expressam matIAPP-GFP revelaram a existência de um único sinal de ~31 kDa que corresponde ao peso molecular da construção madura. Resultados semelhantes foram observados quando as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-GFP ([Figura Suplementar S2](#)). Além disso, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis totais de IAPP entre a estirpe *wild type* e a mutante. Em ambas as estirpes, as células que expressam o pIAPP-GFP apresentaram níveis mais elevados de IAPP total (Figura 5), porém sem impacto significativo no número de células positivas para GFP, conforme revelado pela análise de citometria de fluxo ([Figura Suplementar S1](#)). Técnicas mais robustas, como cromatografia de exclusão por peso molecular, deverão ser úteis para elucidar essa questão.

Em seguida, foi avaliado por microscopia confocal se a ausência da Kex2 interferia com a distribuição subcelular das proteínas quiméricas. À primeira vista, pode-se observar que as células *kex2* são maiores que as células *wild type*, fenômeno já relatado na literatura. Além da *S. cerevisiae*, um espectro variado de descrições fenotípicas foi relatado para uma variedade de mutantes de deleção *kex2* de outras leveduras. As características fenotípicas descritas para esses mutantes incluem alterações morfológicas que se acredita serem derivadas da atividade deficiente das enzimas modificadoras da parede celular (24).

Regarding protein aggregation, as observed in BY4741 cells, ppIAPP-expressing *kex2* cells exhibited a heterogeneous distribution of well-defined intracellular inclusions (Figure 6A and B), whereas a more diffuse GFP signal was observed in *kex2* cells expressing pIAPP-GFP or matIAPP-GFP. Remarkably, in these cells, less defined aggregates were detected in a non-fluorescent compartment, likely the vacuole, suggesting the accumulation of intravacuolar inclusions. This could represent a cellular defense mechanism through the compartmentalization of toxic protein assemblies. Further experiments are required to elucidate this issue. Although visual inspection suggests that aggregates in ppIAPP-GFP expressing cells seem to be larger and

Em relação à agregação de proteínas, conforme observado nas células BY4741, as células *kex2* que expressam o ppIAPP exibiram uma distribuição heterogênea de inclusões intracelulares bem definidas (Figura 6A e B), enquanto um sinal de GFP mais difuso foi observado nas células *kex2* expressando pIAPP-GFP ou matIAPP-GFP. Notavelmente, nestas células, foram detectados agregados menos definidos num compartimento não fluorescente, presumivelmente o vacúolo, indicando a acumulação de agregados intravacuolares. Tal evidência poderá representar um mecanismo de defesa celular que envolve a compartimentalização de proteínas tóxicas. Experiências adicionais serão necessárias para elucidar esta questão. Embora a inspeção visual sugira que os agregados nas células que expressam ppIAPP-GFP

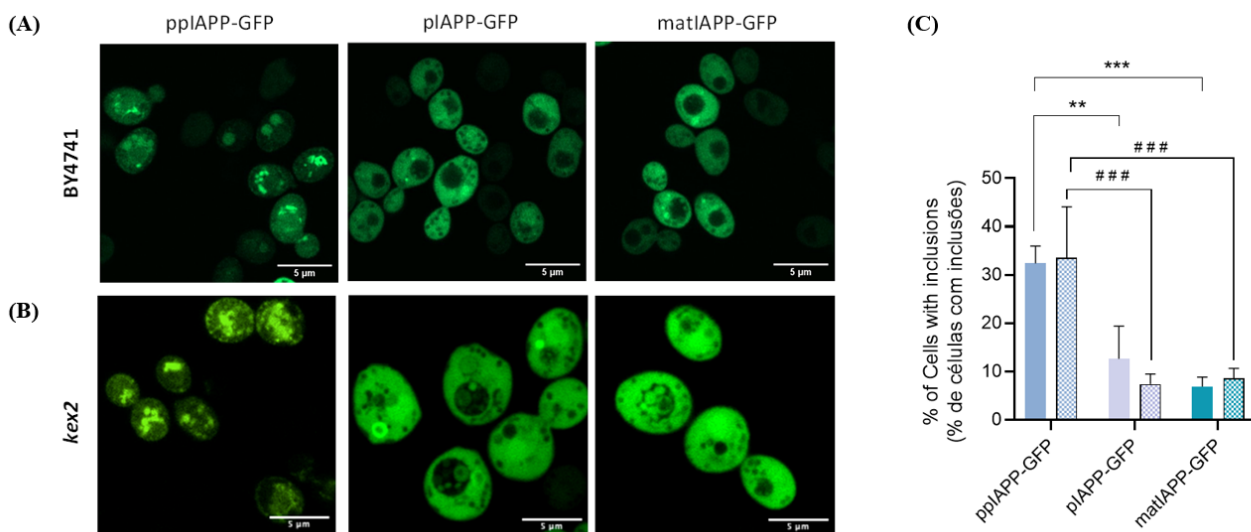


Figure 6 - Lack of Kex2 does not affect intracellular IAPP distribution. BY4741 and *kex2* cells expressing IAPP-GFP fusions and the control were induced for 12 h with galactose. (A) IAPP subcellular distribution in wild type and *kex2* mutant strains expressing immature and mature IAPP forms (at 12 h induction) by confocal fluorescence microscopy. Scale bars correspond to 5 μ m. (B) Cells under the same conditions were assessed by fluorescence microscopy, the number of cells containing inclusions was monitored. *kex2* mutant strain is represented by bars with patterns. Representative images are displayed, and values represent \pm SD from at least three independent experiments. Statistical differences are indicated by ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs respective ppIAPP-GFP or pIAPP-GFP (BY4741); ### $p < 0.01$ and #### $p < 0.001$ vs respective ppIAPP-GFP or pIAPP-GFP (*kex2*).

Figura 6 - A ausência da proteína Kex2 não afeta a distribuição intracelular do IAPP. Células BY4741 e *kex2* que expressam fusões de IAPP-GFP ou o vetor controle foram induzidas com galactose por 12 h. (A) Distribuição subcelular de IAPP em estirpes *wild type* e mutantes *kex2* que expressam formas de IAPP imaturas e maduras (12 h de indução) por microscopia fluorescência confocal. As barras de escala correspondem a 5 μ m. (B) Leveduras sujeitas às mesmas condições foram avaliadas por microscopia de fluorescência, e o número de células contendo inclusões foi monitorizado. A estirpe mutante *kex2* encontra-se representada por barras preenchidas com padrão. Imagens representativas são mostradas e os valores representam \pm SD de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatísticas são indicadas como ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ vs respectivo ppIAPP-GFP ou pIAPP-GFP (BY4741); ### $p < 0.001$ e #### $p < 0.001$ vs respectivo ppIAPP-GFP ou pIAPP-GFP (*kex2*).

more frequent in the *kex2* mutant (Figure 6, A and B), systematic counting of the number of cells containing proteinaceous IAPP inclusions using ImageJ software indicated no differences between the two strains (Figure 6C).

In view of these data, our results do not support the idea of IAPP as a target for Kex2-mediated processing at least in conditions tested. The phenotypic features of *kex2* mutants can be attributed to compromised processing of substrate proteins rendering them dysfunctional and thereby affecting cell growth. An example is the case of the α -pheromone where the deficiency of Kex2-mediated processing disables mutant mating (37). Notwithstanding, the marked increase in cell permeability observed in the *kex2* mutant expressing pIAPP-GFP reveals some degree of response specificity that needs further investigation.

In our study, the absence of Kex2 does not seem to result in cleavage impairment and accumulation of unprocessed forms of pIAPP-GFP. The restricted Kex2 localization in the late trans-Golgi network and prevacuolar compartments explain its limited target spectrum to those proteins anchored to the cell surface or involved in the secretory pathway (24). Accordingly, *kex2* mutants phenotypes have been characterized by the release of incompletely processed protein precursors into the extracellular environment, as the case of the secretory xylanase of *T. reesei* (38). However, evidence has demonstrated that these effects are blurred since the phenotypes described in *kex2* strains may simply be secondary effects themselves. Moreover, failure of Kex2-mediated processing mechanisms may be masked by the function of other proteinases, as the case of yapsins, a family of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked aspartyl proteases (24,39). Further studies are mandatory to better comprehend the role of players involved in the processing of immature forms of IAPP in yeast.

Conclusions

The *kex2* mutants phenotypes have been characterized by the extracellular release of unprocessed protein precursors. Although few proteins have been indicated as possible substrates for Kex2, there is not experimental proof of Kex2 cleavage for the majority of the proteins. There is no reported evidence regarding the effects of Kex2 on the IAPP peptide. Through the generation of a

parecem ser maiores e mais frequentes no mutante *kex2* (Figura 6, A e B), a contagem sistemática do número de células contendo inclusões proteicas de IAPP usando o *software ImageJ* não indicou diferenças entre as duas estirpes (Figura 6C).

Com base nestes dados, os nossos resultados não suportam a ideia de que o IAPP poderá ser um alvo para o processamento mediado pela Kex2, pelo menos nas condições testadas. Os fenótipos dos mutantes *kex2* podem ser atribuídos a falhas no processamento de substratos importantes, tornando-os disfuncionais, e consequentemente afetando o crescimento celular. Um exemplo disso, é o caso da α -feromona, em que a falha do seu processamento mediado pela Kex2 torna o mutante incapaz para efetuar o acasalamento (37). Não obstante, o aumento acentuado na permeabilidade celular mostrado pelo mutante *kex2* que expressa o pIAPP-GFP revela algum grau de especificidade de resposta que necessita de investigação adicional.

No nosso estudo, a ausência da Kex2 não parece resultar no comprometimento da clivagem e na acumulação de formas não processadas de pIAPP-GFP. A localização restrita da Kex2 na rede trans-Golgi tardia e nos compartimentos pré-vacuolares explica o seu limitado espectro a proteínas alvo ligadas à superfície celular ou envolvidas na via secretória (24). Consequentemente, os fenótipos dos mutantes *kex2* têm sido caracterizados pela secreção de proteínas precursoras não processadas para o ambiente extracelular, como é o exemplo da xilanase secretora de *T. reesei* (38). No entanto, evidências demonstraram que esses efeitos não são claros, uma vez que os fenótipos observados nos mutantes *kex2* podem ser devidos apenas à ocorrência de efeitos secundários à mutação. Além disso, a falha no processamento mediado pela Kex2 pode ser mascarada pela atividade de outras proteases, como o caso das yapsinas, uma família de proteases aspárticas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (24,39). Mais estudos serão necessários para entender melhor o papel das enzimas envolvidas no processamento de formas imaturas do IAPP em leveduras.

Conclusões

Os fenótipos dos mutantes *kex2* têm sido caracterizados pela secreção de precursores de proteínas não processados para o espaço extracelular. Embora existam algumas proteínas que têm vindo a ser indicadas como possíveis substratos para a Kex2, o número de proteínas para as quais existe uma prova experimental de clivagem

S. cerevisiae model lacking *KEX2* gene and expressing different chimeric constructs, our study provided novel information about the potential enzymatic activity of this protease on IAPP. The lack of Kex2 reduced cell viability of cells expressing pIAPP, without affecting IAPP processing and intracellular distribution. These data call into question the initially established hypothesis that IAPP would be a potential substrate for Kex2 activity. Additional studies are necessary to better comprehend the mechanisms behind increased pIAPP toxicity in the *kex2* mutant. Moreover, determining the substrates of Kex2 protease would contribute to clarify the phenotypes described in deletion mutants and afford insights into crucial regulatory mechanisms of the cells.

Authors contributions statement

RM conceived and designed the study experiments. SF, AFR and IF executed the experiments. SF, AFR 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). 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.

mediada por esta protease permanece baixo. No que diz respeito ao IAPP, não há evidências relatadas sobre os efeitos da Kex2 sobre este péptido. Através da geração de um modelo de *S. cerevisiae* que não possui o gene *KEX2* e que expressa diferentes construções quiméricas, o nosso estudo forneceu novos dados sobre a potencial atividade enzimática desta protease no processamento do IAPP. A ausência da Kex2 reduziu a viabilidade celular das células que expressam o pIAPP, sem afetar o processamento do IAPP e a sua distribuição intracelular. Estes dados colocam em questão a hipótese inicialmente estabelecida de que o IAPP seria um potencial substrato para atividade da Kex2. Estudos adicionais serão necessários para entender melhor os mecanismos que se encontram por detrás do aumento da toxicidade induzida pela expressão do pIAPP no mutante *kex2*. Além disso, conhecer os substratos da protease Kex2 não só ajudará a explicar os fenótipos observados nos mutantes de deleção, como também fornecerá informações úteis sobre os mecanismos de regulação celular.

Declaração de contribuições dos autores

RM concebeu e projetou os experiências. SF, AFR e IF realizaram as experiências. SF, AFR e RM analisaram os dados e redigiram 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, e pelas bolsas PTDC/BIA-MOL/31104/2017 (RM) e UIDB/04567/2020 e UIDP/ 04567/2020 (CBIOS). Os autores gostariam de agradecer à FCT pelo apoio financeiro da 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 conduzida na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que possam ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

References / Referências

1. Mukherjee, A., Morales-Scheihing, D., Butler, P. C., & Soto, C. (2015). Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. *Trends in Molecular Medicine*, 21(7), 439–449. doi: 10.1016/j.molmed.2015.04.005.
2. Westermark, P. (1972). Quantitative studies of amyloid in the islets of langerhans. *Uppsala Journal of Medical Sciences*. 77(2), 91-4. doi: 10.1517/03009734000000014.
3. Higham, C. E., Hull, R. L., Lawrie, L., Shennan, K. I. J., Morris, J. F., Birch, N. P., Docherty, K., & Clark, A. (2000). Processing of synthetic pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) ‘amylin’ by recombinant prohormone convertase enzymes, PC2 and PC3, in vitro. *European Journal of Biochemistry*, 267(16), 4998–5004. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01548.x.
4. 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.
5. Westermark, P., Andersson, A., & Westermark, G. T. (2011). Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological Reviews*, 91(3), 795–826. doi: 10.1152/physrev.00042.2009.
6. Kahn, S. E., Verchere, C. B., D’Alessio, D. A., Cook, D. L., & Fujimoto, W. Y. (1993). Evidence for selective release of rodent islet amyloid polypeptide through the constitutive secretory pathway. *Diabetologia*, 36(6), 570–573. doi: 10.1007/BF02743276.
7. Zhang, X.-X., Pan, Y.-H., Huang, Y.-M., & Zhao, H.-L. (2016). Neuroendocrine hormone amylin in diabetes. *World Journal of Diabetes*, 7(9), 189–197. doi: 10.4239/wjcd.v7.i9.189.
8. Paulsson, J. F., Andersson, A., Westermark, P., & Westermark, G. T. (2006). Intracellular amyloid-like deposits contain unprocessed pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) in beta cells of transgenic mice overexpressing the gene for human IAPP and transplanted human islets. *Diabetologia*, 49(6), 1237-46. doi: 10.1007/s00125-006-0206-7.
9. Marzban, L., Trigo-Gonzalez, G., Zhu, X., Rhodes, C. J., Halban, P. A., Steiner, D. F., & Verchere, C. B. (2004). Role of beta-cell prohormone convertase (PC)1/3 in processing of pro-islet amyloid polypeptide. *Diabetes*, 53(1), 141–148. doi: 10.2337/diabetes.53.1.141.
10. Zheng, X., Ren, W., Zhang, S., Liu, J., Li, S., Li, J., Yang, P., He, J., Su, S., & Li, P. (2010). Serum levels of proamylin and amylin in normal subjects and patients with impaired glucose regulation and type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*, 47(3), 265–270. doi: 10.1007/s00592-010-0201-9.
11. Asthana, S., Mallick, B., Alexandrescu, A. T., & Jha, S. (2018). IAPP in type II diabetes: Basic research on structure, molecular interactions, and disease mechanisms suggests potential intervention strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(9), 1765–1782. doi: 10.1016/j.bbmem.2018.02.020.
12. 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.
13. Kim, J., Park, K., Kim, M. J., Lim, H., Kim, K. H., Kim, S.-W., Lee, E.-S., Kim, H. (Henry), Kim, S. J., Hur, K. Y., Kim, J. H., Ahn, J. H., Yoon, K.-H., Kim, J.-W., & Lee, M.-S. (2021). An autophagy enhancer ameliorates diabetes of human IAPP-transgenic mice through clearance of amyloidogenic oligomer. *Nature Communications*, 12(1), 183. doi: 10.1038/s41467-020-20454-z.
14. Huang, C., Gurlo, T., Haataja, L., Costes, S., Daval, M., Ryazantsev, S., Wu, X., Butler, A. E., & Butler, P. C. (2010). Calcium-activated calpain-2 is a mediator of beta cell dysfunction and apoptosis in type 2 diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(1), 339–348. doi: 10.1074/jbc.M109.024190.
15. 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.
16. Raimundo, A. F., Ferreira, S., Pobre, V., Lopes-da-Silva, M., Brito, J. A., Dos Santos, D. J. V. A., Saraiva, N., Dos Santos, C. N., & Menezes, R. (2022). Urolithin B: Two-way attack on IAPP proteotoxicity with implications for diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1008418. doi: 10.3389/fendo.2022.1008418.
17. Raleigh, D., Zhang, X., Hastoy, B., & Clark, A. (2017). The beta-cell assassin: IAPP cytotoxicity. *Journal of Molecular Endocrinology*, 59(3), R121–R140. doi: 10.1530/JME-17-0105.
18. Chen, J. J., Genereux, J. C., & Wiseman, R. L. (2015). Endoplasmic reticulum quality control and systemic amyloid disease: impacting protein stability from the inside out. *IUBMB Life*, 67, 404–413. doi: 10.1002/iub.1386.
19. 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.
20. Fuller, R. S., Brake, A., & Thorner, J. (1989). Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(5), 1434–1438. doi: 10.1073/pnas.86.5.1434.
21. Brenner, C., Bevan, A., & Fuller, R. S. B. T.-M. in E. (1994). Biochemical and genetic methods for analyzing specificity and activity of a precursor-processing enzyme: Yeast Kex2 protease, kexin. *Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases* 244, 152–167. doi: 10.1016/0076-6879(94)44013-1.
22. Kjeldsen, T. (2000). Yeast secretory expression of insulin precursors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(3), 277–286. doi: 10.1007/s002530000402.
23. Yonemoto, I. T., Kroon, G. J. A., Dyson, H. J., Balch, W. E., & Kelly, J. W. (2008). Amylin proprotein processing generates progressively more amyloidogenic peptides that initially sample the helical state. *Biochemistry*, 47(37), 9900–9910. doi: 10.1021/bi800828u.
24. Bader, O., Krauke, Y., & Hube, B. (2008). Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *BMC Microbiology*, 8(1), 116. doi: 10.1186/1471-2180-8-116.
25. Rockwell, N. C., & Fuller, R. S. (2002). Specific modulation of Kex2/furin family proteases by potassium. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 17531–17537. doi: 10.1074/jbc.M111909200.
26. Tenreiro, S., & Outeiro, T. F. (2010). Simple is good: yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Research*, 10(8), 970–979. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00649.x.
27. 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: doi.org/10.1002/yea.320070307.
28. Fuller, R.S., Sterne, R.E., & Thorner, J. (1988). Enzymes required for yeast prohormone processing. *Annual Review of Physiology*, 50, 345–362. doi: 10.1146/annurev.ph.50.030188.002021.
29. Bryant, N.J., & Stevens, T.H. (1997). Two separate signals act independently to localize a yeast late Golgi membrane protein through a combination of retrieval and retention. *The Journal of Cell Biology*, 136(2), 287–297. doi: 10.1083/jcb.136.2.287.
30. Wilcox, C.A., & Fuller, R.S. (1991). Posttranslational processing of the prohormone-cleaving Kex2 protease in the *Saccharomyces cerevisiae* secretory pathway. *The Journal of Cell Biology*, 115(2), 297–307. doi: 10.1083/jcb.115.2.297.
31. Smeekens, S. P., Chan, S. J., & Steiner, D. F. (1992). The biosynthesis and processing of neuroendocrine peptides: identification of proprotein convertases involved in intravesicular processing. *The Peptidergic Neuron*, 92, 235–246. doi: 10.1016/S0079-6123(08)61179-6.
32. Seidah, N., & Prat, A. (2012). The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 11, 367–383. doi: 10.1038/nrd3699.

33. Rosenberg, M., Azevedo, N. F., & Ivask, A. (2019). Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Scientific Reports*, 9(1), 6483. doi: 10.1038/s41598-019-42906-3.
34. Stewart, G. G. (2017). The Structure and Function of the Yeast Cell Wall, Plasma Membrane and Periplasm. *Brewing and Distilling Yeasts*, ed. G.G. Stewart (Charm: Springer), 55-75. doi: 10.1007/978-3-319-69126-8_5.
35. Marek, A., & Korona, R. (2013). Restricted pleiotropy facilitates mutational erosion of major life-history traits. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 67(11), 3077–3086. doi: 10.1111/evo.12196.
36. Paulsson, J. F., & Westermark, G. T. (2005). Aberrant processing of human proislet amyloid polypeptide results in increased amyloid formation. *Diabetes*, 54(7), 2117-25. doi: 10.2337/diabetes.54.7.2117.
37. Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., & Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell*, 37(3), 1075–1089. doi: 10.1016/0092-8674(84)90442-2.
38. Goller, S. P., Schoisswohl, D., Baron, M., Parriche, M., & Kubicek, C. P. (1998). Role of endoproteolytic dibasic proprotein processing in maturation of secretory proteins in *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3202–3208. doi: 10.1128/AEM.64.9.3202-3208.1998.
39. Komano, H., Rockwell, N., Wang, G. T., Krafft, G. A., & Fuller, R. S. (1999). Purification and characterization of the yeast glycosylphosphatidylinositol-anchored, monobasic-specific aspartyl protease yapsin 2 (Mkc7p). *The Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 24431–24437. doi: 10.1074/jbc.274.34.24431.

Antiphospholipid Syndrome (Clinical case)

Síndrome Anticorpos Antifosfolipídeos (Caso clínico)

Bruno Sousa ^{1,2,3}

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 / autor para correspondência: bruno.sousa@ulusofona.pt

Received / Recebido: 11/08/2022

Accepted / Aceite: 30/10/2022

Electronic Edition: www.alies.pt

40-year-old woman, unemployed. She sought Nutrition Consultation for nutritional control, as she was taking oral anticoagulant therapy. No other pathologies requiring nutritional therapy, but she wanted to lose a little weight.

She is followed in the Thrombophilia Consultation for Antiphospholipid Syndrome (APS) for mutation of the prothrombin gene in heterozygosity. She takes warfarin as an oral anticoagulant, with INR (International Normalized Ratio) control.

Keywords: International Normalized Ratio, nutritional intervention, vitamin K, Antiphospholipid Syndrome, warfarin

Anthropometric evaluation

Weight: 58.6 kg

Height: 157 cm

BMI: 23.8 kg/m²

Waist circumference: 76 cm

Body composition assessment (TANITA TBF 300®)

Body fat: 27.5%

Fat mass: 16.1 kg

Fat-free mass: 42.5 kg

Total body water: 31.1 kg

Mulher de 40 anos, desempregada. Procurou a Consulta de Nutrição para controlo nutricional, pois fazia terapêutica anticoagulante oral. Sem outras patologias que necessitem de terapêutica nutricional, mas pretendia perder um pouco de peso.

É acompanhada na Consulta de Trombofilias por Síndrome Anticorpos Antifosfolipídeos (SAAF) por mutação do gene da protrombina em heterozigotia. Faz anticoagulação oral com varfarina e controlo do INR (International Normalized Ratio).

Palavras-chave: International Normalized Ratio, intervenção nutricional, vitamina K, Síndrome Anticorpos Antifosfolipídeos, varfarin

Avaliação antropométrica

Peso: 58,6 kg

Estatura: 157 cm

IMC: 23,8 kg/m²

Perímetro da cintura: 76 cm

Avaliação da composição corporal (TANITA TBF 300®)

Gordura corporal: 27,5%

Massa gorda: 16,1 kg

Massa isenta de gordura: 42,5 kg

Água corporal total: 31,1 kg

Analytical parameters*Hematology*

Leukocytes: $4.9 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.2 – 10.8)
 Erythrocytes: $4.83 \times 10^6/\mu\text{L}$ (3.91 – 5.07)
 Hemoglobin: 13.3 g/dL (11.9 – 14.9)
 Hematocrit: 38.9% (34.0 - 44.0)
 Platelets: $226.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ (144 – 440)
 Prothrombin time: 31.0 sec (9.4-12.5)
 INR: 2.62 (0.9-1.2)
 PTT seg: 43seg (25-37)
 Fibrinogen: 217.0mg/dl (200.0 – 393.0)

Lupus antic. – Ratio: 0,99 ($\leq 1,20$)
 Silica Clotting Time – Ratio: 0,99 (≤ 1.16)

Biochemistry

Glucose: 96 mg/dL (74.0 - 106.0)
 Urea: 17 mg/dL (16.6 – 48.5)
 Creatinine: 0.61 mg/dL (0.50 – 0.90)
 Sodium: 138.0 mEq/L (136 - 145)
 Potassium: 3.90 mEq/L (3.5 – 5.10)
 Chlorine: 102.0 mEq/L (98-107)

Total cholesterol: 178 mg/dL (< 200.0)
 HDL cholesterol: 56.0 mg/dL (> 45.0)
 LDL cholesterol: 99.4 mg/dL (< 100.0)
 Triglycerides: 113.0 mg/dL (< 150.0)
 Alanine Aminotransferase: 16.9 U/L (≤ 33)
 Aspartate Aminotransferase: 15.0 U/L (≤ 32)
 Gamaglutamyltransferase: 6.0 U/L (5.0 – 36.0)

Imunology

Anti-nuclear antibodies (ANA): Negative
 Screen ENA's: 0.3 (< 10)
 Ac. Anti-dsDNA, IgG: 0.0 GPL/mL (< 10)
 Ac. Anti-cardiolipinas, IgG: 0.0 GPL/mL (< 10)
 Ac. Anti-cardiolipinas, IgM: 7.0 MPL/mL (< 10)
 Ac. Anti-Beta-2 Glicoproteína I, IgG: 0.0 UA/mL (< 10)
 Ac. Anti-Beta-2 Glicoproteína I, IgM: 11.4 UA/mL (< 10)

Clinical evaluation*Personal background*

- APS
- Prothrombin gene mutation in heterozygosity
- Repeat abortions (2nd trimester fetal death + abortion at 6th week of pregnancy)
- Has one 9 year old child and another four months old

Parâmetros analíticos*Hematologia*

Leucócitos: $4,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4,2 – 10,8)
 Eritrócitos: $4,83 \times 10^6/\mu\text{L}$ (3,91 – 5,07)
 Hemoglobina: 13,3 g/dL (11,9 – 14,9)
 Hematócrito: 38,9% (34,0 – 44,0)
 Plaquetas: $226,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ (144 – 440)
 Tempo de protrombina: 31,0 seg (9,4-12,5)
 INR: 2,62 (0,9-1,2)
 PTT seg: 43 seg (25-37)
 Fibrinogénio: 217,0 mg/dl (200,0 – 393,0)

Antic. Lúpico – Ratio: 0,99 ($\leq 1,20$)
 Tempo de Coagulação da Sílica – Ratio: 0,99 ($\leq 1,16$)

Bioquímica

Glicose: 96 mg/dL (74,0 – 106,0)
 Ureia: 17 mg/dL (16,6 – 48,5)
 Creatinina: 0,61 mg/dL (0,50 – 0,90)
 Sódio: 138,0 mEq/L (136 – 145)
 Potássio: 3,90 mEq/L (3,5 – 5,10)
 Cloro: 102,0 mEq/L (98 – 107)

Colesterol total: 178 mg/dL ($< 200,0$)
 Colesterol HDL: 56,0 mg/dL ($> 45,0$)
 Colesterol LDL: 99,4 mg/dL ($< 100,0$)
 Triglicéridos: 113,0 mg/dL ($< 150,0$)
 Alanina Aminotransferase: 16,9 U/L ($\leq 33,0$)
 Aspartato Aminotransferase: 15,0 U/L (≤ 32)
 Gamaglutamiltransferase: 6,0 U/L (5,0 – 36,0)

Imunologia

Anticorpos Anti-nucleares (ANA): Negativo
 Screen ENA's: 0,3 (< 10)
 Ac. Anti-dsDNA, IgG: 0,0 GPL/mL (< 10)
 Ac. Anti-cardiolipinas, IgG: 0,0 GPL/mL (< 10)
 Ac. Anti-cardiolipinas, IgM: 7,0 MPL/mL (< 10)
 Ac. Anti-Beta-2 Glicoproteína I, IgG: 0,0 UA/mL (< 10)
 Ac. Anti-Beta-2 Glicoproteína I, IgM: 11,4 UA/mL (< 10)

Avaliação clínica*Antecedentes pessoais*

- SAAF
- Mutação do gene da protrombina em heterozigotia
- Abortos de repetição (morte fetal no 2º trimestre + aborto à 6ª semana de gestação)
- Tem um filho com 9 anos de idade e outro com 4 meses

Medication

Warfarin (variable - depending on INR)

Intestinal transit: regular

Eating habits

Wake up at 8 am

Breakfast:
None

Lunch: 2 pm
Dish: Half a plate of white rice or pasta + meat or fish (120 g) + vegetables (about 100 g)
Dessert: 1 medium piece of fruit
Water to drink

Afternoon snack: 5 pm
1 medium piece of fruit
1 plain or flavoured yoghurt
4 tablespoons of oat flakes

Dinner: 8:30 pm
Identical to lunch

Goes to bed at 11 pm

Water consumption: approximately 1.5 litres per day

Alcohol habits: Sporadic use at parties

Smoking habits: Does not smoke

Environment, behaviour and social

She is married and lives with her husband and two children.

She spends most of her time at home, where she has most of her meals, but mentions that she also has some social gatherings, where the food offered is more diverse. On weekends, she has some meals in restaurants.

She likes sweets and mentions that she takes care with the preparation of food, opting for a healthy preparation. She is sedentary, although she does go for some walks, but not routinely.

Medicação

Varfarina (variável – em função do INR)

Trânsito intestinal: regular

Hábitos alimentares

Acorda às 8h

Pequeno-almoço:
Não faz

Almoço: 14h
Prato: Meio prato de arroz branco ou massa + carne ou peixe (120 g) + vegetais (cerca de 100 g)
Sobremesa: 1 peça de fruta média
Bebe água

Lanche da tarde: 17h
1 peça de fruta média
1 iogurte natural ou aroma
4 colheres de sopa de flocos de aveia

Jantar: 20h30
Idêntico ao almoço

Deita-se às 23h

Consumo de água: cerca de 1,5 L por dia

Hábitos etílicos: Consumo esporádico em festas

Hábitos tabágicos: Não fuma

Ambiente, comportamento e social

É casada e vive com o marido e os dois filhos.

Passa a maior parte do tempo em casa, onde realiza a maioria das suas refeições, mas refere que faz alguns convívios sendo aqui a oferta alimentar mais diversificada. Aos fins-de-semana faz algumas refeições em restaurantes.

Gosta de doces e refere ter cuidado com a confeção dos alimentos, optando por uma confeção saudável. Apresenta uma atividade sedentária, embora faça algumas caminhadas, mas não por rotina.

Questions

1. What is Antiphospholipid Syndrome?
2. What is the treatment for Antiphospholipid Syndrome?
3. In cases where warfarin is the treatment, should there be restrictions on the intake of food rich in vitamin K?
4. What is the role of the Nutritionist in these patients treated with warfarin?
5. Is a diet rich in calcium important in the nutritional intervention for this syndrome?

Acknowledgements

The author wishes to express his thanks to the patient who allowed the elaboration of the case study.

Conflict of Interests

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

Questões

1. O que é o Síndrome Anticorpos Antifosfolipídeos?
2. Qual é o tratamento do Síndrome Anticorpos Antifosfolipídeos?
3. Nestes casos em que a terapêutica é a varfarina, deve ser feita uma restrição da ingestão de alimentos ricos em vitamina K?
4. Qual é o papel do Nutricionista nestes doentes que têm como terapêutica a varfarina?
5. Na intervenção nutricional deste síndrome é importante uma dieta rica em cálcio?

Reconhecimentos

O autor deseja expressar o seu agradecimentos à paciente que permitiu a elaboração do estudo de caso.

Conflito de interesses

O autor declarou não haver relações financeiras e pessoais que possam representar potencial conflito de interesses.

Respostas	Answers
<p>1. É uma doença autoimune causada por autoanticórpulos direcionados contra uma ou mais proteínas ligadas a fosfolípídeos: anticórpulos anti-cardiolipina ou beta-2 glicoproteína I. As manifestações clínicas mais frequentes incluem trombose venosa profunda dos membros inferiores, embolia pulmonar, abortos espontâneos precoces e tardios, características clínicas de artrite, e enxaqueca.</p>	<p>1. It is an autoimmune disease caused by autoantibodies directed against one or more proteins linked to phospholipids: lupus anticoagulant, anti-cardiolipin, or beta-2 glycoprotein I. The most frequent clinical manifestations include deep venous thrombosis of the lower limbs, pulmonary embolism, early and late spontaneous abortions, clinical features of arthritis, and migraine.</p>
<p>2. Para a profilaxia e o tratamento é utilizada a anticoagulação: heparina, varfarina (exceto em grávidas) ou antiagregação: ácido acetilsalicílico. A escolha da terapêutica depende das manifestações clínicas e do tipo de anticórpulos e da morbidade obstétrica.</p> <p>3. Nestes casos, o consumo de alimentos particularmente ricos em vitamina K não está desautorizado mas deve ser moderado, sendo que aqui o fundamental é conservar um regime alimentar equilibrado e constante no tempo, não havendo necessidade de restrições severas.</p> <p>Naqueles doentes que apresentam outras patologias que necessitam de terapêutica alimentar e que beneficiam de um aumento do consumo de hortofrutícolas, não há justificação para a sua restrição, pois o seu consumo é importante para o tratamento da doença e para evitar carências em micronutrientes, sem influenciar o controlo da hipocoagulação.</p>	<p>2. For prophylaxis and treatment, anticoagulation is used: heparin, warfarin (except in pregnant women) or antiaggregation: acetylsalicylic acid. The choice of therapy depends on the clinical manifestations and the type of antibodies and obstetric morbidity.</p> <p>3. In these cases, the consumption of foods particularly rich in vitamin K is not forbidden, but must be moderate. The fundamental point is to maintain a balanced diet, constant over time, with no need for severe restrictions.</p> <p>In patients with other pathologies that require dietary therapy and who benefit from an increased intake of fruit and vegetables, there is no justification for their restriction, as it is important for the treatment of the disease and to avoid micronutrient deficiencies, without influencing the control of hypocoagulation.</p>
<p>4. O Nutricionista é muito importante nestas situações e deverá ter um papel muito ativo no acompanhamento dos doentes desde o início da instituição desta terapêutica. A sua intervenção passa pela educação alimentar e pela indicação da alimentação adequada, com um conteúdo regular e diário de fornecedores de vitamina K, contornar o efeito da sazonalidade, e assim contribuir para uma melhor estabilidade da terapia anticoagulante.</p>	<p>4. The Nutritionist is very important in these situations and should play a very active role in monitoring patients from the beginning of this therapy. His or her intervention involves dietary education and the indication of an adequate diet, with a regular and daily content of vitamin K sources, to circumvent the effect of seasonality, and thus contribute to better stability of the anticoagulant therapy.</p>
<p>5. Uma dieta rica em cálcio é também importante, uma vez que estes doentes sob efeito de heparina ou varfarina têm maior risco de osteoporose ou osteopenia.</p>	<p>5. A diet rich in calcium is also important, as these patients on heparin or warfarin have a higher risk of osteoporosis or osteopenia.</p>

References / Referências

1. Domingues, B., Cardoso, F., Rodrigues, T. (2019). Alimentação e Hipocoagulação Oral. Porto: Associação Portuguesa de Nutricionistas.
2. Klack, K., Carvalho, J.F. (2013). Dietetic issues in antiphospholipid syndrome. *Rheumatology International*, 33(3), 823–824. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-2313-0>.
3. Lim, W., Crowther M.A., Eikelboom, J.W. (2006). Management of Antiphospholipid Antibody Syndrome - A Systematic Review. *JAMA*. 295(9), 1050–1057. <https://doi.org/10.1001/jama.295.9.1050>.
4. Miyakis, S., Lockshin, M.D., Atsumi, T., Branch, B.W., Brey, R.L., Cervera, R., Derksen, R.H.W.M., DE Groot, P.G., Koike, T., Meroni, P.L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, P.G., Krilis, S.A. (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 4(2), 295–306. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x>
5. Negrini, S., Pappalardo, F., Murdaca, G., Indiveri, F., Puppo, F.(2017). The antiphospholipid syndrome: from pathophysiology to treatment. *Clinical and experimental medicine*, 17(3), 257–267. <https://doi.org/10.1007/s10238-016-0430-5>
6. Ruiz-Irastorza, G., Crowther, M., Branch, W., Khamashta, M.A.(2010). Antiphospholipid syndrome. *Lancet*, 30;376(9751):1498-509. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60709-X.
7. Santos, L, Figueiredo, L. Fonseca, F. (2006). Vitamina K e antiagregantes orais. *Nutricias*, 5 :33-35.
8. Tektonidou, M.G., Andreoli, L., Limper, M., Amoura, Z., Cervera, R., Costedoat-Chalumeau, N., Cuadrado, M.J., Dörner, T., Ferrer-Oliveras, R., Hambly, K., Khamashta, M.A., King, J., Marchiori, F., Meroni, P.L., Mosca, M., Pengo, V., Raio, L., Ruiz-Irastorza, G., Shoenfeld, Y., Stojanovich, L., Svenungsson, E., Wahl, D., Tincani, A., Ward, M.M.(2019). EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Annals of the rheumatic diseases*, 78(10), 1296–1304. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215213>.

Evaluation of the protective and moisturizing effects of cosmetic formulations for the skin containing extracts with film-forming properties

Avaliação dos efeitos protetor e hidratante de formulações cosméticas para a pele contendo extratos com propriedades filmógenas

Bruna Penachin, Leticia Kakuda, Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos*

School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Avenida do Café, S/N, Ribeirão Preto - SP, 14040-903, Brasil

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

Abstract

The development of formulations that provide efficient film-forming properties is important since film formation can protect the skin and hair from the action of external aggressors, such as pollution. Thus, the aim of this study was to evaluate the film-forming effect of cosmetic formulations for the skin containing extracts of *Kappaphycus alvarezii* and *Caesalpinia spinosa*, as well as the use of hemisqualane as an alternative to synthetic silicones. The evaluation of efficacy was performed by biophysical techniques and skin imaging techniques, as well as by a sensorial analysis. Sixteen women, aged 18 to 30 years, participated in the study. The results obtained demonstrated that the presence of the extracts in the formulation enabled the formation of a film that helped maintain skin barrier integrity, reduced desquamation, and improved parameters related to hydration. Finally, the study also showed that there were no significant differences between the formulations containing silicones and hemisqualane, which supports the use of hemisqualane as a more sustainable alternative in cosmetic formulations.

Keywords: biopolymer, film-forming effect, hemisqualane, clinical efficacy, cosmetics

Resumo

O desenvolvimento de formulações que confirmam efeitos filmógenos eficientes são importantes, uma vez que a formação desse filme é capaz de proteger a pele e os cabelos da ação de agentes agressores externos, como a poluição. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito filmógeno de formulações cosméticas para os cuidados da pele contendo os extratos de *Kappaphycus alvarezii* e *Caesalpinia spinosa*, bem como o uso do hemiesqualano como alternativa aos silicones sintéticos. A avaliação da eficácia clínica foi realizada por meio de técnicas de biofísica e análise de imagem da pele e análise sensorial. Participaram do estudo 16 mulheres, idade 18 a 30 anos. Os resultados obtidos mostraram que a presença dos extratos na formulação proporcionou a formação de um filme que auxiliou na manutenção da integridade da barreira cutânea, reduziu a descamação e melhorou parâmetros relacionados à hidratação. Por fim, o estudo também demonstrou que não houveram diferenças significativas entre as formulações contendo os silicones e o hemiesqualano, o que possibilita o uso do hemiesqualano como uma alternativa mais sustentável nas formulações cosméticas.

Palavras-chave: biopolímeros, efeito filmógeno, hemiesqualano, eficácia clínica, cosméticos

Introduction

For more than a century, the cosmetics industry has been responsible for developing products that have an essential meaning for consumer society, as they are related to how people express themselves (1). This sector does not seem to suffer even in times of crisis and constantly continues searching for innovative projects (1).

During the pandemic, some changes were observed concerning the consumer profile by increasing the demands for cosmetic products with skin care and health care as their primary appeal (2). Therefore, among the proposals for innovative formulations are those that provide a film-forming effect to the skin or the hair, protecting them from the action of aggressive external agents, such as atmospheric pollution (3,4).

Thus, such formulations are interesting from the point of view of innovation and for the potential benefit, they can provide to the skin (5). These products act either by forming a polymeric film (synthetic or natural) on the skin surface or using a residual liquid film, resulting in a thin and transparent layer in the area (4,6).

The search for raw materials is a crucial step in the research and development process of cosmetic products, considering that this industry follows market demand. Consumers worldwide are also attentive to the search for innovative cosmetics formulations concerned with aspects related to product sustainability (7).

This way, some natural ingredients can be applied to provide a film-forming effect to the formulation. The red algae extract (*Kappaphycus alvarezii*) can be combined with tara extract (from the *Caesalpinia spinosa* fruit) through a controlled hydrolysis process that results in a natural biopolymer that has the potential to form a non-occlusive, flexible and resistant film on the skin surface (4). This association is rich in polysaccharides and, due to the characteristic of the polymer, presents an expressive potential for the promotion of the film-forming effect with clinical applicability to reduce the skin-pollutant interaction (4).

Introdução

A indústria cosmética, há mais de um século, é responsável por desenvolver produtos que possuem um significado importante para a sociedade de consumo, uma vez que estes estão relacionados à forma de expressão dos indivíduos (1). Ainda em tempos de crise, este setor não demonstra sofrer grandes abalos e continua em constante busca por projetos inovadores (1).

Durante o contexto pandêmico foram observadas mudanças em relação ao perfil de consumo dos indivíduos, aumentando a procura por produtos cosméticos que tenham como principal apelo o cuidado e a saúde da pele (2). Assim, dentre as propostas de formulações inovadoras temos as que conferem efeito filmógeno à pele ou aos fios de cabelo, protegendo-os da ação de agentes agressores externos, como, por exemplo, a poluição atmosférica (3,4).

Com isso, formulações que conferem efeito filmógeno à pele são interessantes do ponto de vista de inovação e pelo potencial benefício que podem proporcionar para a pele (5). Estes produtos atuam tanto pela formação de um filme polimérico, sintético ou natural, na superfície da pele quanto pela utilização de um filme líquido residual resultando em uma película fina e transparente no local (4,6).

A busca por matérias-primas, por sua vez, é uma etapa crucial do processo de pesquisa e desenvolvimento de cosméticos, visto que a indústria cosmética segue as demandas de mercado. Outro ponto que cativa a atenção de consumidores a nível mundial, é a busca por formulações inovadoras que se preocupem com aspectos relacionados à sustentabilidade do produto (7).

Assim, alguns ingredientes naturais podem ser aplicados com a finalidade de conferir efeito filmógeno à formulação. O extrato da alga vermelha (*Kappaphycus alvarezii*) pode ser combinado com o extrato de Tara, proveniente do fruto da *Caesalpinia spinosa*, através de um processo de hidrólise controlada que irá resultar em um biopolímero natural que apresenta potencial formação de um filme não oclusivo, flexível e resistente sobre a pele (4). Essa associação é rica em polissacarídeos e, devido à característica do polímero, apresentam expressivo potencial para a promoção de efeito filmógeno com aplicabilidade clínica de reduzir a interação pele-polvente (4).

The cosmetic industry widely uses synthetic silicones due to their versatility in their possible applications. These substances, even in small concentrations, are used as emollient agents that provide important sensorial characteristics (such as improving the spreadability of the formulation and dry touch), and they are also used to facilitate the incorporation of some substances (for example, chemical and physical sunscreens) in cosmetic preparations (8,9). However, even though they provide pleasant sensory characteristics to formulations, silicones remain in the environment for many years and can cause harmful effects to the aquatic environment and human health (7,9,10).

Due to these concerns, alternatives containing natural and biodegradable substances that can replace the functions of synthetic silicones are becoming increasingly important in the cosmetology area (10). Therefore, in addition to polysaccharides, the C13-15 alkane (also known as hemisqualane), a saturated hydrocarbon from sugar cane, is another natural ingredient of interest. As this alkane is obtained from a renewable and biodegradable source, it can function as a natural alternative to synthetic silicones, acting as a light, innovative and multifunctional emollient that confers numerous advantages to improving the spreadability, texture, and sensory properties of formulations (9,10).

Biophysical techniques are clinically relevant to evaluate the film-forming effect of these formulations because they allow the evaluation of the skin noninvasively and in real-time (4). This equipment allows, for example, the evaluation of the stratum corneum integrity, the barrier function of the skin, and microrelief, which are damaged in exposure to pollution, since skin with cutaneous alterations presents high transepidermal water loss and lower hydration values (4,11,12).

Finally, the clinical evaluation of the immediate effect of cosmetics allows the assessment of the action of these products on the skin immediately following their application, such as the action in improving the barrier function or the ability to form a film on the skin surface, which are characteristics proposed by the biopolymer composed of the red algae and tara extracts.

Os silicones sintéticos, são amplamente utilizados pela indústria cosmética devido a sua versatilidade quanto às suas possíveis aplicações. Estes, mesmo em pequenas concentrações, são utilizados como agentes emolientes conferindo características sensoriais importantes (como a melhora da espalhabilidade da formulação e toque seco) e também são usados para facilitar a incorporação de certas substâncias (como exemplo, filtros solares químicos e físicos) nas preparações cosméticas (8,9). Entretanto, ainda que proporcionem características sensoriais agradáveis às formulações, os silicones permanecem por muitos anos no meio ambiente, podendo causar danos ao meio aquático e também à saúde humana (7,9,10).

Em consequência destas preocupações, alternativas contendo substâncias naturais e biodegradáveis que possam substituir as funções dos silicones sintéticos são cada vez mais importantes na área da cosmetologia (10). Desta forma, além dos polissacarídeos, outro insumo natural que desperta interesse é o C13-15 alcano (hemisqualano), um hidrocarboneto saturado derivado da cana-de-açúcar. Por ser obtido de uma fonte renovável e biodegradável, o C13-15 alcano pode funcionar como uma alternativa natural ao uso dos silicones sintéticos, agindo como um emoliente leve, inovador e multifuncional, que confere inúmeras vantagens, sendo as principais relacionadas com a melhora da espalhabilidade, textura e das propriedades sensoriais das formulações (9,10).

Para avaliar o efeito filmógeno dessas formulações, o uso de técnicas de biofísica são de grande relevância clínica pois permitem a avaliação da pele de forma não invasiva e em tempo real (4). Esses equipamentos permite a avaliação da integridade do estrato córneo, função barreira da pele e microrrelevo, por exemplo, as quais são danificadas na exposição à poluição, uma vez que uma pele com alterações cutâneas apresenta elevada perda transepidérmica de água e menores valores de hidratação (4,11,12).

Por fim, a avaliação clínica do efeito imediato de cosméticos permite avaliar a ação desses produtos na pele logo após sua aplicação, como, por exemplo, a atuação na melhora da função barreira ou na formação de filme sobre a pele, que são características propostas pelo biopolímero composto pelo extrato de alga vermelha e tara.

Table 1 - Composition (%) of the developed formulations.
Tabela 1- Composição (%) das formulações desenvolvidas.

I.N.C.I name	P1 (%)	P2 (%)	PS1 (%)	PS2 (%)
Carbomer	0.5	0.5	0.5	0.5
Disodium EDTA	0.05	0.05	0.05	0.05
Glycerin	5	5	5	5
C13-15 Alkane	8	8	-	-
Behenyl Alcohol, Polyglyceryl-10, Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate	1.5	1.5	1.5	1.5
Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer	-	-	5.5	5.5
Cyclopentasiloxane	-	-	2.5	2.5
BHT	0.02	0.02	0.02	0.02
Parfum	0.4	0.4	0.4	0.4
Butylene Glycol	3	3	3	3
<i>Kappaphycus alvarezii</i> & <i>Caesalpinia spinosa</i> Fruit Extract	-	1	-	1
Water	q.s. 100	q.s. 100	q.s. 100	q.s. 100

Legend: formulation with hemisqualane vehicle (P1), formulation with hemisqualane and the extracts (P2), formulation with silicones vehicle (PS1), formulation with silicones and the extracts (PS2)./

Legenda: formulação com hemisqualano veículo (P1), formulação com hemisqualano e os extratos (P2), formulação com silicones veículo (PS1), formulação com silicones e os extratos (PS2).

In consideration of all the aspects mentioned above, the aim of the present study was to evaluate the film-forming effect of cosmetic formulations for the skin containing tara (*Caesalpinia spinosa*) and red algae (*Kappaphycus alvarezii*) extracts, using biophysical and skin imaging techniques and sensory analysis, as well as to evaluate the use of hemisqualane as an alternative to the synthetic silicones.

Em consideração a todos os aspectos mencionados anteriormente, o objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio de técnicas de biofísica e análise de imagem da pele e análise sensorial, o efeito filmógeno de formulações cosméticas para os cuidados da pele contendo os extratos de Tara (*Caesalpinia spinosa*) e alga vermelha (*Kappaphycus alvarezii*), avaliando, bem como o uso do hemisqualano como alternativa aos silicones sintéticos.

Material and methods

Development of formulations

The formulations were developed considering the specifications of the active substance under study, the sensory characteristics, and the interaction with the raw materials used as a vehicle in cosmetic formulations. As presented in Table 1, a gel-cream cosmetic formulation (named P2) was developed based on emulsifier, polymer, emollients, humectants, preservatives, and containing or not (the vehicles) the extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) and red algae (*Kappaphycus alvarezii*).

Material e métodos

Desenvolvimento das formulações

As formulações foram desenvolvidas levando em consideração as especificações da substância ativa objeto de estudo, as características sensoriais e a interação com as matérias-primas empregadas como veículo nas formulações cosméticas. Como apresentada na Tabela 1, foi elaborada uma formulação cosmética gel-creme nomeada de P2, à base de emulsificante, polímero, emolientes, umectantes, conservantes, contendo, ou não (veículo), os extratos de Tara (*Caesalpinia spinosa*) e alga vermelha (*Kappaphycus alvarezii*).

The extracts that were used were obtained commercially (SILAB, France) and have MSDS (Material Safety Data Sheets) as listed by the company responsible for the commercialization of these substances (SILAB, France). Our research group has also previously investigated these extracts (4). Regarding composition, the active substance is composed of a mixture of red algae (*Kappaphycus alvarezii* extract) and tara (*Caesalpinia spinosa* fruit extract).

Thus, the formulations received the following names for identification purposes: gel-cream with hemisqualane vehicle (P1), gel-cream with hemisqualane and the active substance (P2), gel-cream with silicones vehicle (PS1), and gel-cream with silicones and the active substance (PS2).

Stability study and visual evaluation of formulations

The tests regarding the stability of the formulations followed the guidelines described in ANVISA's (National Health Surveillance Agency) Stability Guide for Cosmetic Products, in Brazil.

Preliminary tests of centrifugation and analysis of organoleptic characteristics were performed daily for 28 days. For this purpose, the formulations were stored in plastic and opaque recipients under controlled temperatures (37°C and 45°C) and humidity (70% RH) conditions. After the preliminary stability tests, the formulations were submitted to accelerated stability studies by rheological behavior, which was performed every 7 days during a 28-day period (13,14).

The pH value of the formulations was verified by a 10% (w/w) aqueous dispersion of each formulation in Digimed DM20 (15,16). The centrifugation test was performed with 3 grams of each formulation developed, centrifuging at 3000 rpm for 30 minutes at room temperature (25 °C) in a centrifuge (Excelsa® Baby II, model 206-R, power 0.0440, Fanem, Guarulhos, SP, Brazil) (17).

Samples were stored at room temperature (≈ 25 °C), 37 °C, and 45 °C for 28 days, the samples were visually observed daily for the following changes: color, smell, phase separation, and homogeneity (18).

Os extratos utilizados são obtidos comercialmente (SILAB, França) e possuem FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico), conforme listado pela empresa responsável pela comercialização destas substâncias (SILAB, França). Além disso, outro artigo do grupo de pesquisa investigou esses extratos (4). Em relação à composição da substância ativa, esta é composta por uma mistura dos extratos de algas vermelhas e de tara (SILAB, França).

Assim, as formulações receberam as seguintes nomenclaturas, para fins de identificação: gel-creme com hemisqualano veículo (P1), gel-creme com hemisqualano e a substância ativa (P2), gel-creme com silicones veículo (PS1) e gel-creme com silicones e a substância ativa (PS2).

Estudo de estabilidade das formulações e avaliação visual

Os ensaios referentes à estabilidade das formulações seguiram as orientações descritas no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) no Brasil.

Foram realizados testes preliminares de centrifugação e de análise das características organolépticas, diariamente durante um período de 28 dias. Para tal, as formulações foram armazenadas em recipientes plásticos e opacos, sob condições de temperatura (37°C e 45°C) e umidade (70% UR) controladas. Logo após estes testes preliminares, as formulações foram submetidas aos estudos de estabilidade acelerada por determinação da reologia, que foi realizada cada 7 dias durante o período de 28 dias (13,14).

O valor de pH das formulações foi verificado por meio de dispersão aquosa a 10% (p/p) de cada formulação em peagâmetro Digimed DM20 (15,16). O teste de centrifugação foi realizado com 3 gramas de cada formulação desenvolvida, a 3000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente (25 °C), em centrífuga (Excelsa® Baby II, modelo 206-R, potência 0,0440, Fanem, Guarulhos, SP, Brazil)(17).

As amostras foram observadas visualmente quanto às seguintes alterações: cor, odor, separação de fases e homogeneidade, todos os dias durante o período de 28 dias nas temperaturas ambiente (≈ 25 °C), 37 °C e 45 °C (18).

Study of the rheological behavior

A Brookfield DV3T (Brookfield, Middleboro, MA USA) cone and plate type rheometer equipped with a CP-51 spindle coupled to the RHEOCALCT® software was used for the rheology study. For each analysis, 0.50 and the speed rotation was increased progressively from 0 to 10 rpm, with 2 seconds between each speed, resulting in a curve composed of “shear rate” versus “shear stress”. A second, descending, curve was then generated with the inverse decrease of speed (16).

To characterize rheological behavior, after preparation the formulations were kept at approximately 25°C for 24 hours, and then the parameters of flow index, consistency, minimum apparent viscosity, and thixotropy were evaluated (14,16).

Analysis of the texture profile and spreadability

The texture profile analysis and spreadability were performed using the TA XT Plus® (Stable Microsystems, Surrey, United Kingdom), coupled with the Exponent software. The method is based on the insertion of an analytical probe into the sample, with a previously defined speed and deepness. To evaluate the spreadability, the shear work test was conducted using the TTC Spreadability Rig (HDP/SR) (16). Then to evaluate the other properties, the texture test was performed where the probe used was the Back Extrusion rig (A/BE) (16,20). Both analyses were done in triplicate.

From the resulting graphic of force (N) by time (t) were obtained the following parameters: cohesiveness, consistency, firmness, viscosity index, and spreadability (16,20,21).

Sensorial analysis

The sensorial analysis was performed according to the protocol established by the Ethics Committee in Research Involving Human Being from the School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto from the University of São Paulo (CEP: CAAE 58730816.5.0000.5403). To this end, 16 participants aged between 18 and 30 years were recruited. To each, 42 µL of the formulations was applied to a region area corresponding to 4x5 cm² and delimited on the forearm, making twenty circular movements during

Estudo do comportamento reológico

Para o estudo da reologia das formulações, foi utilizado o reômetro Brookfield DV3T (Brookfield, Middleboro, MA, EUA) tipo cone e placa equipado com um spindle CP-51 e acoplado ao software RHEOCALCT®. Para cada análise, 0,50 e a velocidade de rotação foi aumentada de forma progressiva de 0 a 10 rpm, com 2 segundos entre cada velocidade, resultando em uma curva composta por “taxa de cisalhamento” versus “tensão de cisalhamento”. Após, foi gerada uma outra curva, esta descendente, com a diminuição inversa da velocidade (16).

Para a caracterização do comportamento reológico, as formulações, após o preparo, foram mantidas a aproximadamente 25°C por 24 horas e então foram avaliados os parâmetros de índice de fluxo, consistência, viscosidade aparente mínima (VMA) e tixotropia (14,16).

Análise do perfil de textura e espalhabilidade

A análise do perfil de textura e espalhabilidade foi realizada utilizando-se o equipamento texturômetro TA XT Plus® (Stable Microsystems, Surrey, Reino Unido), acoplado ao software Exponent. O método baseia-se na inserção de uma sonda analítica na amostra, com velocidade e profundidade previamente definidas. Para avaliar a espalhabilidade, foi utilizado o teste de trabalho de cisalhamento com a sonda TTC Spreadability Rig (HDP/SR) (16). Com isso, para avaliar as demais propriedades foi realizado o teste de textura onde a sonda utilizada foi a Back Extrusionrig (A/BE) (16,20). Ambas as análises foram feitas em triplicata.

A partir do gráfico resultante de força (N) por tempo (t) foram obtidos os parâmetros coesividade, consistência, firmeza, índice de viscosidade e espalhabilidade (16,20,21).

Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada conforme o protocolo estabelecido pelo nosso laboratório de pesquisa, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP: CAAE 58730816.5.0000.5403). Para tal, foram recrutados 16 participantes, entre 18 e 30 anos, que aplicaram 42 µL das formulações em uma região de área correspondente a 4x5 cm² e delimitada no antebraço, realizando vinte movimentos circulares

the application (23). The areas were randomly defined. The first region received the vehicle formulation containing hemisqualane. The vehicle with the silicones was applied to the second region. The third region received the formulation containing hemisqualane and the extracts. Finally, the formulation containing the silicones and the active substance was applied in the fourth region.

After application, formulations were evaluated by means of a questionnaire, where each participant evaluated the aspects related to spreadability, soft touch, and the touch sensation. After 5 minutes, the volunteers also evaluated the dry touch, tackiness, white residue, and hydration. The participants evaluated each statement by agreeing, disagreeing, or partially agreeing with the statements regarding the parameters mentioned before. Finally, the participants were asked about their preference for the formulation.

Short-term clinical efficacy study

To identify the immediate effects, such as film formation, the water content of the stratum corneum, the transepidermal water loss (TEWL), and the skin microrelief were evaluated using Corneometer® CM 82, Tewameter® TM 210 and Visioscan® VC 98 (all Courage & Khazaka, Cologne, Germany) equipment respectively. The parameters described above were measured prior to (with basal values) and two hours following the application of the formulations in their respective regions.

The Corneometer® CM 825 was used to determine the water content of the stratum corneum. This equipment is based on the principle of measuring electrical capacitance. The results were provided in arbitrary units (AU) where 1 AU is estimated to correspond to 0.2 - 0.9 mg of water per gram of stratum corneum (24).

To determine the transepidermal water loss from the skin, the Tewameter® TM 210 was used, coupled with software to measure the transepidermal water loss based on the diffusion principle described by Adolf Fick. The probe remained on the skin for two minutes in the region of the forearm that we evaluated. The average value of three measurements was used in the subsequent calculations (4). The values are given in $\text{g}\cdot\text{m}^2\cdot\text{h}^{-1}$.

durante a aplicação (23). As regiões foram definidas de forma randomizada. A primeira região recebeu a formulação veículo contendo hemiesqualano, a segunda região recebeu a que continha o veículo com os silicones. A terceira região recebeu a formulação contendo hemiesqualano e os extratos. Por fim, na quarta região foi aplicada a formulação composta pelos silicones e a substância ativa.

Em seguida, as formulações foram avaliadas através de um questionário, onde cada participante avaliou, logo após a aplicação, aspectos relacionados a espalhabilidade, toque aveludado e sensação ao toque. Além disso, após 5 minutos, os participantes avaliaram quanto ao toque seco, pegajosidade, resíduo branco e hidratação. Para cada afirmação os participantes realizaram a avaliação concordando, discordando ou concordando parcialmente com as afirmativas sobre os parâmetros citados. Por fim, os participantes foram questionados quanto a preferência pela formulação.

Estudo de eficácia clínica em curto prazo

Para identificar os efeitos imediatos, como a formação de filme, os parâmetros avaliados foram o conteúdo aquoso do estrato córneo, a perda transepidermica de água (TEWL) e o microrrelevo cutâneo utilizando os equipamentos Corneometer® CM 82, Tewameter® TM 210 e Visioscan® VC 98 (todos Courage & Khazaka, Colônia, Alemanha respectivamente). As medidas dos parâmetros acima descritos foram realizadas antes (valores basais) e duas horas da aplicação das formulações em suas respectivas regiões.

Para a determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo, foi utilizado o equipamento Corneometer® CM 825, que é baseado no princípio da medida da capacitância elétrica. Os resultados foram fornecidos em unidades arbitrárias (UA) onde se estima que 1 UA corresponda a 0,2 - 0,9 mg de água por grama de estrato córneo (24).

Para a determinação da perda transepidermica de água da pele, foi utilizado o equipamento Tewameter® TM 210, acoplado a um software, cuja função é medir essa perda transepidermica de água, baseado no princípio de difusão descrito por Adolf Fick. A sonda do aparelho permaneceu por dois minutos sobre a pele na região do antebraço que avaliamos, e o valor médio das três medidas obtidas neste intervalo de tempo foi empregado nos cálculos posteriores (4). Os valores são dados em $\text{g}\cdot\text{m}^2\cdot\text{h}^{-1}$.

The Visioscan® VC 98 was used to determine the cutaneous microrelief, providing qualitative and quantitative information on the skin surface in physiological conditions through optical profilometry techniques using a digitalization image process obtained by a video camera. Among the parameters related to the skin surface (SELS - Surface Evaluation of Living Skin), the Sesc (related to skin desquamation) was evaluated.

Statistical analysis and presentation of results

The experimental data obtained from the analysis were submitted to statistical analysis using Prism8 and Origin 8 software. To evaluate normality, the Shapiro-Wilk test was performed. When the curve obtained was normal, the one-way ANOVA test with Tukey's post-test was applied. The Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test was applied when the curve was not normal. For the results, p-values less than or equal to 0.05 were considered significant. Finally, the calculation of the average, standard deviation, and coefficient of variation was performed to present the results as tables, graphs, and figures with the discussion based on the literature data.

Results

Stability study and visual evaluation of formulations

After preparation, the four formulations presented pH values compatible with the skin's pH (25,26,27), in a range where the pH presented variations between 4.5 and 5.5. After the centrifugation cycles, no phase separation was observed in the formulations under study, which remained homogeneous in appearance and were considered stable. Finally, in these conditions and after the 28-day period, no visual changes were observed in the formulations in relation to color, smell, phase separation, and homogeneity (18).

Study of the rheological behavior

The formulations containing the active substance (P2 and PS2) or not (P1 and PS1) presented a non-Newtonian profile, pseudoplastic (with flow index less than 1), and thixotropic behavior (28,29). Regarding the hysteresis area, P2 and PS2 presented significantly

Para a determinação do microrrelevo cutâneo foi utilizado o equipamento Visioscan® VC 98, que fornece informações qualitativas e quantitativas da superfície da pele nas condições fisiológicas, através de técnicas de profilometria óptica, as quais utilizam um processo de digitalização de imagem obtida por uma câmera de vídeo. Dentre os parâmetros relacionados à superfície da pele (SELS - SurfaceEvaluationof Living Skin), com este método foi avaliado o Sesc, que está relacionado à descamação da pele (4,24).

Análise estatística e apresentação dos resultados

Os dados experimentais obtidos nos estudos foram submetidos à análise estatística com o auxílio dos softwares *Prism8* e *Origin8*. Para avaliar a normalidade foi realizado o teste de de Shapiro-Wilk. A partir disso, o teste *one-way* ANOVA com pós teste de Tukey foi aplicado quando a curva obtida fosse normal e o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's quando a curva fosse não normal. Valores de p menor ou igual a 0,05 foram considerados significativos. Por fim, o cálculo da média, desvio padrão e o coeficiente de variação foram realizados para a apresentação dos resultados, que foi feito em forma de tabela, gráficos e figuras com discussão baseada nos dados da literatura.

Resultados

Estudo de estabilidade das formulações e avaliação visual

Após o preparo, as quatro formulações apresentaram valores de pH compatíveis ao da pele (25,26,27), estando dentro de uma faixa em que o pH apresentou variações entre 4,5 e 5,5. Em seguida aos ciclos de centrifugação, não foi observado separação de fases nas formulações em estudo, onde permaneceram com aparência homogênea e, por isso, foram consideradas estáveis neste quesito. Por fim, após o período de 28 dias, não foram observadas alterações visuais, nas quatro formulações, em relação à cor, odor, separação de fases e homogeneidade, em todas as condições de armazenamento (18).

Estudo do comportamento reológico

As formulações, contendo a substância ativa (P2 e PS2) ou não (P1 e PS1), apresentaram um perfil não-newtoniano, pseudoplástico (com índice de fluxo menor que 1) e de comportamento tixotrópico (28,29). Em relação a área de histerese, P2 e PS2 apresentaram

lower values compared to those obtained for their respective vehicles, P1, and PS1 (Figure 1).

In relation to the formulations containing the natural extracts, it was observed that for P2 and PS2 there is a significant increase in the consistency index and minimum apparent viscosity (VMA) compared to P1 and PS1. There was no significant difference in the flow index between the preparations (Figure 2).

Analysis of the texture profile and spreadability

For the formulations containing the active substance, P2, and PS2, it is observed that for both the consistency and firmness parameters, there is a significant decrease ($p < 0.05$) in the values when compared to their vehicles (Figure 3). The same decrease can be observed when the cohesiveness and viscosity index parameters are compared between the preparations containing the studied extracts and the vehicles (Figure 3). Furthermore, there were no significant differences ($p < 0.05$) in the shear work values of the formulations containing the active substances.

Sensorial analysis

In relation to the sensory evaluation noticed immediately following the application of the formulations (Figure 4), P2 presented high acceptability in terms of the spreadability of the formulation and the other preparations. Even so, for P1 and PS1, all volunteers agreed on good spreadability.

valores significativamente menores se comparado aos obtidos para seus respectivos veículos, P1 e PS1 (Figura 1)

Em relação às formulações contendo os extratos naturais, observa-se que para P2 e PS2 há um aumento significativo do índice de consistência e de viscosidade mínima aparente (VMA) em relação a P1 e PS1. Não houve diferença significativa no índice de fluxo entre as preparações (Figura 2).

Análise do perfil de textura e espalhabilidade

Nas formulações contendo a substância ativa, P2 e PS2, observa-se que tanto para o parâmetro de consistência como de firmeza, ocorre uma diminuição significativa ($p < 0,05$) dos valores ao compararmos com os seus veículos (Figura 3). A mesma diminuição pode ser observada quando comparamos os parâmetros de coesividade e índice de viscosidade entre as preparações contendo os extratos estudados e os veículos (Figura 3). Ademais, não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores do trabalho de cisalhamento das formulações contendo as substâncias ativas.

Análise Sensorial

Em relação à avaliação sensorial percebida logo após a aplicação das formulações (Figura 4), P2 apresentou grande aceitabilidade quanto a espalhabilidade da formulação, assim como as demais preparações. Ainda assim, para P1 e PS1 todos os voluntários concordaram sobre a boa espalhabilidade.

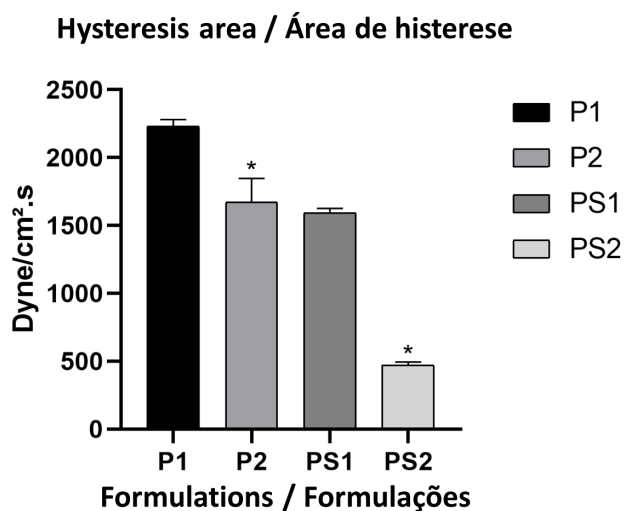


Figure 1 - Hysteresis area of P1, P2, PS1, and PS2 formulations. (*) Represents the significant difference compared to the values initially obtained ($p < 0.05$).

Figura 1 - Área de histerese das formulações P1, P2, PS1 e PS2. (*) Representa a diferença significativa em relação aos valores basais obtidos inicialmente ($p < 0,05$).

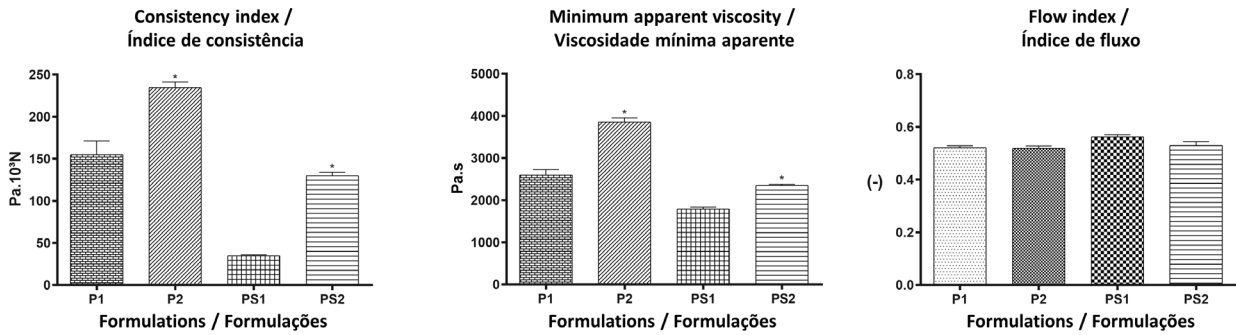


Figure 2 - Consistency index, minimum apparent viscosity (VMA), and flow index of P1, P2, PS1, and PS2 formulations. (*) Represents the significant difference compared to the values obtained initially ($p < 0.05$).

Figura 2 - Índice de consistência, viscosidade mínima aparente (VMA) e índice de fluxo das formulações P1, P2, PS1 e PS2. (*) Representa a diferença significativa em relação aos valores obtidos inicialmente ($p < 0,05$).

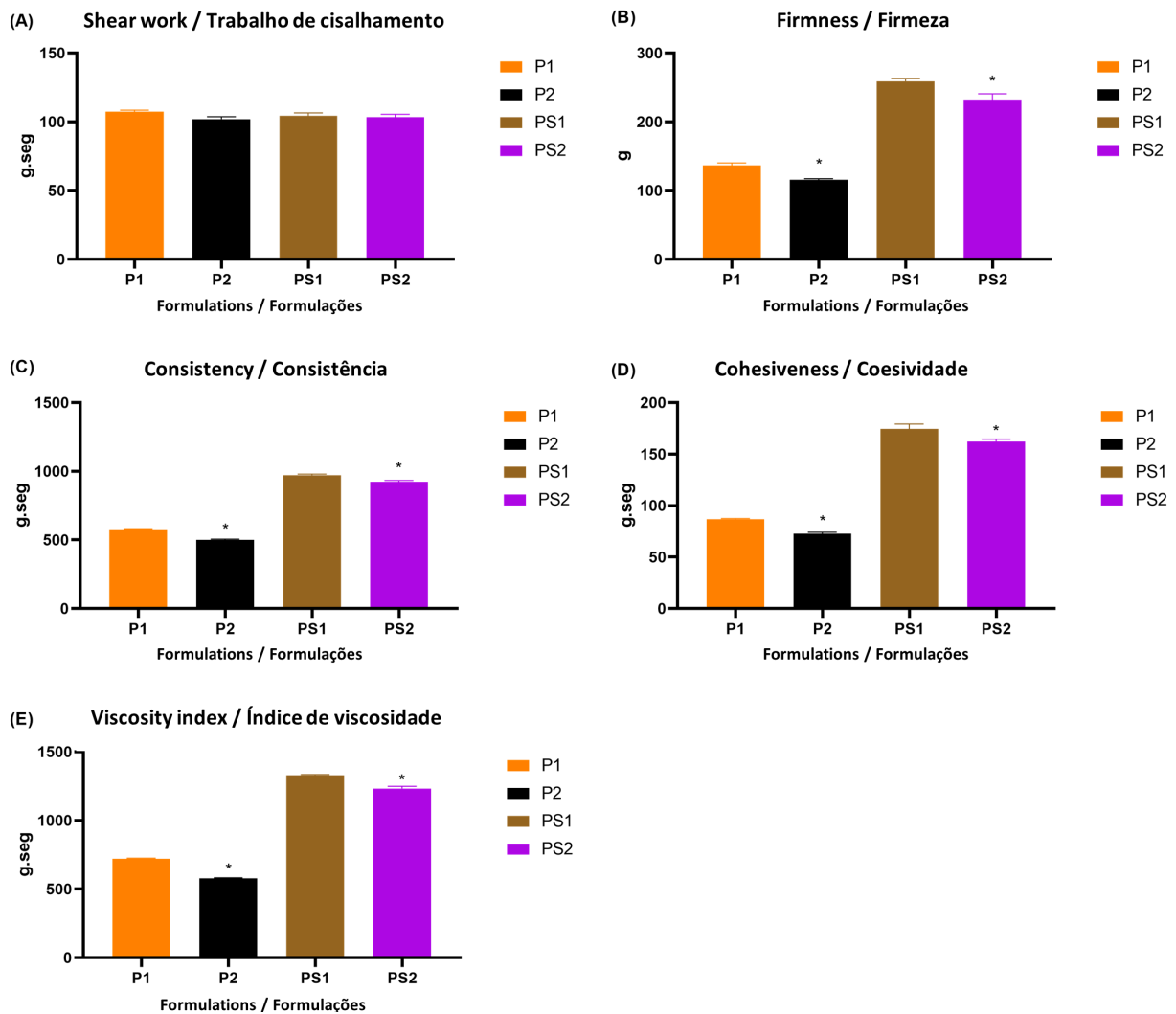


Figure 3 - Texture profile and spreadability of the formulations. (A) Shear Work; (B) Firmness; (C) Consistency; (D) Cohesiveness; (E) Viscosity Index. (*) Represents the significant difference compared to the values obtained initially ($p < 0.05$).

Figura 3 - Gráficos referentes ao perfil de textura e espalhabilidade das formulações P1, P2, PS1 e PS2, sendo: (A) Trabalho de cisalhamento; (B) Firmeza; (C) Consistência; (D) Coesividade; (E) Índice de Viscosidade. (*) Representa a diferença significativa em relação aos valores obtidos inicialmente ($p < 0,05$).

As for the velvety/satin touch, more volunteers agreed that P2 conferred this characteristic compared to the results obtained by the other formulations. Regarding the softness, PS2 conferred a better result among the preparations.

In the sensory analysis performed 5 minutes following the application of the formulations, it was observed that for the parameters of hydration and stickiness, P1 and P2 showed similar results, and were better than those of the PS1 and PS2 formulations (Figure 5). The data regarding the dry feel of the formulation indicates that P2 shows a better result than the others and has slightly higher acceptability than P1. As for the formation of white residue, the volunteers agreed with the statement, "the formulation doesn't leave a white residue on the skin" for all the formulations.

When asked about their preference for one of the formulations, 87.5% of the participants preferred the formulations containing hemisqualane, the natural alternative to the use of synthetic silicones. From these, 43.75% chose formulation P2.

Quanto ao toque aveludado/acetinado, se comparado ao resultado obtido pelas demais formulações, mais voluntários concordaram que P2 conferiu essa característica. Já em relação a suavidade conferida pelas preparações, PS2 apresentou melhor resultado.

Quanto à avaliação sensorial realizada após 5 minutos da aplicação das formulações, observa-se que para os parâmetros de hidratação e pegajosidade, P1 e P2 apresentaram resultados semelhantes entre si e melhores, se comparados às formulações PS1 e PS2 (Figura 5). Quando observa-se os dados sobre o toque seco da formulação, P2 apresenta um resultado melhor frente às demais, além de ter uma aceitabilidade ligeiramente maior que P1. Já em relação a formação de resíduo branco, para todas as formulações, os voluntários concordaram com a afirmação "a formulação não deixa resíduo branco na pele".

Quando questionados sobre a preferência por uma das formulações, houve uma preferência de 87,5% dos participantes pelas formulações contendo a alternativa natural ao uso de silicones sintéticos, o hemiesqualano. Destes, 43,75% escolheram a formulação P2.

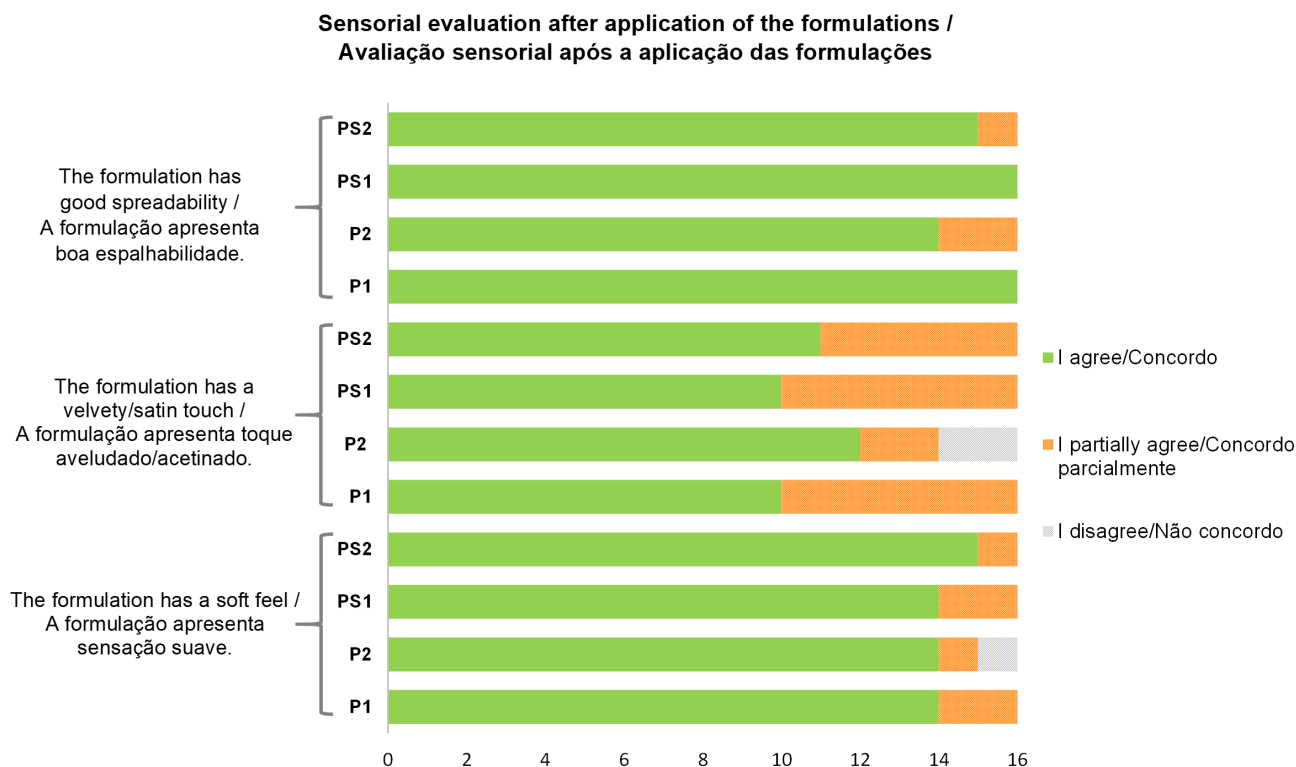


Figure 4 - Results of the sensory analysis after the application of formulations P1, P2, PS1, and PS2.

Figura 4 - Resultado da análise sensorial logo após a aplicação das formulações P1, P2, PS1 e PS2.

Short-term clinical efficacy study

In relation to the aqueous content of the stratum corneum, all formulations showed a significant increase compared to the initial time and 2 hours after application (Figure 6).

Regarding the skin peeling results, the preparations containing the active substance (P2 and PS2) showed a significant ($p < 0.05$) reduction of the parameter evaluated in relation to the baseline time when compared to the vehicle results (Figure 7).

For the results obtained about transepidermal water loss (Figure 8), the formulations containing the extracts (P2 and PS2) showed significantly ($p < 0.05$) lower values when compared to the basal values.

Estudo de eficácia clínica em curto prazo

Em relação ao conteúdo aquoso do estrato córneo, todas as formulações apresentaram aumento significativo, em relação ao tempo inicial e após 2 horas (Figura 6).

Quanto aos resultados de descamação da pele, as preparações contendo a substância ativa (P2 e PS2) apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) do parâmetro avaliado em relação ao tempo basal, se comparadas aos resultados dos veículos (Figura 7).

Para os resultados obtidos em relação a perda transepidérmica de água (Figura 8), as formulações contendo os extratos (P2 e PS2) apresentaram valores significativamente ($p < 0,05$) menores, se comparado aos valores basais.

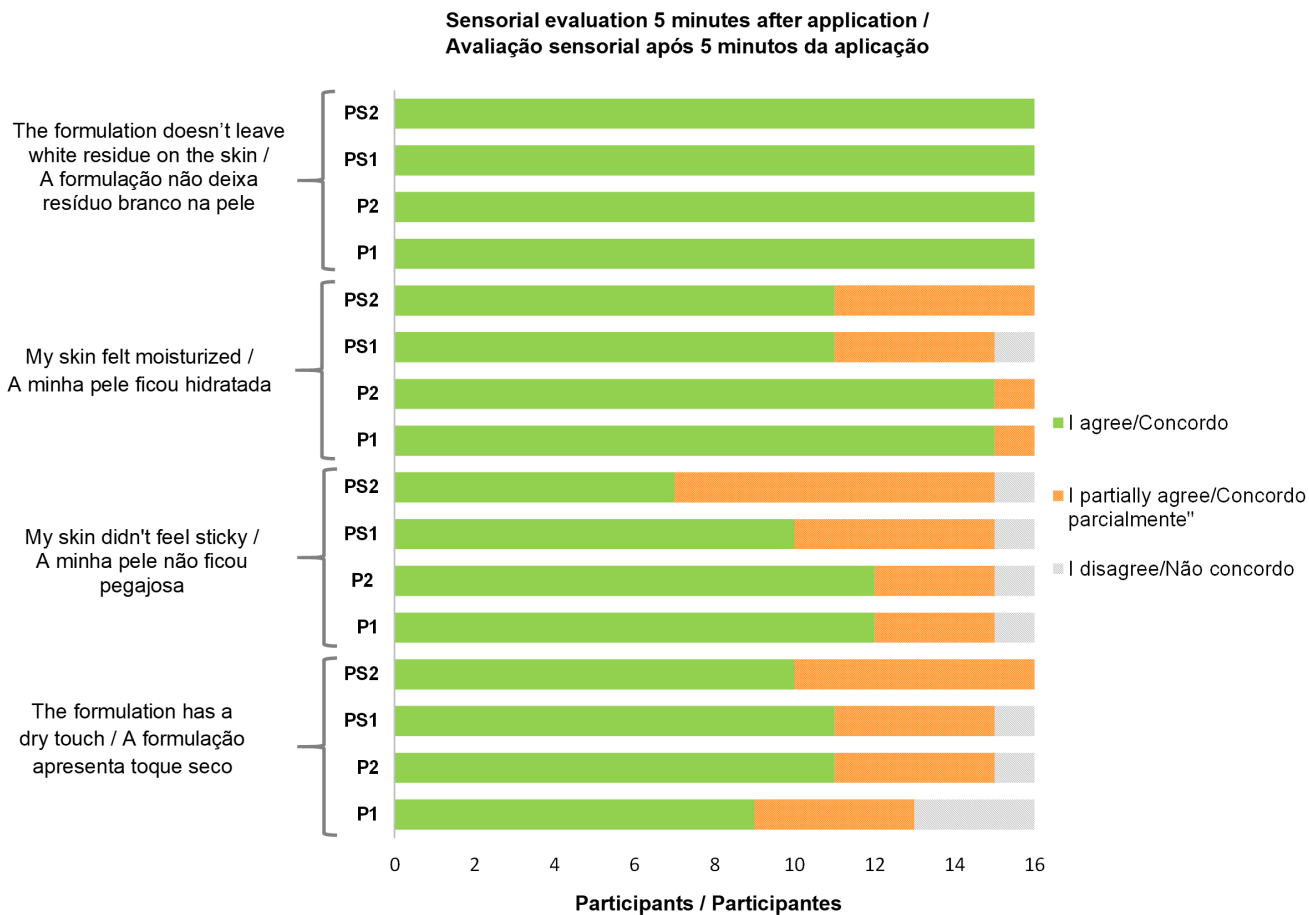


Figure 5 - Result of sensorial analysis 5 minutes after application of formulations P1, P2, PS1, and PS2.

Figura 5 - Result of sensorial analysis 5 minutes after application of formulations P1, P2, PS1, and PS2.

**Water content of the stratum corneum /
 Conteúdo aquoso do estrato córneo**

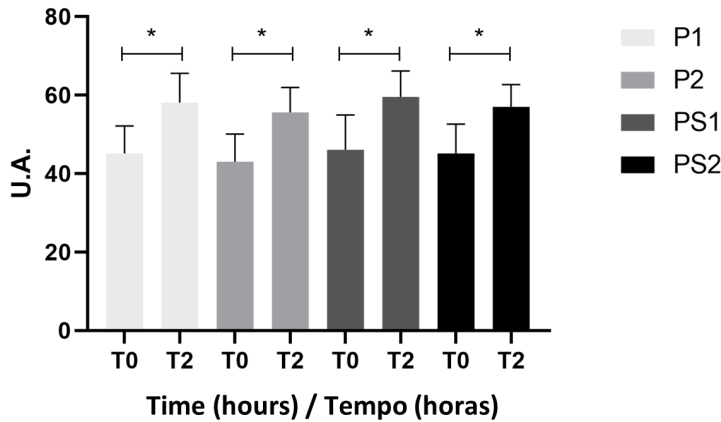


Figure 6 - Water content of the stratum corneum in the forearm region right after the application of the formulation (T0) and 2 hours after application (T2). (*) Represents the significant difference compared to the baseline values initially obtained ($p < 0.05$).

Figura 6 - Resultados sobre o conteúdo aquoso do estrato córneo na região do antebraço logo após aplicação da formulação (T0) e após 2h da aplicação (T2). (*) Representa a diferença significativa em relação aos valores basais obtidos inicialmente ($p < 0,05$).

Skin desquamation / Descamação da pele

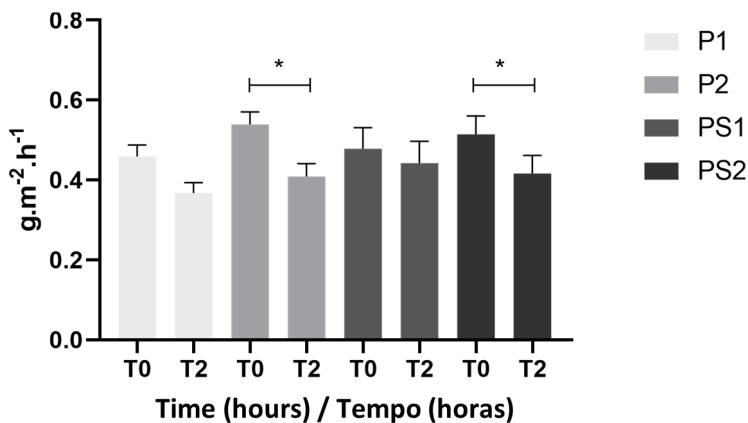


Figure 7 - Skin desquamation (Sesc) on the forearm region right after the application of the formulation (T0) and 2 hours after application (T2). (*) Represents the significant difference compared to the baseline values initially obtained ($p < 0.05$).

Figura 7 - Descamação da pele (Sesc) na região do antebraço logo após aplicação da formulação (T0) e após 2h da aplicação (T2). (*) Representa a diferença significativa em relação aos valores basais obtidos inicialmente ($p < 0,05$).

**Transepidermal water loss /
 Perda transepidermal da água**

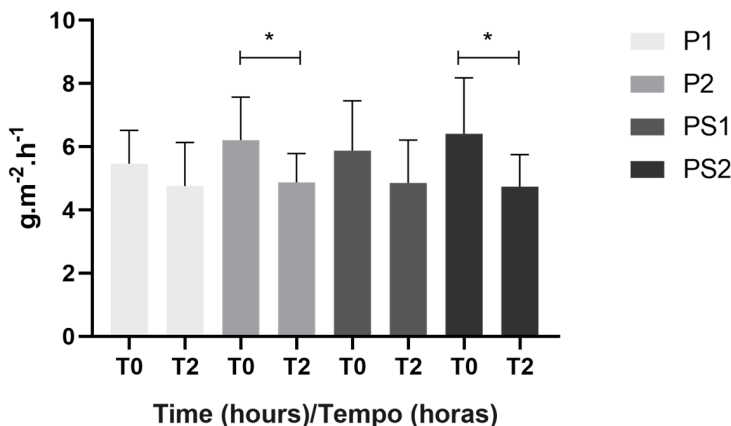


Figure 8 - Transepidermal water loss in the forearm region right after the application of the formulation (T0) and 2 hours after application (T2). (*) Represents the significant difference compared to the baseline values initially obtained ($p < 0.05$).

Figura 8 - Perda transepidermal de água na região do antebraço logo após aplicação da formulação (T0) e após 2h da aplicação (T2). (*) Representa a diferença significativa em relação aos valores basais obtidos inicialmente ($p < 0,05$).

Discussion

The choice for this type of gel-cream formulation occurred based on studies previously developed within our research group (4). Thus, the formulation was based on carbomer (viscosity agent/rheological modifier), EDTA Disodium (chelating agent) and glycerin (wetting agent) and Nikkomulse 41[®] (Nikkol, Japan) was used as emulsifying base. In addition, Naticide[®] (Sinerga, Italy) was used as a natural preservative and butylene glycol as a wetting agent.

In analyzing the data related to rheological behavior, the lower values observed for P2 and PS2 are essential because, for thixotropic fluids, the lower these values, the less the fluids' rheological behavior will depend on time. With this, there is a faster viscosity recovery after applying a shear force (14,28,30). Therefore, it is crucial to observe the rheological behavior of a formulation where the film forming ability is evaluated because film formation significantly influences the preparation's flow properties (28,30).

Thus, the addition of the active substance resulted in a decrease in thixotropy, indicating a rapid recovery of the film structure after the application of a force because the result showed a significant but not extreme decrease, allowing there to be a quick and sufficient recovery of the film structure after the application of force, which may be, for example, interesting after the force applied during a topical administration of the formulation (14,30).

The texture profile analysis was used as an important tool to evaluate the mechanical properties of the formulations to predict their sensory characteristics and also used to correlate the data obtained with those collected during the evaluation performed by the volunteers; once the sensory is a question that directly influences the acceptability of cosmetic preparations (16,31,32). Thus, as there were no significant differences in the values of the shear work and the flow index of the formulations containing the active substances compared to the others, it may be an indication that the addition of the extracts did not compromise the spreadability of the formulation, since both parameters are closely related to this characteristic (16,32).

Discussão

A escolha por este tipo de formulação gel-creme ocorreu com base em estudos anteriormente desenvolvidos no grupo de pesquisa do laboratório (4). Assim, a formulação foi baseada em carbômero (agente de viscosidade/modificador reológico), EDTA Dissódico (agente quelante) e glicerina (agente umectante) e, como base emulsificante, utilizou-se o Nikkomulse 41[®] (Nikkol, Japão). Além disso, utilizou-se o Naticide[®] (Sinerga, Itália) como conservante natural e o butilenoglicol como agente umectante.

Ao analisar os dados referentes ao comportamento reológico, os menores valores observados para P2 e PS2 são importantes, uma vez que para fluidos tixotrópicos, quanto menores esses valores menos o comportamento reológico do fluido dependerá do tempo e, com isso, tem-se uma recuperação de viscosidade mais rápida após a aplicação de uma força de cisalhamento (14,28,30). Assim, é de extrema importância observar o comportamento reológico de uma formulação onde avalia-se a capacidade de formação de filme, visto que a formação deste possui grande influência das propriedades de fluidez da preparação (28,30).

Desta forma, a adição da substância ativa resultou na diminuição da tixotropia, indicando uma rápida recuperação da estrutura do filme após a aplicação de uma força, uma vez que o resultado apresentou uma diminuição significativa, mas não extrema, permitindo que houvesse uma recuperação rápida e suficiente da estrutura do filme após a aplicação da força, que pode ser, por exemplo, interessante após a força aplicada durante a administração tópica da formulação (14,30).

A análise do perfil de textura foi utilizada como uma ferramenta importante para avaliar as propriedades mecânicas das formulações, visando prever suas características sensoriais e, também, usada para correlacionar os dados obtidos com aqueles coletados durante a avaliação realizada pelos voluntários, uma vez que o sensorial é um quesito que influencia diretamente na aceitabilidade de preparações cosméticas (16,31,32). Assim, como não houveram diferenças significativas nos valores do trabalho de cisalhamento e no índice de fluxo das formulações contendo as substâncias ativas em relação às demais, podendo ser um indicativo de que a adição dos extratos não comprometeu a espalhabilidade da formulação, visto que ambos parâmetros estão intimamente relacionados com esta característica (16,32).

In relation to cohesiveness, a parameter related to the ability to form a polymeric structure due to the union of the formulation particles, we can relate it to the tackiness of the preparation (21). Therefore, it is observed that the more cohesive the formulation, the greater will be the tackiness (21). Thus, when these results are analyzed, it is observed that the addition of the active substance caused the cohesiveness to decrease significantly compared to their respective vehicles (P1 and PS1). These results support what was perceived in the sensory analysis for P2 but not for PS2, which was considered sticky after 5 minutes of application.

The sensory analysis was performed with an untrained group. This choice is important because it simulates the consumer's opinion and can evaluate the volunteers' perception of the sensory characteristics of the formulations after application (33). This step was essential to the study because consumers tend not to adhere to the use of cosmetic preparations that do not present a pleasant sensorial, even if they contain appeals considered attractive concerning the formulation (32). In the results observed immediately after application, the formulations showed similar results for the parameters spreadability and softness sensation, with a slightly better result for P2 concerning the smooth touch evaluation.

However, for the evaluation made 5 minutes after the application, it is possible to observe a significant difference in the volunteers' perception of the formulations through the collected results. In the volunteers' perception, P1 and P2 were considered more hydrating and showed better results about perceived stickiness. Thus, reflecting the results, there was a preference of 87.5% of the participants for the formulations containing the natural alternative to the use of synthetic silicones, and of these, 43.75% chose the P2 formulation.

The evaluation of the sensory properties regarding the hydration sensation promoted by the four formulations corroborates the results observed in the immediate clinical study, where all preparations showed an increase in the water content of the stratum corneum two hours after application, which may demonstrate that they all accomplished their hydration role, despite the presence of the extracts (4,5,34). As the sensory analysis performed was qualitative, the perceived hydration is possibly due to the presence of raw materials with hydration and wetting capacity in the vehicles, as is the case of glycerin and butylene glycol (5).

Em relação a coesividade, parâmetro que refere-se à capacidade da formação de uma malha polimérica em decorrência da união das partículas da formulação, podemos relacioná-la à pegajosidade da preparação (21). Desta forma, tem-se que, quanto mais coeso a formulação, maior será sua pegajosidade (21). Logo, ao analisar estes resultados, observa-se que a adição da substância ativa fez com que a coesividade sofresse uma diminuição significativa em relação aos seus respectivos veículos (P1 e PS1). Tais resultados reforçam o que foi percebido na análise sensorial para P2, mas não para PS2, que foi considerada pegajosa após 5 minutos de aplicação.

A análise sensorial foi realizada com painel não treinado, sendo esta escolha importante uma vez que mimetiza a opinião do consumidor e pode avaliar a percepção dos voluntários frente às características sensoriais das formulações após a aplicação (33). A etapa foi imprescindível para o estudo, visto que os consumidores tendem a não aderir ao uso de preparações cosméticas que não apresentem sensorial agradável, ainda que contenham apelos considerados atrativos em relação a formulação (32). Nos resultados observados logo após a aplicação, as formulações apresentaram resultados semelhantes para os parâmetros de espalhabilidade e sensação de suavidade, apresentando um resultado ligeiramente melhor para P2 em relação à avaliação acerca do toque aveludado/acetinado.

Contudo, para a avaliação feita 5 minutos após a aplicação, através dos resultados coletados, é possível observar que houve uma diferença significativa na percepção dos voluntários em relação às formulações. Na percepção dos voluntários, P1 e P2 foram consideradas mais hidratantes e apresentaram resultados melhores em relação à pegajosidade percebida. Assim, refletindo os resultados, houve uma preferência de 87,5% dos participantes pelas formulações contendo a alternativa natural ao uso de silicones sintéticos, sendo que destes, 43,75% escolheram a formulação P2.

A avaliação das propriedades sensoriais referente à sensação de hidratação promovida pelas quatro formulações corrobora com os resultados observados no estudo clínico imediato, onde todas as preparações demonstraram um aumento no conteúdo aquoso do estrato córneo duas horas após a aplicação, o que pode demonstrar que todas elas cumpriram o papel de hidratação, independente da presença dos extratos (4,5,34). Como a análise sensorial realizada foi de caráter qualitativo, possivelmente a hidratação percebida deve-se a presença de matérias-primas com capacidade de hidratação e umectação nos veículos, como é o caso da glicerina e do butilenoglicol (5).

For the evaluation of skin desquamation (Sesc), the lower the values compared to the baseline results the more hydration is imparted to the skin (4). Thus, it is observed that there was a significant decrease in P2 and PS2 values demonstrating that the presence of the active substance resulted in formulations with the ability to provide hydration, improving desquamation (4). In this case, possibly with the addition of the active substance the desired effects about film formation are a consequence of the composition of the emulsion since this appears to interfere directly with the polymeric structure of the carbomer present in the formulation (4).

In relation to the transepidermal water loss, the formulations containing the active substance showed a significant decrease in the results, when compared to the basal values. These results show the ability of the biopolymer to form an efficient film, since the film formed decreases the evaporation of superficial water from the skin, reducing desquamation, protecting against external aggressors, and helping to protect the barrier function of the skin (4,34).

The extracts under study are a polymer obtained commercially through the controlled hydrolysis of sugars (without the use of catalysts or chemical additives), which allows the selection of polysaccharides with well-defined structures. In this process, galactomannans are derived from *Caesalpinia spinosa* and sulfated galactans are from *Kappaphycus alvarezii*. The interpolymerization of these sugars occurs, which will determine the resistance of the film formed. This way, obtaining the active substance presents the technology of forming a network of interpenetrated natural polymers, forming a dense and cohesive mesh with strong biomechanical properties, as described in the technical report from SILAB (France) (4). Thus, the presence of the extracts in the formulation, because of the formation of an efficient film due to the polymeric structure, helped maintain skin integrity as it was effective in reducing desquamation, and improving parameters related to hydration and skin barrier integrity (4,34).

Para a avaliação da descamação da pele (Sesc), quanto menores os valores em relação ao resultados basais maior é a hidratação conferida à pele (4). Assim, observa-se que houve uma diminuição significativa dos valores de P2 e PS2, demonstrando que a presença da substância ativa resultou em formulações com a capacidade de conferir hidratação, melhorando a descamação (4). Neste caso, possivelmente com a adição da substância ativa os efeitos desejados em relação a formação do filme são consequência da composição da emulsão, uma vez que esta aparenta interferir diretamente na estrutura polimérica do carbômero presente na formulação (4).

Em relação a perda transepidérmica de água, as formulações contendo a substância ativa apresentaram diminuição significativa nos resultados, se comparado aos valores basais. Estes resultados mostram a capacidade do biopolímero em formar um filme eficiente, visto que a película formada diminui a evaporação de água superficial da pele, reduzindo a descamação, protegendo contra agressores externos e auxiliando na proteção da função barreira da pele (4,34).

Os extratos em estudo são polímeros obtidos comercialmente através da hidrólise controlada de açúcares (sem a utilização de catalisadores ou aditivos químicos), o que permite a seleção de polissacarídeos com estruturas bem definidas. Neste processo, as galactomananas são derivadas da *Caesalpinia spinosa*, enquanto que as galactanas sulfatadas são provenientes da alga vermelha, *Kappaphycus alvarezii*. Com isso, ocorre a interpolimerização destes açúcares, o que irá determinar a resistência da película formada. Desta forma, a obtenção da substância ativa apresenta a tecnologia de formar uma rede de polímeros naturais interpenetrados, resultando em uma malha densa e coesa com fortes propriedades biomecânicas, tal como descrito no relatório técnico da SILAB (França) (4). Assim, a presença dos extratos em estudo na formulação, em função da formação de um filme eficiente devido à estrutura polimérica, ajudou a manter a integridade cutânea, uma vez que foi eficaz na redução da descamação, e na melhora dos parâmetros relacionados à hidratação e integridade da barreira da pele (4,34).

Conclusion

The formulation added to the red algae extract (*Kappaphycus alvarezii*) and tara (*Caesalpinia spinosa*) showed a reduction in the thixotropy rheological parameter, which is directly related to the rapid recovery of viscosity after shear, a characteristic related to film-forming properties. Furthermore, the analysis of sensorial properties showed that there are no differences between synthetic silicones and hemisqualane, which allows the use of hemisqualane as a more sustainable alternative to provide adequate sensorial properties to cosmetic formulations.

Therefore, the addition of the extract to the formulation promoted increased hydration and decreased skin desquamation and transepidermal water loss within 2 hours of application. Finally, the tara and red algae extract showed properties that correspond to the film-forming, which added benefits to the formulation such as improving the barrier function of the skin and may promote a protective effect against external damage to the skin.

Acknowledgments

The author would like to thank the study group NEACTEC (Núcleo de Estudos Avançados em Tecnologia de Cosméticos), FCFRP (School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo) and the participants of clinical study.

Authors Contribution Statement

BP was responsible for the experimental part, collection and analysis of data and writing the article; LK was responsible for the experimental part, collection and evaluation of results and review of the writing; PMC coordinated the study, including the conceptual design, supervision, and was responsible for the final revision of the article.

Conflicts of interest

The Editor involved in the authorship of this manuscript had no participation in the review or decision process. The authors declare that they have no financial and/or personal relationships that could represent any potential conflict of interest.

Conclusão

A formulação acrescida do extrato da alga vermelha (*Kappaphycus alvarezii*) e da Tara (*Caesalpinia spinosa*) apresentou redução no parâmetro reológico tixotropia, o que está diretamente relacionado com a rápida recuperação da viscosidade após o cisalhamento, característica relacionada com as propriedades filmógenas. Além disso, a análise das propriedades sensoriais mostrou que não há diferenças entre os silicones sintéticos e o hemiesqualano, o que possibilita o uso desse último como uma alternativa mais sustentável para conferir propriedades sensoriais adequadas às formulações cosméticas.

Dessa forma, a adição do extrato em estudo à formulação promoveu o aumento da hidratação e diminuição da descamação da pele e da perda transepidermica de água após duas horas da aplicação. Por fim, o extrato de Tara e da alga vermelha apresentou propriedades que correspondem à formação de filme, o que agregou benefícios à formulação como a melhora da função barreira da pele, podendo promover um efeito protetor contra danos externos à pele.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao grupo de estudos NEATEC (Núcleo de Estudos Avançados em Tecnologia de Cosméticos), à FCFRP (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto) e aos participantes do estudo clínico.

Contribuição dos autores

BP foi responsável pela parte experimental, coleta e análise dos dados, além da redação do artigo; LK foi responsável pela parte experimental, coleta e avaliação dos resultados, além de revisão da redação; PMC coordenou o estudo, incluindo o desenho conceptual, supervisionou e foi responsável pela revisão final do artigo.

Conflito de interesses

A Editora presente na autoria deste manuscrito não participou nos processos de pessoais revisão e/ou decisão. As autoras declaram não existir relações financeiras e/ou pessoais que possam representar qualquer conflito de interesse em potencial.

References / Referências

- Infante, Victor & Melo, Maisa & Campos, Patricia. (2018). The social and scientific evolution of the cosmetic science – a brasileiro view: A evolução social e científica da ciência cosmética – uma visão brasileira. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 15, 84-95. 10.19277/bbr.15.1.177.
- Choi, Y. H., Kim, S. E., & Lee, K. H. (2022). Changes in consumers' awareness and interest in cosmetic products during the pandemic. *Fashion and Textiles*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40691-021-00271-8>
- Isnard, M. D., Costa, G. M. D., & Maia Campos, P. M. B. G. (2019). Development of hair care formulations based on natural ingredients. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 6(1), 9–9. <https://doi.org/10.15171/ijpni.2019.09>
- Melo, M. O., & Maia Campos, P. M. B. G. (2019). Application of biophysical and skin imaging techniques to evaluate the film-forming effect of cosmetic formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 41(6), 579–584. <https://doi.org/10.1111/ics.12577>
- Jachowicz, J., McMullen, R., & Prettypaul, D. (2008). Alteration of skin mechanics by thin polymer films. *Skin Research and Technology*, 14(3), 312–319. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2008.00296.x>
- Kathe, K., & Kathalia, H. (2017). Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(6), 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.07.004>
- Bom, S., Jorge, J., Ribeiro, H. M., & Marto, J. (2019). A step forward on sustainability in the cosmetics industry: A review. *Journal of Cleaner Production*, 225, 270–290. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.03.255>
- Moraes, C. A. P. (2012). Síntese e avaliação da segurança in vitro da rutina e do succinato de rutina visando sua incorporação em formulações fotoprotetoras eficazes associados a filtros químicos e físico. *Doctoral Thesis, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo*. doi:10.11606/T.9.2012.tde-07032013-092315. Retrieved 2022-09-11, from www.teses.usp.br
- Montiel, M. C., Máximo, F., Serrano-Arnaldos, M., Ortega-Requena, S., Murcia, M. D., & Bastida, J. (2019). Biocatalytic solutions to cyclomethicones problem in cosmetics. *Engineering in Life Sciences*, 19(5), 370–388. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800194>
- Lassen, C., Hansen, C., Hagen, S., & Maag, J. (n.d.). Siloxanes -Consumption, Toxicity and Alternatives. *Danish Ministry of the environment (Environmental Protection Agency)*, from: <https://www2.mst.dk/udgiv/publications/2005/87-7614-756-8/pdf/87-7614-757-6.pdf>
- Fossa Shirata, M. M., & Maia Campos, P. M. B. G. (2017). Influence of UV filters on the texture profile and efficacy of a cosmetic formulation. *International journal of cosmetic science*, 39(6), 622–628. <https://doi.org/10.1111/ics.12424>
- Green, M., Kashetsky, N., Feschuk, A., & Maibach, H. I. (2022). Transepidermal water loss (TEWL): Environment and pollution-A systematic review. *Skin Health and Disease*. <https://doi.org/10.1002/ski2.104>
- Maia Campos, P. M. B. G., Goncalves, G. M. S., & Gaspar, L. R. (2008). In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy of topical formulations containing vitamin C and its derivatives studied by non-invasive methods. *Skin Research and Technology*, 14(3), 376–380. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2008.00288.x>
- Gaspar, L. R., & Maia Campos, P. M. B. G. (2003). Rheological behavior and the SPF of sunscreens. *International Journal of Pharmaceutics*, 250(1), 35–44. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00462-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00462-3)
- DAVIS, H.M. (1977) Analysis of creams and lotions. In: SENZEL, A.J. (Ed.). *Newburger's manual of cosmetic analysis* (chap.4, p.32). Washington: Association of official analytical chemists.
- Calixto, L. S., & Maia Campos, P. M. B. G. (2017). Physical-Mechanical characterization of cosmetic formulations and correlation between instrumental measurements and sensorial properties. *International Journal of Cosmetic Science*, 39(5), 527–534. <https://doi.org/10.1111/ics.12406>
- Felippim, E. C., Marcato, P. D., & Maia Campos, P. M. B. G. (2020). Development of Photoprotective Formulations Containing Nanostructured Lipid Carriers: Sun Protection Factor, Physical-Mechanical and Sensorial Properties. *AAPS PharmSciTech*, 21(8). <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01858-y>
- Infante, V. H. P., Maia Campos, P. M. B. G., Calixto, L. S., Darwin, M. E., Kröger, M., Schanzer, S., Lohan, S. B., Lademann, J., & Meinke, M. C. (2021). Influence of physical–mechanical properties on SPF in sunscreen formulations on ex vivo and in vivo skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 598, 120262. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120262>
- Gilbert, L., Picard, C., Savary, G., & Grisel, M. (2013). Rheological and textural characterization of cosmetic emulsions containing natural and synthetic polymers: relationships between both data. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 421, 150–163. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.01.003>
- Shirata, M. M. F., & Maia Campos, P. M. B. G. (2016). Importância do perfil de textura e sensorial no desenvolvimento de formulações cosméticas. *Surg. Cosmet. Dermatol. (Impr.)*, 223–230. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-875033?lang=fr>
- Tai, A., Bianchini, R., & Jachowicz, J. (2014). Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 36(4), 291–304. <https://doi.org/10.1111/ics.12125>
- Marcon, Ana & Wagemaker, Tais & Campos, Patricia. (2014). Rheology: clinical efficacy and sensorial of a silicone-based formulation containing pearl extract. *Biomed. Biopharm. Res.* 2, 247-255. 10.19277/bbr.11.2.96.
- Dal'Bel, S. E., Rigo Gaspar, L., & Berardo Gonçalves Maia Campos, P. M. (2006). Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. *Skin Research and Technology*, 12(4), 241–246. <https://doi.org/10.1111/j.0909-752x.2006.00155.x>
- Levy, J. L., Trelles, M., Servant, J., & Agopian, L. (2004). Non-ablative skin remodeling: an 8-month clinical and 3D in vivo profilometric study with an 810nm diode laser. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 6(1), 11–15. <https://doi.org/10.1080/14764170410030750>
- Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H., & Finkel, P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International Journal of Cosmetic Science*, 28(5), 359–370. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x>
- Maia Campos, P. M. B. G., Gianeti, M. D., Camargo, F. B., & Gaspar, L. R. (2012). Application of tetra-isopalmitoyl ascorbic acid in cosmetic formulations: Stability studies and in vivo efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(3), 580–586. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.08.009>
- Andrade, J. P., L. Wagemaker, T. A., Mercurio, D. G., & B. G. Maia Campos, P. M. (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. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 15(2), 214–223. <https://doi.org/10.19277/bbr.15.2.188>
- Oliveira, G. G. (2018). Reologia de fluidos não newtonianos à base de carboximetilcelulose (cmc). *Universidade Federal De Uberlândia Faculdade De Engenharia Química*, from: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/26860/3/ReologiaFluidosN%C3%A3o.pdf>
- Calixto, L. S. (2019). Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo ativos de origem natural: avaliação das propriedades físico-mecânicas, sensoriais e eficácia clínica. *Doctoral Thesis, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto*. doi:10.11606/T.60.2020.tde-19122019-091833. Retrieved 2022-09-13, from www.teses.usp.br
- Said dos Santos, R., Rosseto, H. C., Bassi da Silva, J., Vecchi, C. F., Caetano, W., & Bruschi, M. L. (2020). The effect of carbomer 934P and different vegetable oils on physical stability, mechanical and rheological properties of emulsion-based systems containing propolis. *Journal of Molecular Liquids*, 307(112969), 112969. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112969>
- Gilbert, L., Picard, C., Savary, G., & Grisel, M. (2013). Rheological and textural characterization of cosmetic emulsions containing natural and synthetic polymers: relationships between both data. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 421, 150–163. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.01.003>
- Calixto, L. S., Infante, V. H. P., & Maia Campos, P. M. B. G. (2018). Design and Characterization of Topical Formulations: Correlations Between Instrumental and Sensorial Measurements. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), 1512–1519. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0960-0>
- Parente, M. E., Ares, G., & Manzoni, A. V. (2010). Application of two consumer profiling techniques to cosmetic emulsions. *Journal of Sensory Studies*, 25(5), 685-705.
- Nisbet, S., Mahalingam, H., Gfeller, C. F., Biggs, E., Lucas, S., Thompson, M., Cargill, M. R., Moore, D., & Bielfeldt, S. (2019). Cosmetic benefit of a biomimetic lamellar cream formulation on barrier function or the appearance of fine lines and wrinkles in randomized proof-of-concept clinical studies. *International Journal of Cosmetic Science*, 41(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/ics.12499>

Oral intake of Bioactive Collagen Peptides in the improvement of skin and hair: clinical studies by instrumental measurements

*Ingestão oral de Peptídeos Bioativos de Colágeno na Melhoria da Pele e Cabelo:
Estudos Clínicos por Medidas Instrumentais*

Patricia M. B. G. Maia Campos*, Maísa Oliveira de Melo,
Marina Mendes Fossa Shirata, Marcella Gabarra Leite

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

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

Abstract

The effect of collagen peptides on various aspects of skin and hair physiology is known but needs further studies. Thus, the objective of this study was to evaluate the clinical changes in skin and hair after 90 days of treatment with oral supplementation of 5 g/day of collagen peptides. For this, 60 healthy female participants were enrolled, aged 45 to 60 years old, with the primary objective of evaluating the effect of the ingestion of a bioactive collagen peptides-based supplementation in the cutaneous microrelief, reduction of wrinkles, thickness, and echogenicity of the dermis, as well as in the mechanical properties of the hair using biophysical and skin imaging techniques. The present study showed important benefits in relevant skin visual parameters, dermis density, and hair strength with the obtained data. In addition, considering that the aging process affects the hair's mechanical resistance due to hair fiber thinner, the proposed treatment was effective for aged hair. In conclusion, the collagen peptides oral supplementation is essential not only for improving skin conditions but also for hair care once it significantly increases the mechanical hair resistance evaluated by objective measurements.

Keywords: Collagen peptides, skin aging, skin imaging techniques, hair mechanical properties, clinical study

Resumo

O efeito do uso de peptídeos de colágeno em vários aspectos da fisiologia da pele e do cabelo é conhecido, porém necessita de mais estudos. Dessa forma, o objetivo deste artigo foi avaliar as alterações clínicas na pele e cabelos após 90 dias de tratamento com suplementação oral de 5 g/dia de peptídeos de colágeno. Para isso, foram inscritas 60 participantes saudáveis do sexo feminino, com idades entre 45 e 60 anos, com o objetivo principal de avaliar o efeito da ingestão de uma suplementação à base de peptídeos de colágeno bioativos no microrrelevo cutâneo, redução de rugas, espessura e ecogenicidade da derme, bem como nas propriedades mecânicas do cabelo usando técnicas biofísicas e de imagem da pele. O presente estudo mostrou benefícios importantes em parâmetros relevantes da pele, densidade da derme e resistência do cabelo. Em conclusão, a suplementação oral com peptídeos de colágeno é importante não só para a melhora das condições da pele, mas também para o cuidado do cabelo, uma vez que aumenta significativamente a resistência mecânica do cabelo. Além disso, considerando que processo de envelhecimento afeta a resistência mecânica do cabelo devido ao afinamento da fibra capilar, o tratamento proposto foi eficaz para cabelos envelhecidos.

Palavras-chave: Peptídeos de colágeno, envelhecimento da pele, técnicas de imagem da pele, propriedades mecânicas do cabelo, estudo clínico

Introduction

To be considered a healthy individual, a few different parameters are analyzed, such as physical exercises, sleep habits, presence of addictions, and others, but one of the best-known facts regarding this subject is that overall health is closely associated with nutritional habits. A balanced diet, comprising all necessary macro- and micronutrients, is vital for preventing a myriad of diseases. This is especially true for health problems that are associated with aging, such as cardiovascular disease. In this context, the skin is the first and most apparent indicator to reflect an individual's health. Smooth, clean, and young-looking skin is perceived as a desirable attribute, so treating the signs of skin aging is an important concern for many and can be a key motivation for a healthy diet. Many micronutrients, such as Vitamin C, E, biotin, and zinc, have been associated with direct benefits for skin physiology and are used as ingredients for dietary supplements with the aim of reducing signs of skin aging (1,2).

During the aging process, the skin becomes less hydrated, losing its elasticity and firmness, along with increased pigmentation, pore size, and other structural changes in the dermis and epidermis. Furthermore, the collagen network in the dermis that provides strength and firmness to the skin becomes thinner and more fragmented (3). An increase in matrix metalloproteinase (MMP) expression accounts for accelerated collagen degradation (1,3). With a less dense and more fragmented network of collagen fibers, the embedded fibroblasts receive fewer mechanical stimuli, a key trigger for their metabolic activity. In addition, the synthesis of new extracellular matrix components from fibroblasts inherently slows down with age. Both processes prevent the degraded matrix from being adequately replaced (4). The elastic fibers of the papillary dermis lose integrity during aging and reach less far into the dermal-epidermal junction. This overall loss in elasticity, hydration, and strength leads to visual characteristics such as sagging and wrinkle formation (1,3).

Introdução

Para ser considerado um indivíduo saudável, alguns diferentes parâmetros são analisados, como realização de exercícios físicos, hábitos de sono, presença de vícios e outros, mas um dos fatos mais conhecidos nesse assunto é que a saúde geral está intimamente associada aos hábitos nutricionais. Uma dieta balanceada, composta por todos os macro e micronutrientes necessários, é fundamental para a prevenção de inúmeras doenças. Isto é especialmente relevante para problemas de saúde associados ao envelhecimento, como, por exemplo, doenças cardiovasculares. Nesse contexto, a pele é o primeiro e mais aparente indicador que irá refletir a saúde de uma pessoa. Uma pele lisa, macia e com aparência jovem é vista como desejável, portanto, o tratamento dos sinais de envelhecimento da pele é uma preocupação importante para muitos e pode ser uma motivação relevante para uma seguir uma alimentação saudável. Muitos micronutrientes, como vitamina C, E, biotina e zinco, têm sido associados a benefícios diretos para a fisiologia da pele e também são utilizados como ingredientes para suplementação alimentar com o objetivo de reduzir os sinais de envelhecimento cutâneo (1,2).

Durante o processo de envelhecimento, a pele fica menos hidratada, perdendo sua elasticidade e firmeza, juntamente com um aumento da pigmentação, tamanho dos poros e outras alterações estruturais na derme e na epiderme. Além disso, a rede de colágeno presente na derme que dá força e firmeza à pele torna-se mais fina e fragmentada (3). Além disso, um aumento na expressão de metaloproteinase de matriz (MMP) é responsável pela degradação acelerada do colágeno (1,3) e com uma rede de fibras colágenas menos densa e mais fragmentada, os fibroblastos incorporados recebem menos estímulos mecânicos, um fator chave para sua atividade metabólica. Assim, a síntese de novos componentes da matriz extracelular a partir de fibroblastos diminui inerentemente com a idade. Ambos os processos impedem que a matriz degradada seja adequadamente substituída (4). Também é importante citar que as fibras elásticas da derme papilar perdem a integridade durante o envelhecimento e atingem menos a junção dermo-epidérmica. Essa perda geral de elasticidade, hidratação e resistência leva a características visuais, como flacidez e formação de rugas (1,3).

Targeted enzymatic hydrolysis of collagen produces a natural combination of peptides with a defined mean molecular weight that carries bioactivity in supporting different biological processes that contribute to a healthy aging process. Collagen is the most abundant protein in the body, present in the extracellular matrix of all connective tissues. Thus, evidence at the preclinical and clinical levels is building up for hydrolyzed collagens to support the maintenance of the musculoskeletal system, including bones, ligaments, tendons, and joints. Collagen has a unique amino acid composition with a specifically high abundance of glycine, proline, and hydroxyproline. Upon ingestion, hydrolyzed collagen is digested into free amino acids and di- and tripeptides resistant to further hydrolysis by intracellular or serum peptidases (5). These peptides are transported across the intestinal barrier by a designated transporter, PEPT-1 (6). Hydroxyproline-containing peptides derived from hydrolyzed collagen ingestion have been identified in human serum with a peak of absorption one hour after the ingestion (7). A topic still under discussion is whether peptides longer than two or three amino acids can pass the intestinal barrier. Studies with radioactively labeled collagen-derived peptides demonstrated the efficient transport and uptake into target tissues, such as bone, cartilage, muscle, and skin (8). Astonishingly, these peptides could be detected in the skin up to 14 days after administration (9).

Hydrolyzed collagen can be extracted from different sources and tissues. Bovine collagen can be extracted from the bovine Achilles tendon using different enzymes such as alcalde, pepsin, trypsin, and collagenase produced by *Penicillium aurantiogriseum*. It is known for having antihypertensive, antioxidant, and antimicrobial activity. When obtained from bovine lung, it has antioxidant and anti-inflammatory activity. Finally, hydrolyzed collagen from the nuchal ligament of bovine can be used as a promising precursor of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides (10).

Collagen obtained from porcine skin is also produced and shows antioxidant, anti-aging, and skin permeation properties.

However, these two collagen sources have some limitations due to health problems such as swine flu and bovine spongiform encephalopathy. Furthermore, religious issues should also be considered. Thus, alternative sources from marine sources have been

A hidrólise enzimática direcionada do colágeno produz uma combinação natural de peptídeos com um peso molecular médio definido que carregam bioatividade no suporte a diferentes processos biológicos que contribuem para um processo de envelhecimento saudável. O colágeno é a proteína mais abundante no organismo, presente na matriz extracelular de todos os tecidos conjuntivos. Assim, evidências em nível pré-clínico e clínico da eficácia de colágenos hidrolisados para a manutenção do sistema musculoesquelético, incluindo ossos, ligamentos, tendões e articulações estão aparecendo cada vez mais na literatura científica. Além disso, o colágeno tem uma composição única de aminoácidos com uma abundância especificamente alta de glicina, prolina e hidroxiprolina. Após a ingestão, o colágeno hidrolisado é digerido em aminoácidos livres, bem como em di- e tripeptídeos que são resistentes a hidrólise adicional por peptidases intracelulares ou séricas (5). Estes peptídeos são transportados através da barreira intestinal por um transportador designado, o PEPT-1 (6). Peptídeos contendo hidroxiprolina que derivam da ingestão de colágeno hidrolisado foram identificados no soro humano com um pico de absorção em uma hora após a ingestão (7). Um tópico ainda em discussão é se peptídeos com mais de dois ou três aminoácidos são capazes de atravessar a barreira intestinal. Estudos com peptídeos derivados de colágeno marcados radioativamente demonstraram que há o transporte e absorção eficientes em tecidos-alvo, como osso, cartilagem, músculo e pele (8). Surpreendentemente, na pele a substância pôde ser detectada por até 14 dias após a administração (9).

O colágeno hidrolisado pode ser extraído de diferentes fontes e tecidos. O colágeno bovino pode ser extraído do tendão de Aquiles bovino pelo uso de diferentes enzimas como alcalde, pepsina, tripsina e collagenase produzidas por *Penicillium aurantiogriseum*. É conhecido por ter atividade anti-hipertensiva, antioxidante e antimicrobiana. Quando obtido do pulmão bovino, possui atividade antioxidante e anti-inflamatória. Finalmente, o colágeno hidrolisado do ligamento nuchal de bovinos pode ser usado como um precursor promissor dos peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina I (ECA)(10).

O colágeno obtido pela pele suína é também produzido e apresenta propriedades antioxidantes, antienvelhecimento e de permeação cutânea.

Por outro lado, essas duas fontes têm algumas limitações devido a problemas de saúde como a gripe suína e a encefalopatia espongiforme bovina. Além disso, questões religiosas também devem ser

developed, especially from fish and other invertebrates such as jellyfish or sponges. They present nutraceutical effects due to their functional bioactive properties. In some cases, antioxidant and antimicrobial activity are also present (10).

The effect of hydrolyzed collagen on various aspects of skin physiology has been investigated in preclinical studies. Oral supplementation with hydrolyzed collagen inhibited the loss and the fragmentation of collagen by aging in rats, in part by inducing the expression of type I and type III collagen, as well as inhibiting MMP expression and activity (1,3). In pigs, hydrolyzed collagen intake increased collagen fibrils' density and diameter (11). Similar effects on the stimulation of collagen synthesis were observed in cultured fibroblasts isolated from UV-exposed body areas (12). UV-induced damage to the skin was hampered in mice by inhibiting inflammatory pathways (13). Further, at a cellular level, hydrolyzed collagen has been shown to promote skin fibroblasts' growth and induce fibroblast migration (7).

Several clinical studies using various designs have shown that hydrolyzed collagens effectively improve skin aging parameters. In this line, oral supplementation with hydrolyzed collagen has been reported to improve skin hydration (14-17), elasticity (14,17,18), and dermal collagen density (1,16). In addition, a randomized, controlled trial showed that hydrolyzed collagen supplementation reduced the fragmentation of the collagen network in the dermis, a key denominator of aging, indicating that the collagen network's quality was improved (17,19).

Previous studies from our research group have recently investigated the efficacy of a formulation containing 10 g of bovine collagen peptides, Vitamins A, C, E, and zinc in a Brazilian population (1). Daily supplementation over a period of 90 days demonstrated the improvement of dermal collagen density, skin elasticity, and a reduction of wrinkles and pores.

Furthermore, considering that about 65 to 95% of the hair composition is of proteins, oral supplementation with Bioactive Collagen peptides can also be used to provide benefits to hair fiber. With the aging process, there is a reduction in the quality of the collagen fibers,

consideradas. Desta forma, foram desenvolvidas fontes alternativas de fontes marinhas, especialmente de peixes e outros invertebrados como águas-vivas ou esponjas. Apresentam efeitos nutracêuticos devido às suas propriedades bioativas funcionais. Em alguns casos, atividade antioxidante e antimicrobiana também estão presentes (10).

Em estudos pré-clínicos, o efeito do colágeno hidrolisado em vários aspectos da fisiologia da pele tem sido investigado. Nestes estudos, foi notado que a suplementação oral com colágeno hidrolisado inibiu a perda e a fragmentação de colágeno pelo envelhecimento em ratos, em parte por induzir a expressão de colágeno tipo I e tipo III, além de inibir a expressão e atividade de MMP (1,3). Em suínos, a ingestão de colágeno hidrolisado resultou em um aumento da densidade e do diâmetro das fibrilas de colágeno (11). Efeitos semelhantes na estimulação da síntese de colágeno foram observados em fibroblastos cultivados de áreas isoladas do corpo expostas a radiação UV (12). Os danos à pele induzidos por raios UV foram também observados em camundongos pela inibição das vias inflamatórias (13). Além disso, a nível celular, o colágeno hidrolisado demonstrou promover o crescimento de fibroblastos da pele e induzir a migração dos mesmos (7).

Vários estudos clínicos usando diferentes modelos mostraram que os colágenos hidrolisados são eficazes para melhorar os parâmetros de envelhecimento da pele. Nesse contexto, a suplementação oral com colágeno hidrolisado tem sido relatada para melhorar a hidratação da pele (14-17), elasticidade (14,17,18) e densidade do colágeno dérmico (1,16). Além disso, um estudo randomizado e controlado mostrou que a suplementação de colágeno hidrolisado reduziu a fragmentação da rede de colágeno na derme, que é um denominador chave do envelhecimento, indicando também que a qualidade da rede de colágeno foi melhorada (17,19).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa investigaram a eficácia de uma formulação contendo 10g de peptídeos de colágeno bovino, Vitaminas A, C, E e zinco em uma população brasileira (1). Neste, a suplementação diária por um período de 90 dias demonstrou a melhora da densidade do colágeno dérmico, elasticidade da pele e redução de rugas e poros.

Além disso, considerando que cerca de 65 a 95% da composição do cabelo é de proteínas, a suplementação oral com peptídeos Bioativos de Colágeno também pode ser utilizada para proporcionar benefícios à fibra capilar.

which is noticed mainly in the skin appearance. The aging process also presents an effect on the hair which can be observed as a reduction in hair diameter, which can promote the weakening of the hair fiber (20,21). This is reflected primarily as a decrease of the hair break force with the aging process and a decrease in shiny hair appearance (21). Thus, the use of collagen peptides can be used as a support to improve the quality of the skin and its appendices.

Oral supplements have been a trend in the cosmetic field to repair skin and hair appearance and structure. Thus, several studies have reported that using collagen supplementation can improve skin functions and delay aging (22). Collagen supplementation has also been reported to positively influence the nails (23). At the same time, there are no reports in the scientific literature regarding the benefits of using collagen to the hair fiber, although this product has already been used for this purpose.

The current scope of clinical research has been predominantly performed in Caucasian (European) (16,18) and Asian (Japanese) (14-17) populations. However, skin aging differs across skin types, and in addition to ethnicity, regional impacts such as the climate can be key factors that determine how the skin ages (24). The alterations in the hair fiber also differ according to ethnicity and hair type, e.g., it has been reported that curly hair presents more fragility to hair breakage than other hair types (21). Thus, the clinical investigation of the benefits of Bioactive Collagen peptides supplementation in the Brazilian population, which presents excellent diversity in its ethnicity, is a significant contribution to the scientific field.

In addition, all previously investigated products were of fish or porcine but not of bovine origin. The bovine hide is one of the most important sources of raw material to produce collagen in Brazil due to the country's huge cattle herd, making this type of product more available for Brazilian and South American women than other sources. This way, the present study has an innovative proposal, investigating the efficacy of bovine collagen peptides without the addition of different components and with a lower dose, 5 g/day, not previously studied from the bovine source, and focusing primarily on dose-dependent dermal collagen density results, wrinkles, skin roughness, and hair strength. This final parameter has not been previously evaluated in a study using collagen peptides.

Com o processo de envelhecimento há uma redução na qualidade das fibras de colágeno, o que é notado principalmente na aparência da pele, mas o processo de envelhecimento também apresenta efeito no cabelo, podendo ser observado uma redução no diâmetro do cabelo que pode promover, o enfraquecimento da fibra capilar (20,21). Isso se reflete principalmente na diminuição da força de quebra do cabelo com o processo de envelhecimento e diminuição do brilho do cabelo (21). Assim, o uso de peptídeos de colágeno pode ser usado como suporte para melhorar a qualidade da pele e seus anexos.

O uso de suplementos orais tem sido uma forte tendência na área cosmética para reparar a aparência e a estrutura da pele e do cabelo. Assim, vários estudos relataram que o uso de suplementação de colágeno pode melhorar as funções da pele e retardar o processo de envelhecimento (22). Também foi relatado que o uso de suplementação de colágeno pode ser uma influência positiva nas unhas (23). Ao mesmo tempo não há registro na literatura científica relatando os benefícios do uso do colágeno na fibra capilar, embora este produto já tenha sido utilizado para esta finalidade.

O atual corpo de pesquisa clínica tem sido predominantemente realizado em caucasianos (europeus) (16,18) e asiático (japonês) (14-17). No entanto, o envelhecimento da pele difere entre os tipos de pele e, além da etnia, impactos regionais como o clima podem ser fatores-chave para determinar como a pele envelhece (24). As alterações na fibra capilar também diferem de acordo com sua etnia e tipo de cabelo, sendo relatado que o cabelo crespo se apresenta mais frágil à quebra do que outros tipos de cabelo (21). Assim, a investigação clínica dos benefícios que a suplementação com peptídeos bioativos de colágeno na população brasileira, que apresenta grande diversidade em sua etnia, é uma grande contribuição para o campo científico.

Além disso, estudos anteriores trabalharam com colágeno de origem de peixe ou suíno, mas não de origem bovina. O couro bovino é uma das mais importantes fontes de matéria-prima para a produção de colágeno no Brasil devido ao enorme rebanho bovino no país, tornando este tipo de produto mais disponível para mulheres brasileiras e sul-americanas do que outras fontes. Desta forma, o presente estudo tem uma proposta inovadora, investigando a eficácia de peptídeos de colágeno bovino sem adição de outros componentes e com menor dose, 5 g/dia, nunca antes estudado para a versão bovina, focando principalmente nos resultados de densidade de colágeno dérmico dose-

In this context, the objective of this study was to evaluate the clinical changes in skin and hair after 90 days of treatment with oral supplementation of bioactive collagen peptides. In summary, this study has an innovative proposal since it shows the clinical efficacy of collagen peptides oral supplementation in improving skin and hair in a non-invasive way.

Materials and Methods

After the approval by the Ethics Committee in Clinical Research of the School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto/SP (CEP / FCFRP nº439 - CAAE nº 65109317.2.0000.5403), 60 healthy female participants were enrolled, aged 45 to 60 years old (mean age 53.4 ± 4.2 years old), level 3 of the Glogau Scale and Fitzpatrick phototype scale II-III. Most study participants had a small to medium percentage of white hair but used coloring procedures. The main objective was to evaluate the effect of the ingestion of a collagen-based supplementation in the cutaneous microrelief, reduction of wrinkles and thickness, and echogenicity of the dermis, as well as in the mechanical properties of the hair using biophysical and skin imaging techniques.

The study products were maltodextrin for the placebo group and bovine collagen peptides (Peptan® B, Rousselot, Amparo, Brazil) for the treatment group. The study period was 90 days, with three evaluations; one was before (baseline-T0) and the other after 45 and 90 days of treatment. Participants signed the Informed Consent Term before accepting participation in the study after a meeting to elucidate and clarify possible questions of the interested participants. All participants also received the same sunscreen (SPF 60) to use and avoid changes caused by using different products. All participants were also requested to stop using other cosmetic products for 15 days before the start of the study and during the whole treatment.

After assessing the inclusion and exclusion criteria, accepting to participate in the study, and signing the informed consent, the participants were divided into two groups: the placebo group, who ingested 5 g / day of a

dependente, rugas, pele rugosidade e força do cabelo. Este último parâmetro nunca foi avaliado antes em um estudo com peptídeos de colágeno.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações clínicas na pele e cabelos após 90 dias de tratamento com suplementação oral de peptídeos bioativos de colágeno. Em resumo, este estudo tem uma proposta inovadora, pois mostra a eficácia clínica da suplementação oral de peptídeos de colágeno na melhora da pele e cabelos de forma não invasiva.

Material e Métodos

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/SP (CEP/FCFRP nº439 - CAAE nº 65109317.2.0000.5403) foram inscritas 60 participantes saudáveis do sexo feminino, com idades entre 45 e 60 anos, (média de idade $53,4 \pm 4,2$ anos), nível 3 da escala de Glogau e fototipos de Fitzpatrick II-III. A maioria dos participantes do estudo tinha uma porcentagem pequena a média de cabelos brancos, mas usavam procedimentos de coloração. sendo os principais objetivos avaliar o efeito da ingestão de uma suplementação à base de colágeno no microrrelevo cutâneo, redução de rugas e espessura e ecogenicidade da derme, bem como nas propriedades mecânicas do cabelo.

Os produtos do estudo eram compostos de maltodextrina para o grupo placebo e peptídeos de colágeno bovino (Peptan® B, Rousselot, Amparo, Brasil) para o grupo de tratamento. O período de estudo foi de 90 dias, com 3 avaliações; uma feita antes do tratamento (T0) e os demais após 45 e 90 dias de uso dos produtos. As participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de aceitarem a participação no estudo, o que foi feito após uma reunião para elucidar e esclarecer possíveis dúvidas das participantes interessadas. Além disso, todas as participantes receberam o mesmo protetor solar (FPS 60) para usar e evitar alterações causadas pelo uso de produtos diferentes. Todos os participantes também foram solicitados a parar de usar outros produtos cosméticos por 15 dias antes do início do estudo e durante todo o tratamento.

Após avaliar os critérios de inclusão e exclusão, aceitar participar do estudo e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, as participantes foram divididas em dois grupos: grupo placebo, que ingeriu 5 g/dia de um

maltodextrin-based food, and the treatment group, who consumed 5 g / day of the oral supplementation under study. A template was standardized by the research group to ensure that the same area was analyzed after 90 days of treatment.

Hair samples of the participants of the study were collected before the beginning of the treatment (T0) and at the end (T90) to perform the characterization test. The samples were collected as close as possible to the root to evaluate the region of growth of the hair, where the alterations would be more evident. The control sample (without any treatment, T90) was kept to evaluate the hair compared to those that received the treatment after 90 days.

Biophysical and skin imaging techniques

Skin microrelief

The SELS (Surface Evaluation of the Living Skin) method is based on a graphic created of the living skin picture under special illumination. The microrelief parameters were evaluated using Visioscan® VC98 and software SELS 2000 from Courage & Khazaka Electronic GmbH (Cologne, Germany). The measurement area was $6 \times 8 \text{ mm}^2$ and the skin image was taken by a built-in CCD camera. The electronic processing and evaluation of this image were conducted according to four clinical parameters: a) Skin Smoothness (Sesm) - calculated from the average width and depth of wrinkles, b) Skin roughness (Ser) - the skin roughness parameter, calculated by the gray levels above the threshold in comparison with the entire image (reflects the 'asperity' of the skin.), c) Wrinkles (Sew) - calculated from the proportion of horizontal and vertical wrinkles and d) Wrinkle depth (Rt) (24). All measurements were made in the malar region of the face.

Measurement of the skin by high-resolution photography

The Visioface® digital photography imaging system (Courage and Khazaka, Germany) was utilized to evaluate facial skin. It consists of a cabin attached to a high-resolution digital camera (10 megapixels) and 200 white LED lights. This device is connected to research software that evaluates visible pores and wrinkles (1). The wrinkle analysis was evaluated on a 5 point scale in both the nasolabial and periorbital regions.

alimento à base de maltodextrina e o grupo tratamento que ingeriu 5 g / dia da suplementação oral em estudo. Além disso, um molde padronizado pelo grupo de pesquisa para garantir que a mesma área fosse analisada após 90 dias de tratamento.

Amostras de cabelo dos participantes do estudo foram coletadas antes do início do tratamento (T0) e ao final (T90), para realização do teste de caracterização. As amostras foram coletadas o mais próximo possível da raiz, para avaliar a região de crescimento do cabelo, onde as alterações seriam mais evidentes. A amostra controle (sem nenhum tratamento, T90) foi mantida para avaliar o cabelo em comparação com aquele que recebeu o tratamento após 90 dias.

Técnicas biofísicas e de imagem da pele

Microrrelevo da pele

Esses parâmetros foram avaliados usando Visioscan® VC98 e software SELS 2000 da Courage & Khazaka Electronic GmbH (Colônia, Alemanha). A área de medição foi de $6 \times 8 \text{ mm}^2$ e a imagem da pele foi feita por uma câmera CCD incorporada. O método SELS (*Surface Evaluation of the Living Skin*) é baseado em uma representação gráfica da pele viva sob iluminação especial, e o processamento eletrônico e avaliação desta imagem foi realizado de acordo com quatro parâmetros clínicos: a) Suavidade da pele (Sesm) - calculado a partir da largura e profundidade média das rugas, b) Rugosidade da pele (Ser) - calculado pelos níveis de cinza acima do limiar em comparação com toda a imagem (reflete a 'aspereza' da pele.), c) Rugas (Sew) - calculada a partir da proporção das rugas horizontais e verticais e d) Profundidade das rugas (Rt) (23). Todas as medidas foram feitas na região malar da face.

Medição da pele por fotografia de alta resolução

Para a avaliação da pele facial foi utilizado o sistema de imagem de fotografia digital Visioface® (Courage e Khazaka, Alemanha), composto por uma cabine acoplada a uma câmera digital de alta resolução (10 megapixels) e 200 LEDs brancos. Este aparelho está conectado a um software de pesquisa que permite a avaliação de poros e rugas visíveis (1). A análise das rugas foi feita por meio de um escore de 5 pontos tanto na região nasolabial quanto na periorbital.

Measurement of dermis echogenicity

To evaluate the dermis echogenicity, 20 MHz ultrasound equipment (Dermascan® C, Cortex Technology, Aalborg, Denmark) was chosen. It is based on the principle that the ultrasonic wave (speed of 1,580 m/s) is partially reflected by the skin structure, creating echoes of different amplitudes. To calculate the echogenicity, the number of pixels with low echogenicity is measured utilizing the image analysis software and related to the total number of pixels (1). All measurements were also taken in the malar region of the face.

Hair Characterization Studies

Tensile Test

The hair was evaluated in terms of break force and was performed using the equipment TA.XT Plus Texture Analyzer® (Stable Microsystems, Surrey UK). The analysis was performed in a room at a 20-22°C and 50-60% relative humidity (RH). The wire diameters were measured with a dynamometer, and 20 fibers of similar diameter at least 10 cm long were selected. The 20 wires were submitted individually to the rupture test in the Texturometer equipment at 55 mm distance, 10N load, and a constant rate of 300 mm/min (25).

Statistical analysis

Two-way ANOVA and Bonferroni post-test were used to evaluate the results obtained in this study. Statistical differences between placebo and collagen peptides groups were analyzed by the paired student's T-tests, which as also used for basal and T90 measurements of each parameter (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Differences were accepted as statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Biophysical and skin imaging techniques

According to the microrelief analysis, it was possible to observe a difference in the parameters related to skin scaliness (Sesc), roughness (Ser), and smoothness (Sesm) only in the collagen peptides treatment group after 90 days of treatment. The only significant parameter was the Sesc. In the placebo group, no significant difference was noted (Figures 1 and 2). Figures 3 and 4 represent participants in each study group.

Medição da ecogenicidade da derme

Para a avaliação da ecogenicidade da derme, foi utilizado equipamento de ultrassom de 20 MHz (Dermascan® C, Cortex Technology, Aalborg, Dinamarca). A onda ultrassônica (velocidade de 1.580 m/s) é parcialmente refletida pela estrutura da pele, dando origem a ecos de diferentes amplitudes. Para calcular a ecogenicidade, o número de pixels com baixa ecogenicidade é medido por meio do software de análise de imagens e relacionado ao número total de pixels (1). Todas as medidas foram feitas também na região malar da face.

Estudos de caracterização capilar

Teste de tração

O cabelo foi avaliado em termos de força de quebra e foi realizado utilizando o equipamento TA.XT Plus Texture Analyzer® (Stable Microsystems, Surrey UK). A análise foi feita à temperatura de 20-22°C, 50-60% de umidade relativa. Os diâmetros dos fios foram medidos com um dinamômetro e foram selecionadas 20 fibras de diâmetro semelhante com pelo menos 10 cm de comprimento. Os 20 fios foram submetidos individualmente ao ensaio de ruptura no Texturômetro a 55 mm de distância, carga de 10N e taxa constante de 300 mm/min (25).

Análise estatística

Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni foram usados neste estudo. As diferenças estatísticas entre os grupos placebo e peptídeos de colágeno foram verificadas por testes T de Student pareados para medições basais e T90 para cada parâmetro avaliado (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). As diferenças foram aceitas como estatisticamente significativas em $p < 0,05$.

Resultados

Técnicas biofísicas e de imagem da pele

De acordo com a análise de microrrelevo, foi possível observar diferença nos parâmetros relacionados à descamação da pele (Sesc), rugosidade (Ser) e suavidade (Sesm) apenas no grupo de tratamento com peptídeos de colágeno após 90 dias de tratamento. O único parâmetro significativo foi o Sesc. No grupo placebo, não foi observada diferença significativa (Figuras 1 e 2). As Figuras 3 e 4 estão representando os participantes de cada grupo de estudo.

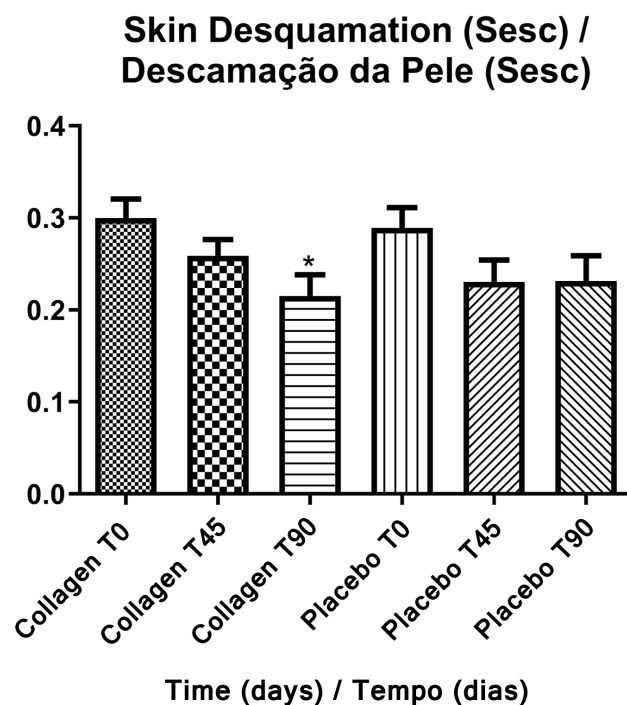


Figure 1 - Skin Scaliness (Sesc) on the malar region of the face in both study groups before (baseline) and after 45 and 90 days of treatment. * Significant difference when compared to the baseline values ($p < 0.05$).

Figura 1 - Descamação da Pele (Sesc) na região malar da face em ambos os grupos de estudo antes (basal) e após 45 e 90 dias de tratamento. * Diferença significativa em relação aos valores basais ($p < 0,05$).

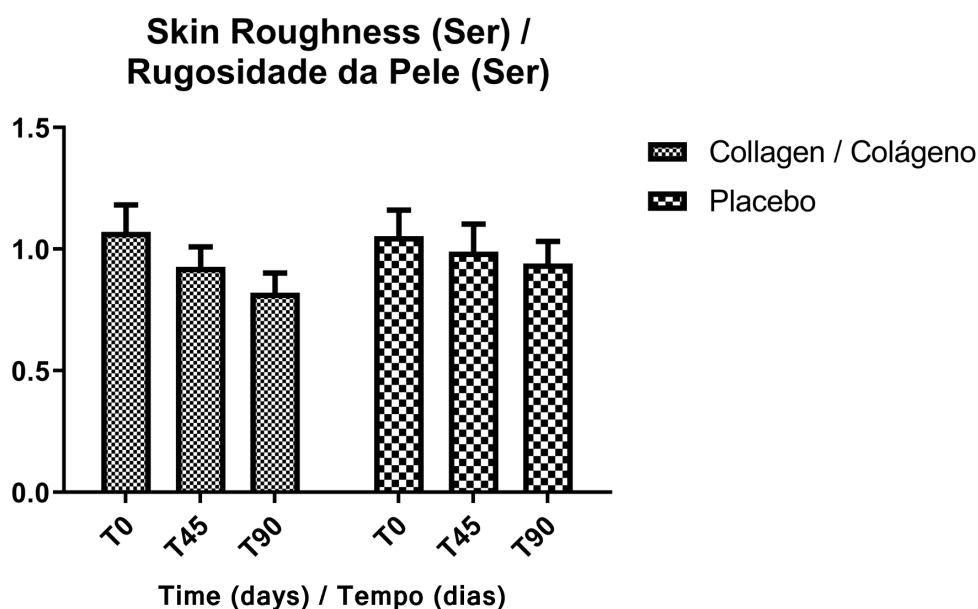


Figure 2 - Skin Roughness (Ser) on the malar region of the face in both study groups before (baseline) and after 45 and 90 days of treatment.

Figura 2 - Rugosidade da pele (Ser) na região malar da face em ambos os grupos de estudo antes (basal) e após 45 e 90 dias de tratamento.

The high-resolution images obtained allowed the analysis through the score method, which presented a significant reduction of skin wrinkles in the periorbital and nasolabial regions of the face in the collagen peptides group only (Figures 5 and 6).

The dermis echogenicity analysis showed a decrease in the dermis echogenicity ratio (number of low echogenic pixels/number of total echogenic pixels - LEP/TEP), in both groups, after the 90 treatment period.. Figure 7 shows the echogenicity difference percentage between T90 and T0. According to these results, there was a reduction in the echogenicity ratio, therefore, an increase in the dermis echogenicity in the collagen peptides group.

As imagens de alta resolução obtidas permitiram a análise pelo método de score, que apresentou redução significativa das rugas da pele nas regiões periorbital e nasolabial da face apenas no grupo que recebeu peptídeos de colágeno (Figuras 5 e 6).

A análise da ecogenicidade da derme mostrou diminuição da razão de ecogenicidade da derme (número de pixels ecogênicos baixos/número de pixels ecogênicos totais - LEP/TEP), em ambos os grupos, após 90 dias de tratamento. A Figura 7 mostra a porcentagem de diferença de ecogenicidade entre T90 e T0. De acordo com esses resultados, houve redução da razão de ecogenicidade, portanto, aumento da ecogenicidade da derme no grupo de peptídeos de colágeno.

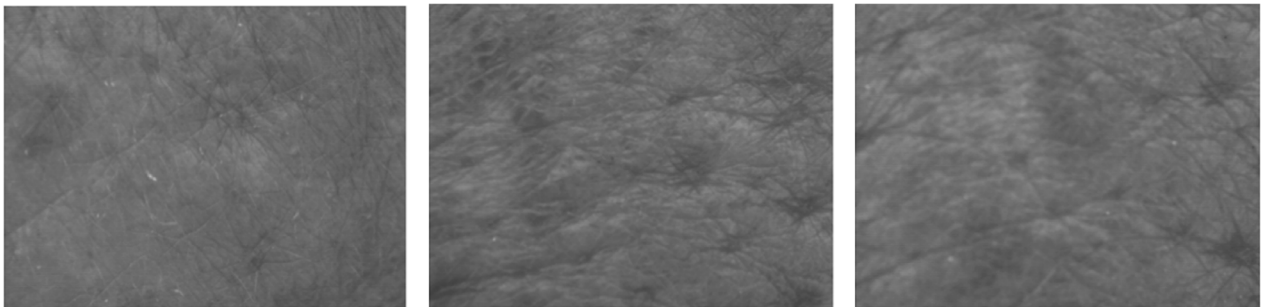


Figure 3 - Microrelief images in the malar region of a participant in the collagen group before and after 45 and 90 days of treatment.

Figura 3 - Imagens de microrrelevo na região malar de uma participante do grupo colágeno antes e após 45 e 90 dias de tratamento.

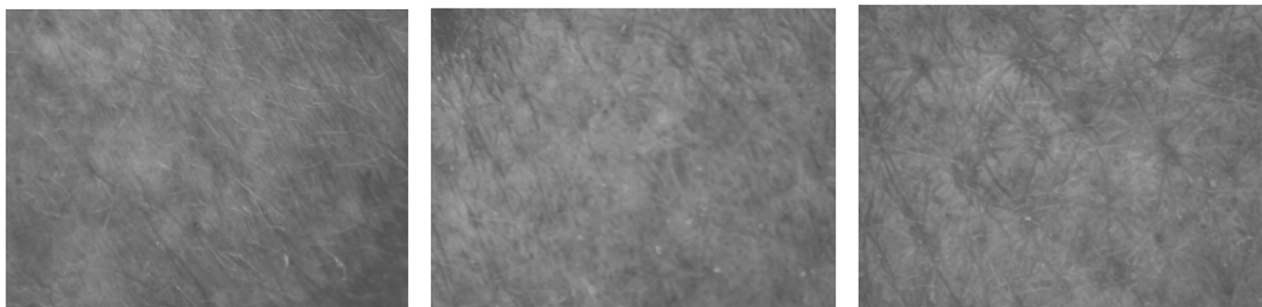


Figure 4 - Microrelief images in the malar region of a participant in the placebo group before and after 45 and 90 days of treatment.

Figura 4 - Imagens de microrrelevo na região malar de uma participante do grupo placebo antes e após 45 e 90 dias de tratamento.

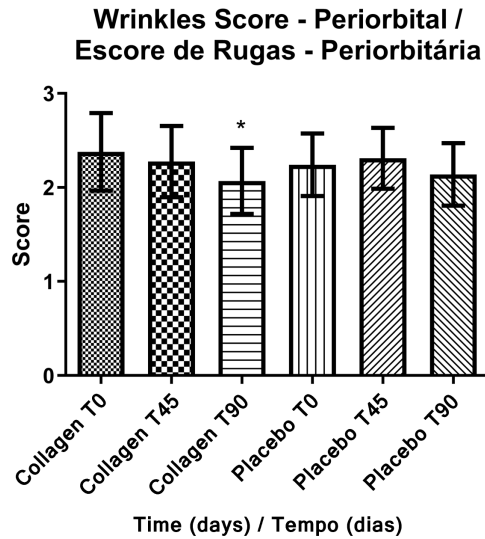


Figure 5 - Wrinkles score on the periorbital region of the face on the Collagen and Placebo groups before (baseline) and after 45 and 90 day-period of treatment. * Significant difference when compared to the baseline values ($p < 0.05$).

Figura 5 - Escore de rugas na região periorbitária da face nos grupos Colágeno e Placebo antes (basal) e após 45 e 90 dias de tratamento. * Diferença significativa em relação aos valores basais ($p < 0,05$).

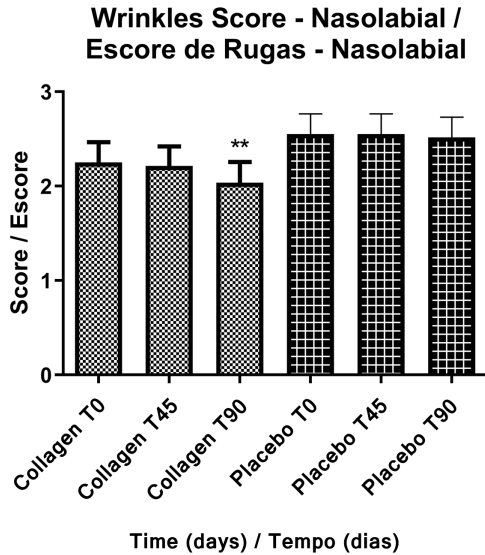


Figure 6 - Wrinkles score on the nasolabial region of the face on the Collagen and Placebo groups before (baseline) and after 45 and 90 day-period of treatment. * Significant difference when compared to the baseline values ($p < 0.05$).

Figura 6 - Escore de rugas na região nasolabial da face nos grupos Colágeno e Placebo antes (basal) e após 45 e 90 dias de tratamento. * Diferença significativa em relação aos valores basais ($p < 0,05$).

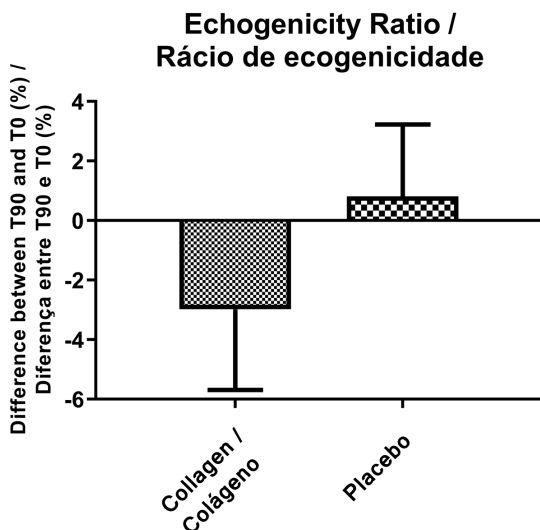


Figure 7 - Difference of dermis echogenicity between T90 and T0 in the malar region of the face of the collagen and placebo groups

Figura 7 - Diferença da ecogenicidade da derme entre T90 e T0 na região malar da face dos grupos colágeno e placebo de tratamento. * Diferença significativa em relação aos valores basais ($p < 0,05$).

Hair Characterization Studies

Tensile Test

The tensile test (Figure 8) results showed that after the treatment with collagen peptides, the break stress values increased significantly. At the same time, the break stress values of the participant’s hair in the control group were unaltered.

Discussion

Collagen is one of the most abundant proteins in the human body. It is known that collagen fibers become damaged with the aging process and consequently lose their strength, causing alterations in different structures, such as the appearance of wrinkles in the skin.

Some diets can influence the skin and hair. For example, malnutrition, like in cases of anorexia nervosa, can lead to skin changes like xerosis, hair effluvium, nail modifications, etc. (26). On the other hand, obesity can also impair skin physiology. Obese people can significantly increase transepidermal water loss, which could alter skin barrier function. It can also affect sebum production, micro and macrocirculation changes, and modify collagen metabolism.

Estudos de caracterização capilar

Teste de tração

Os resultados do teste de tração (Figura 8) mostraram que após o tratamento com peptídeos de colágeno, os valores de *Break stress* aumentaram significativamente. Ao mesmo tempo, os valores de *Break stress* dos cabelos das participantes do grupo controle não apresentaram alterações.

Discussão

O colágeno é uma das proteínas mais abundantes no corpo humano. Sabe-se que com o processo de envelhecimento, as fibras de colágeno começam a ser danificadas e, conseqüentemente, perdem sua força, causando alterações em diferentes estruturas humanas, como o aparecimento de rugas na pele.

Algumas dietas podem influenciar a pele e o cabelo. Por exemplo, a desnutrição, como a observada nos casos de anorexia nervosa, pode levar a alterações cutâneas como xerose, eflúvio capilar, alterações nas unhas, etc. (26). Por outro lado, a obesidade também pode prejudicar a fisiologia da pele. Pessoas obesas podem aumentar significativamente a perda de água transepidérmica, o que pode ser uma alteração da função de barreira da pele. Também pode afetar a produção de sebo, alterações na micro e macrocirculação e modificar o metabolismo do colágeno.

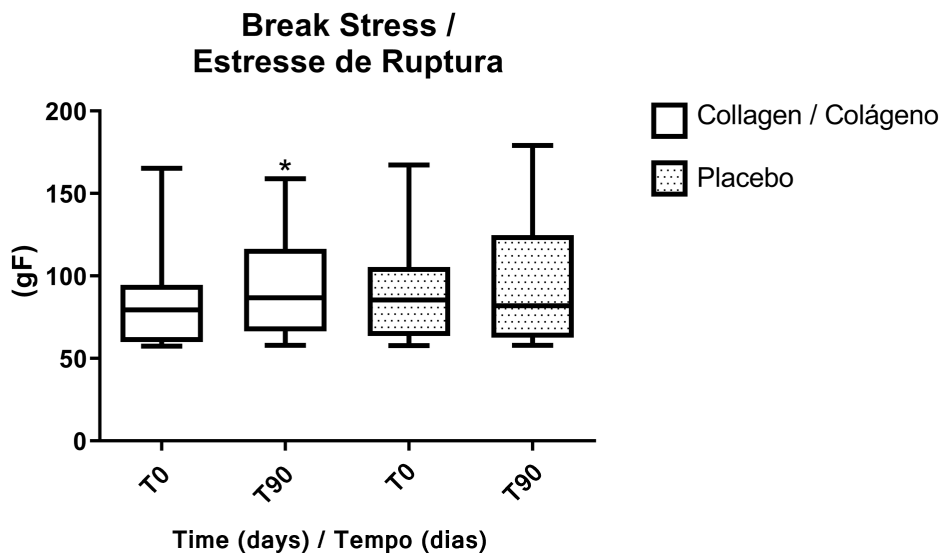


Figure 8 - Break stress of the Collagen and Control groups (***) indicates significant difference $p < 0,005$).

Figura 8 - Estresse de ruptura do cabelo nos grupos Colágeno e Controle (***) diferença significativa $p < 0,005$).

In some studies, a higher acne lesion count was correlated with the increased ratio of saturated to monounsaturated fatty acids of skin triglycerides.

An interesting study by Tanaka et al. has recently evaluated the effect of a vegetarian diet as an alternative therapy for managing Atopic dermatitis. Other studies show that it can also benefit psoriasis (26).

Furthermore, there is an association between sugar and some food processing methods (like grilling, frying, baking, etc.) with skin aging, as there are mechanisms related to advanced skin glycation end products. A high-sugar diet, ultraviolet irradiation, and eating barbecued fried foods can lead to the accumulation of AGEs and acceleration of skin aging (27).

Other studies show that strict control of blood sugar can also be significant for skin health, as four months on this diet can reduce the production of glycosylated collagen by 25%, and low-sugar food prepared by boiling can also reduce the production of AGEs (27).

There are many other effects of food on the skin, but in general reasonable, healthy, and diverse diet with antioxidant-rich foods is essential to maintaining skin health (27).

Most studies utilizing collagen peptides use a dosage of 10 g. However, the efficacy of a lower dose of the same product, without any additives as vitamins and minerals, is still to be reinforced (28). A lower dose with the same efficacy is practical to the consumer, facilitating the ingestion and creating a consumption habit with lower costs. Furthermore, with a lower dose is also easier to introduce the substance in its full dose in other finished products, creating different forms of use.

A recent systematic review and meta-analysis studies utilized a total of 1,125 patients in different studies. A comparative analysis between the placebo and the intervention group showed no difference in the means for elasticity, wrinkles, and transepidermal water loss. There was a significant difference in the dermis density, dermis thickness, and stratum corneum water content (29).

Outro ponto é que uma maior contagem de lesões de acne foi correlacionada em alguns estudos com o aumento na proporção de ácidos graxos saturados para monoinsaturados dos triglicerídeos da pele.

Um interessante estudo de Tanaka et al. recentemente avaliou o efeito de uma dieta vegetariana como terapia alternativa para o manejo da dermatite atópica. Outros estudos mostram que também pode ser benéfico para a psoríase (26).

Além disso, existe uma associação entre o açúcar e alguns métodos de processamento de alimentos (como grelhar, fritar, assar etc.) com o envelhecimento da pele, pois existem mecanismos relacionados aos produtos finais de glicação avançada da pele. Uma dieta rica em açúcar, irradiação ultravioleta e comer frituras grelhadas podem levar ao acúmulo de AGEs e aceleração do envelhecimento da pele (27).

Outros estudos mostram que o controle rigoroso do açúcar no sangue também pode ser significativo para a saúde da pele, pois quatro meses nessa dieta podem reduzir a produção de colágeno glicosilado em 25%, e alimentos com baixo teor de açúcar preparados por fervura também podem reduzir a produção de AGEs (27).

Existem muitos outros efeitos dos alimentos na pele, mas, em geral, uma dieta razoável, saudável e diversificada com alimentos ricos em antioxidantes é essencial para manter a saúde da pele (27).

A maioria dos estudos utilizando peptídeos de colágeno utiliza a dosagem de 10g. No entanto, a eficácia de uma dose menor do mesmo produto, sem quaisquer aditivos como vitaminas e minerais, ainda precisa ser reforçada (28). Uma dose menor com a mesma eficácia é prática para o consumidor, facilitando a ingestão e criando um hábito de consumo com custos menores. Além disso, com uma dose menor também é mais fácil introduzir a substância em sua dose total em outros produtos acabados, criando diferentes formas de uso.

Uma recente revisão sistemática e meta-análise utilizaram um total de 1.125 pacientes em diferentes estudos. Uma análise comparativa entre o grupo placebo e o grupo intervenção não mostrou diferença nas médias de elasticidade, rugas e perda transepidermica de água. Houve uma diferença significativa na densidade da derme, espessura da derme e teor de água do estrato córneo (29).

In our study, using specific imaging techniques, we obtained the same improvement in the dermis density, but, likely due to the different methods used, a difference in skin texture and wrinkles was also observed.

This way, the present study was developed to analyze the clinical effects of the consumption of 5 g of collagen peptides, without adding other components, to skin and hair.

The skin microrelief analysis showed an improvement in skin texture only in the collagen peptides study group. This improvement was explained due to changes in the protein turnover in the dermal layer; increasing the amount of collagen and the enhanced fibrillar network leads to better skin integrity and, consequently, improved skin texture. Previous studies also found this result with higher doses of collagen or products added with other substances (1,30). Similar studies have also noted changes in skin dryness, which is directly related to the skin desquamation parameter. Hydrolyzed Collagen ingestion is also known for improving skin hydration, which is inversely associated with the Sesc. Furthermore, changes in the dermal tissue, which is filled with fibroblasts, are stimulated by collagen peptides, producing new collagen, elastin, and hyaluronic acid (30). This shows that a lower dose of collagen containing no other components is effective in improving skin microrelief parameters. As it is more accessible to consumer ingestion, the food industry might develop products using this dose. The other parameters were not significant, likely because of the differences between participants.

High-resolution images provide many parameters in the study of clinical trials. It was possible to observe an improvement in skin wrinkles (in different regions) with the collagen treatment using score analysis. Beyond the mechanism described above, that also improved the skin microrelief efficiently absorbed collagen and can induce an increase of collagen fibers density and diameter (3). The increase in dermis density leads to a better structuration of the skin, with the improvement of the dermal-epidermal junction. These changes can be seen as fewer and more superficial skin wrinkles and pores (1,14).

Em nosso estudo, usando técnicas de imagem específicas, obtivemos a mesma melhora na densidade da derme, mas provavelmente devido aos diferentes métodos utilizados, também foi observada uma diferença na textura da pele e nas rugas.

Assim, o presente estudo foi desenvolvido para analisar os efeitos clínicos do consumo de 5 g de peptídeos de colágeno, sem adição de outros componentes, à pele e cabelo.

A análise do microrrelevo da pele mostrou melhora da textura da pele apenas no grupo de estudo de peptídeos de colágeno. Esse resultado também foi encontrado em estudos anteriores com maiores doses de colágeno ou em produtos adicionados de outras substâncias (1,30). Estudos semelhantes também observaram alterações no ressecamento da pele, que está diretamente relacionada ao parâmetro de descamação da pele e a ingestão do Colágeno Hidrolisado também é conhecida pela melhora da hidratação da pele, que está inversamente relacionada ao Sesc. Essa melhora pode ser explicada pelas alterações no turnover proteico na camada dérmica, aumentando a quantidade de colágeno e a rede fibrilar aprimorada, o que leva a uma melhor integridade da pele e consequentemente, melhora da textura da pele. Além disso, alterações no tecido dérmico, que é preenchido por fibroblastos, sofrem estimulação por peptídeos de colágeno, produzindo novo colágeno, elastina e ácido hialurônico (30). Isso mostra que uma dose menor de Colágeno sem a adição de outros componentes é eficaz na melhora dos parâmetros de microrrelevo da pele, sendo mais fácil para o consumidor a ingestão e para a indústria alimentícia que irá desenvolver produtos utilizando essa dose. Os outros parâmetros não foram significativos provavelmente devido às diferenças entre os participantes.

Imagens de alta resolução fornecem muitos parâmetros no estudo de ensaios clínicos. Foi possível observar uma melhora das rugas da pele (em diferentes regiões) com o tratamento com colágeno por meio da análise de escore. Além disso, de acordo com o mecanismo descrito acima, uma vez que também houve uma melhora no microrrelevo da pele, podemos entender que a absorção eficiente do colágeno pode induzir um aumento da densidade e do diâmetro das fibras colágenas (3). O aumento da densidade da derme leva a uma melhor estruturação da pele, com melhora da junção dermo-epidérmica, e essas alterações podem ser vistas menos e mais superficiais como rugas e poros da pele (1,14).

This increase in dermis density can be confirmed by the dermis echogenicity parameter, done by a high-frequency ultrasound, which presented an improvement after 90 days of treatment with the study product, showing quantitatively and qualitatively that this increase is present. This way, the dermis echogenicity improvement directly relates to the previous parameters in this study since they were consequences of a better dermis density. A denser dermis repairs the present skin damage from different sources, slowing the chronological aging and photoaging process. In addition, the increase of dermis density found in this study with a consumption of 5 g of collagen peptides without the addition of other components per day is also in accordance with previous studies of our research group (1) and others from the literature (16,30)

Collagen is composed of peptides of several sizes, which are degraded into biologically actives di and tri peptides (30) composed of amino acids that, through different types of interactions, resulting in a more complex structure that is present in several tissues in the human body. In this context, considering that the hair fiber is also composed of a majority of proteins, mainly keratin (31), which resulted in the complexation of 20 amino acids that are also common to the collagen amino acids, so the supplementation of collagen peptides can contribute as support of amino acids for the hair fiber development in the hair bulb. After breaking the collagen molecule into less complex structures, these amino acids can contribute to the cellular development of the skin and its appendices as the hair and nails structure. The loss of proteins in the hair fiber can reduce its resistance to mechanical and chemical processes, to which women are exposed frequently (20).

The hair is an appendage from the epidermis and can be divided into two parts, the hair follicle, and the hair shaft. The hair shaft extends from the root or bulb, which is localized in the follicle passing through the epidermis, and stratum corneum and then continuing with stem (31).

Although the hair is considered a dead structure, the region of the bulb localized in the human hair follicle is considered a complex mini-organ which allows the hair to receive nutrients and proteins that are ingested in our diet. Thus, the use of collagen peptides as a dietary supplement or in cosmetic formulations can help the protein restitution on the hair fiber and increase its strength in mechanical processes.

Esse aumento da densidade da derme pode ser confirmado pelo parâmetro de ecogenicidade da derme, feito por ultrassonografia de alta frequência, onde foi notada melhora após 90 dias de tratamento com o produto em estudo, mostrando de forma quantitativa e qualitativa que esse aumento está presente. Assim, a melhora da ecogenicidade da derme mostra uma relação direta com os parâmetros anteriores neste estudo, uma vez que foram consequências de uma melhor densidade da derme. Uma derme mais densa atua reparando os danos presentes da pele de diferentes origens, retardando também o envelhecimento cronológico e o processo de fotoenvelhecimento. Além disso, o aumento da densidade da derme encontrado neste estudo com o consumo de 5 g de peptídeos de colágeno sem a adição de outros componentes por dia também estão de acordo com estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (1) e outros da atual literatura (16, 30).

O colágeno é composto de peptídeos de variados tamanhos que são degradados em di e tri peptídeos ativos biologicamente (30), os quais são compostos de aminoácidos essenciais, que por meio de ligações resultam em uma estrutura mais complexa, tal qual o colágeno, presente em diversos tecidos do corpo humano. Desta forma, considerando que a fibra capilar é composta majoritariamente da proteína queratina, (31), a qual é composta devido a complexação de 20 aminoácidos, dentre estes aminoácidos em comum com os responsáveis pela formação do colágeno, a suplementação oral de peptídeos do colágeno pode contribuir para o suporte adequado de aminoácidos para a formação da fibra capilar na região do bulbo. Após a quebra deste em estruturas mais simples, esses aminoácidos podem contribuir para o desenvolvimento celular da pele e seus apêndices tais quais os cabelos e unhas (20).

O cabelo é um apêndice da epiderme e pode ser dividido em duas partes, o folículo piloso e a haste capilar. A haste capilar se estende desde a raiz ou bulbo, que se localiza no folículo passando pela epiderme, estrato córneo e depois continuando com um vapor (31).

Embora o cabelo seja considerado uma estrutura morta, a região do bulbo localizada no folículo piloso humano, considerada um mini órgão complexo, permite que o cabelo receba nutrientes e proteínas que são ingeridos em nossa dieta. Assim, o uso de peptídeos de colágeno como suplemento alimentar ou em formulações cosméticas pode auxiliar na restituição de proteínas na fibra capilar, aumentando a sua resistência aos processos mecânicos.

The results of our study show that using collagen peptides as a dietary supplement improved hair mechanical resistance since they promoted an increase in hair fiber Break Stress. This parameter evaluates the hair's internal structure and the cortex region's strength. This increase suggests that the use of collagen peptides orally promoted the treatment of the inner region (cortex) of the hair fiber, increasing its strength of the hair fiber (32). This way, collagen oral supplementation is important not only for improving skin conditions but also for hair care once significantly an increase of the mechanical hair resistance evaluated by objective measurements is noted. In addition, considering that the aging process affects the hair's mechanical resistance due to hair fiber thinning, the proposed treatment was effective for aged hair.

In summary, the present study, conducted for the time in Brazilian woman, showed important benefits in relevant skin visual parameters, dermis density, and hair strength with a lower dose of 5 g per day of bovine collagen peptides without the addition of other components.

Finally, oral supplementation with collagen peptides is important not only for the improvement of skin conditions but also for hair care once it significantly increases the mechanical hair resistance evaluated by objective measurements. In addition, considering that the aging process affects the hair's mechanical resistance due to hair fiber thinning, the proposed treatment was effective for aged hair.

Study Limitations

The limitation of the study was the difficulty of controlling and monitoring the study participants' diet, mainly in terms of protein intake. Since the aim of the study was oral supplementation, this could be influenced by the participants' dietary habits. In addition, it was not possible to quantitatively analyze the amount of white hair in the participants.

Os resultados do nosso estudo mostram que o uso de peptídeos de colágeno como suplemento alimentar melhorou a resistência mecânica do cabelo, uma vez que promoveu um aumento do estresse de quebra da fibra capilar. Este parâmetro avalia a estrutura interna do cabelo, a força da região do córtex. Esse aumento sugere que o uso de peptídeos de colágeno por via oral, promoveu um tratamento da região interna (córtex) da fibra capilar, aumentando a resistência da fibra (32). Desta forma, a suplementação oral de colágeno é importante não só para a melhora das condições da pele, mas também para o cuidado do cabelo, uma vez que se notou um aumento significativo da resistência mecânica do cabelo avaliada por medidas objetivas. Além disso, considerando que o processo de envelhecimento afeta a resistência mecânica do cabelo devido ao afinamento da fibra capilar, o tratamento proposto foi também eficaz para cabelos envelhecidos.

Em resumo, o presente estudo mostrou benefícios importantes em parâmetros de imagem relevantes da pele, densidade da derme e força capilar, com uma dose menor de 5 g por dia de peptídeos de colágeno bovino sem a adição de outros componentes, estudado pela primeira vez em mulheres brasileiras.

Por fim, a suplementação oral com peptídeos de colágeno é importante não apenas para a melhora das condições da pele, mas também para o cuidado do cabelo, uma vez que aumenta significativamente a resistência mecânica do cabelo avaliada por medidas objetivas. Além disso, considerando que o processo de envelhecimento afeta a resistência mecânica do cabelo devido ao afinamento da fibra capilar, o tratamento proposto foi eficaz para cabelos envelhecidos.

Limitações Do Estudo

A limitação do estudo foi a dificuldade de controlar e monitorar a dieta dos participantes do estudo, principalmente em termos da ingestão de proteínas. Desde que o objetivo do estudo foi a suplementação oral, isto poderia ser influenciado pelos hábitos alimentares dos participantes. Além disso, não foi possível analisar quantitativamente a quantidade de cabelos brancos das participantes.

Author Contributions

P.M.B.G Maia Campos: Conceptualization, Funding acquisition, Formal analysis, Methods, Project administration, Research Supervision, Validation, Visualization, Writing - review & editing. M.O. Melo: Formal analysis, methods, writing the original draft, review and editing the text. M.M.F. Shirata: Formal analysis, methods, writing the original draft. M.G.Leite: Formal analysis, writing the original draft, methods.

Acknowledgments

We would like to thank FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2017/19278-0

Conflicts of interests

The Editor involved in the authorship of this manuscript had no participation in the review or decision process.

We confirm that no known conflicts of interest are associated with this publication. Furthermore, there has been no significant financial support for this work that could have influenced its results.

Contribuição Dos Autores

P.M.B.G Maia Campos: Conceituação, Obtenção de financiamento, Análise formal, Métodos, Administração do projeto, Supervisão da pesquisa, Validação, Visualização, Redação - revisão e edição. MO Melo: Análise formal, métodos, redação do projeto original, revisão e edição do texto. M.M.F. Shirata: Análise formal, métodos, redação do rascunho original. M.G.Leite: Análise formal, redação do rascunho original, métodos.

Agradecimentos

Agradecemos à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Bolsa/Projeto Número: 2017/19278-0

Conflitos De Interesses

A Editora presente na autoria deste manuscrito não participou nos processos de pessoais revisão e/ou decisão.

Desejamos confirmar que não há conflitos de interesse conhecidos associados a esta publicação e não houve apoio financeiro significativo para este trabalho que possa ter seus resultados influenciados.

References / Referências

1. Maia Campos, P.M.B.G., Melo, M.O., Calixto, L. *et al.* (2015). An oral supplementation based on hydrolyzed collagen and vitamins improves skin elasticity and dermis echogenicity: a clinical placebo-controlled study. *Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics*, 4(3), 1-6. <https://doi.org/10.4172/2167-065X.1000142>
2. Czajka, A., Kania, E. M., Genovese, L., Corbo, A., Merone, G., Luci, C., & Sibilla, S. (2018). Daily oral supplementation with collagen peptides combined with vitamins and other bioactive compounds improves skin elasticity and has a beneficial effect on joint and general wellbeing. *Nutrition Research*, 57, 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.06.001>.
3. Sibilla, S., Godfrey, M., Brewer, S., Budh-Raja, A., Genovese, L. (2015). An Overview of the Beneficial Effects of Hydrolysed Collagen as a Nutraceutical on Skin Properties: Scientific Background and Clinical Studies. *The Open Nutraceuticals Journal*, 8, 29-42. <https://doi.org/10.2174/1876396001508010029>
4. Chung, J. H., Seo, J. Y., Choi, H. R., Lee, M. K., Youn, C. S., Rhie, G., Cho, K. H., Kim, K. H., Park, K. C., & Eun, H. C. (2001). Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *The Journal of investigative dermatology*, 117(5), 1218-1224. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01544.x>.
5. Liu, C., Sugita, K., Nihei, K., Yoneyama, K., & Tanaka, H. (2009). Absorption of hydroxyproline-containing peptides in vascularly perfused rat small intestine in situ. *BioScience, biotechnology, and biochemistry*, 73(8), 1741-1747. <https://doi.org/10.1271/bbb.90050>
6. Aito-Inoue, M., Lackeyram, D., Fan, M. Z., Sato, K., & Mine, Y. (2007). Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, 13(7), 468-474. <https://doi.org/10.1002/psc.870>
7. Shigemura, Y., Kubomura, D., Sato, Y., & Sato, K. (2014). Dose-dependent changes in the levels of free and peptide forms of hydroxyproline in human plasma after collagen hydrolysate ingestion. *Food chemistry*, 159, 328-332. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.091>
8. Kawaguchi, T., Nanbu, P. N., & Kurokawa, M. (2012). Distribution of prolylhydroxyproline and its metabolites after oral administration in rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 35(3), 422-427. <https://doi.org/10.1248/bpb.35.422>
9. Watanabe-Kamiyama, M., Shimizu, M., Kamiyama, S., Taguchi, Y., Sone, H., Morimatsu, F., Shirakawa, H., Furukawa, Y., & Komai, M. (2010). Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2), 835-841. <https://doi.org/10.1021/jf9031487>.
10. León-López, A., Morales-Peñaloza, A., Martínez-Juárez, V.M., Vargas-Torres, A., Zeugolis, D.I., Aguirre-Álvarez, G. (2019) Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications. *Molecules* 24, 4031. <https://doi.org/10.3390/molecules24224031>
11. Matsumoto, H., Ohara, H., Ito, K., Nakamura, Y., Takahashi, S. (2006) Clinical effects of fish type I collagen hydrolysate on skin properties. *ITE Letters on Batteries, New Technologies, and Medicine*, 7 (4): 386-390
12. Zague, V., do Amaral, J. B., Rezende Teixeira, P., de Oliveira Niero, E. L., Lauand, C., & Machado-Santelli, G. M. (2018). Collagen peptides modulate the metabolism of extracellular matrix by human dermal fibroblasts derived from sun-protected and sun-exposed body sites. *Cell biology international*, 42(1), 95-104. <https://doi.org/10.1002/cbin.10872>
13. Chen, T., Hou, H. (2016). Protective effect of gelatin polypeptides from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) against UV irradiation-induced damages by inhibiting inflammation and improving transforming growth factor- β /Smad signaling pathway. *Journal of Photochemistry & Photobiology. B: Biology*, 162: 633-640.
14. Maia Campos, P.M.B.G., Franco, R.S.B., Kakuda, L., Cadioli, G.F., Costa, G.M.D., Bouvret, E. (2012). Oral Supplementation with Hydrolyzed Fish Cartilage Improves the Morphological and Structural Characteristics of the Skin: A Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Study. *Molecules*. 26 (16):4880.
15. Ohara, H., Ito, K., Iida, H., Matsumoto, H. (2009). Improvement in the moisture content of the stratum corneum following 4 weeks of collagen hydrolysate ingestion. *Food Science and Technology Research*, 56 (3): 137-145.
16. Asserin, J., Lati, E., Shioya, T., & Prawitt, J. (2015). The effect of oral collagen peptide supplementation on skin moisture and the dermal collagen network: evidence from an ex vivo model and randomized, placebo-controlled clinical trials. *Journal of cosmetic dermatology*, 14(4), 291-301. <https://doi.org/10.1111/jocd.12174>
17. Inoue, N., Sugihara, F., & Wang, X. (2016). Ingestion of bioactive collagen hydrolysates enhance facial skin moisture and elasticity and reduce facial ageing signs in a randomised double-blind placebo-controlled clinical study. *Journal of the science of food and agriculture*, 96(12), 4077-4081. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7606>.
18. Proksch, E., Segger, D., Degwert, J., Schunck, M., Zague, V., & Oesser, S. (2014). Oral supplementation of specific collagen peptides has beneficial effects on human skin physiology: a double-blind, placebo-controlled study. *Skin pharmacology and physiology*, 27(1), 47-55. <https://doi.org/10.1159/000351376>
19. Aguirre-Cruz, G., León-López, A., Cruz-Gómez, V., Jiménez-Alvarado, R., & Aguirre-Álvarez, G. (2020). Collagen Hydrolysates for Skin Protection: Oral Administration and Topical Formulation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(2), 181. <https://doi.org/10.3390/antiox9020181>
20. Avila Rodríguez, M. I., Rodríguez Barroso, L. G., & Sánchez, M. L. (2018). Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of cosmetic dermatology*, 17(1), 20-26. <https://doi.org/10.1111/jocd.12450>
21. Camacho-Bragado, G. A., Balooch, G., Dixon-Parks, F., Porter, C., & Bryant, H. (2015). Understanding breakage in curly hair. *The British journal of dermatology*, 173 Suppl 2, 10-16. <https://doi.org/10.1111/bjd.13241>
22. Aguirre, A., Gil-Quintana, E., Fenaux, M., Erdozain, S., & Sarria, I. (2017). Beneficial Effects of Oral Supplementation With Ovoderm on Human Skin Physiology: Two Pilot Studies. *Journal of dietary supplements*, 14(6), 706-714. <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1310781>
23. Hexsel, D., Zague, V., Schunck, M., Siega, C., Camozzato, F. O., & Oesser, S. (2017). Oral supplementation with specific bioactive collagen peptides improves nail growth and reduces symptoms of brittle nails. *Journal of cosmetic dermatology*, 16(4), 520-526. <https://doi.org/10.1111/jocd.12393>
24. de Melo, M. O., & Maia Campos, P. M. B. G. (2018). Characterization of oily mature skin by biophysical and skin imaging techniques. *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)*, 24(3), 386-395. <https://doi.org/10.1111/srt.12441>
25. Velasco, M.V.R., Dias, T.C., Freitas, A.Z., Vieira, N.D., Pinto, C.A.S.O., Kaneko, T.M., Baby, A.R. (2009). Hair fiber characteristics and methods to evaluate hair physical and mechanical properties. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(1): 153-162.
26. Piccardi, N., & Manissier, P. (2009). Nutrition and nutritional supplementation: Impact on skin health and beauty. *Dermato-endocrinology*, 1(5), 271-274. <https://doi.org/10.4161/derm.1.5.9706>
27. Cao, C., Xiao, Z., Wu, Y., Ge, C. (2020). Diet and Skin Aging—From the Perspective of Food Nutrition. *Nutrients*, 12, 870. <https://doi.org/10.3390/nu12030870>
28. Sangsuwan, W., & Asawanonda, P. (2021). Four-weeks daily intake of oral collagen hydrolysate results in improved skin elasticity, especially in sun-exposed areas: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of dermatological treatment*, 32(8), 991-996. <https://doi.org/10.1080/09546634.2020.1725412>
29. de Miranda, R. B., Weimer, P., & Rossi, R. C. (2021). Effects of hydrolyzed collagen supplementation on skin aging: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Dermatology*, 60(12), 1449-1461. <https://doi.org/10.1111/ijd.15518>
30. Borumand, M., Sibilla, S. (2015). Effects of a nutritional supplement containing collagen peptides on skin elasticity, hydration, and wrinkles. *Journal of Medical Nutrition & Nutraceuticals*, 4(1), 47-53. <https://doi.org/10.4103/2278-019X.146161>
31. Miranda-Vilela, A. L., Botelho, A. J., & Muchlmann, L. A. (2014). An overview of chemical straightening of human hair: technical aspects, potential risks to hair fibre and health and legal issues. *International journal of cosmetic science*, 36(1), 2-11. <https://doi.org/10.1111/ics.12093>.
32. Evans, T. (2013). Measuring Hair Strength, Part I: StressStrain Curves. *Cosmetics and Toiletries*, 128(8),1-5.

Pretest questionnaire for anti-ageing cosmetic claims substantiation: a description of validation of efficacy and sensory perception questionnaires

Pré-teste de questionário para substanciação de claims cosméticos anti-ageing: uma descrição de validação de questionários de percepção de eficácia e sensorial

Mariane Massufero Vergilio ¹, Laura Moretti Aiello ², Tamiris Anselmo ², Gislaïne Ricci Leonardi ^{1,2*}

¹Graduate 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; ²School of Pharmaceutical Sciences - University of Campinas (UNICAMP), 200, Cândido Portinari St., "Cidade Universitária Zeferino Vaz," 13083-871 Campinas, SP, Brazil

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

Abstract

The application of questionnaires for the assessment and collection of data on target audiences and new products is a very common practice in the field of cosmetics. However, to obtain reliable results, it is essential to pretest the instrument to detect possible problems and inconsistencies. The aim of this study was to demonstrate the entire pre-testing process of two questionnaires used in the cosmetic claims substantiation area; a skin self-assessment questionnaire and a sensory analysis questionnaire for cosmetic formulations. According to the pretest protocol analysis, 15 women were interviewed for each questionnaire. All difficulties were recorded, categorized, and analyzed. Subsequently, the inconsistencies found were corrected in the final version of the instrument. During the validation of the questionnaires, the biggest problem faced was related to the application of scales and technical concepts within the questions. This difficulty means that respondents are unable to represent their real perception of the evaluated product. This problem can be solved by adding detailed explanations in the footer or within the wording of each question. In conclusion, learning and applying the pretest in questionnaires can ensure greater reliability and clarity in research results in the cosmetic area.

Keywords: Questionnaires, cosmetics, substantiation of claims, self-efficacy, sensory attributes

Resumo

A aplicação de questionários para a avaliação e coleta de dados do público-alvo e de novos produtos é uma prática muito comum na área da cosmética. Entretanto, para que seja obtido resultados confiáveis, é essencial o pré-teste do instrumento a fim de detectar possíveis problemas e inconsistências. Neste estudo, temos como objetivo demonstrar todo o processo de pré-teste de dois questionários utilizados na área de substanciação de claims cosméticos; um questionário de autoavaliação da pele e outro de análise sensorial para formulações cosméticas. De acordo com a análise protocolar de pré-teste, para cada questionário 15 mulheres foram entrevistadas. Todas as dificuldades foram registradas, categorizadas de forma não apriorística e analisadas. Durante a validação dos questionários, o maior problema enfrentado foi relacionado à aplicação de escalas e aos conceitos técnicos dentro das questões. Esta dificuldade faz com que os respondentes não consigam representar a sua real percepção do produto avaliado. Este problema pode ser solucionado com a adição de explicações detalhadas no rodapé ou dentro do próprio enunciado de cada questão. Em conclusão, aprender e aplicar o pré-teste em questionários pode garantir maior confiabilidade e clareza em resultados de pesquisas da área cosmética.

Palavras-chave: Questionários, cosméticos, substanciação de claims, autoeficácia, atributos sensoriais

Introduction

Consumption and demand for anti-ageing cosmetic and dermatological strategies have grown exponentially in recent years, due to increased life expectancy and a new culture focused on health care and aesthetics, bringing an improvement in the quality of the population (1–3). Consumers are increasingly concerned about the components of the products they are using, considering quality, effectiveness, safety and sustainability (3).

In this context, cosmetic claims related to aging gain prominence. Different methodologies can be used to provide information to help evaluate the effectiveness of cosmetic products to reverse or prevent the signs of skin aging (4). These include scientific tests based on the consumer's observation of the effectiveness and function of the product, as well as tests in which participants evaluate the sensory properties of a given product (4).

Of the number of available products, consumers give great preference for those which are pleasant to the senses, an extremely important attribute in the choice of the product in view of the numerous existing options that have the same function (5). Allied to sensory parameters, the study of the effectiveness of products, through the perceptions of consumers, is essential to prove their purposes, in addition to providing information for the development and marketing of new cosmetic and dermatological formulations, reformulation of existing products and optimization of the formulation process (6,7).

For these evaluations to present reliable results, it is necessary to use questionnaires elaborated from a validated measurement scale and appropriate to the study (8). Therefore, the development of these instruments is a complex process consisting of several steps toward achieving the proposed objective (9).

Thus, for the structuring of the questionnaire, it is necessary to first specify the information such as the central problem of the instrument, the necessary approach, the issues related to the theme and, principally, the target audience, which exerts great influence on its development (9).

To ensure the correct comprehension of all questions in the questionnaire and to identify possible difficulties, the pretest is an essential step during the development of the instrument. Through this, problems such

Introdução

O consumo e a demanda por estratégias cosméticas e dermatológicas antienvhecimento cresceram de forma exponencial nos últimos anos, devido ao aumento da expectativa de vida, e a uma nova cultura voltada ao cuidado com a saúde e estética, trazendo uma melhora na qualidade da população (1–3). Os consumidores estão cada vez mais preocupados com os componentes dos produtos que estão utilizando, considerando qualidade, eficácia, segurança e sustentabilidade (3).

Neste contexto, os claims cosméticos relacionados ao envelhecimento ganham destaque. Diferentes metodologias podem ser usadas para fornecer informações que ajudem a avaliar a eficácia dos produtos cosméticos para reverter ou prevenir os sinais de envelhecimento pele (4). Entre elas, existem testes científicos baseados na observação da eficácia e função do produto pelo consumidor, bem como testes em que participantes avaliam as propriedades sensoriais de determinado produto (4).

Dos diversos produtos disponíveis, os consumidores dão grande preferência por aqueles sensorialmente agradáveis, atributo extremamente importante na escolha do produto em vista das numerosas opções existentes e que possuem a mesma função (5). Aliado aos parâmetros sensoriais, o estudo de eficácia dos produtos, mediante as percepções dos consumidores, é imprescindível para a comprovação de suas finalidades, além de fornecerem informações para o desenvolvimento e marketing de novas formulações cosméticas e dermatológicas, reformulação de produtos já existentes e para a otimização do processo de formulação (6,7).

Para que essas avaliações apresentem resultados confiáveis, é necessária a utilização de questionários elaborados a partir de uma escala de mensuração validada e adequada ao estudo (8). Por conseguinte, a elaboração desses instrumentos é um processo complexo que consiste em vários passos para se atingir o objetivo proposto (9).

Desse modo, para a estruturação do questionário, é necessário primeiramente especificar informações como o problema central do instrumento, a abordagem necessária, as questões relacionadas ao tema e, principalmente, o público-alvo, que exerce grande influência na sua elaboração (10).

A fim de garantir a compreensão correta de todas as questões do questionário e de identificar possíveis

unfamiliar words to the interviewee, ambiguities, and inappropriate answers to the aim of the research can be evaluated, enabling the adequacy and modification of the preliminary or initial questionnaire. In addition, the pretest also allows verification of structural aspects such as the number of questions, how they are performed, and the order in which they are arranged (10).

To encode the obtained data in the pretest stage, it is very important to analyze the content that consists of a methodology for reading and interpreting the interviewee's answers, which also does not escape the personal interpretation of the interviewer (11,12). This analysis consists of three phases: the preanalysis, categorization, and treatment of the results (13).

The aim of this study was to describe the pre-testing of skin self-assessment questionnaires and another of sensory analysis, both focused on substantiating anti-ageing cosmetic claims, in order to indicate problems and solutions encountered during their development, to ensure greater reliability and clarity of data collection instruments in studies in the cosmetic area.

Material And Methods

Experimental design

Two initial questionnaires were evaluated, one for the self-evaluation of skin appearance ([Supplemental Materials](#) Appendix A) and another for the sensory evaluation of cosmetics ([Supplemental Materials](#) Appendix B).

The pretest of each questionnaire was performed through an interview of a sample, nonprobabilistic and for convenience, of 15 participants per questionnaire (n=30) (9). All participants signed an informed consent form. Women between 30 and 60 years old, consumers of anti-ageing cosmetics, were selected.

The protocol analysis process was chosen for the performance of this initial test, in which the interviewee "thinks aloud" when answering the questionnaire, and commonly, the interviewees' observations were recorded by audio, and analyzed to determine the reactions evoked by different parts of the questionnaire (9). The entire interview was recorded on a cell phone

dificuldades, o pré-teste é um passo essencial durante o desenvolvimento do instrumento. Por meio desse, problemas como palavras não familiares ao entrevistado, ambiguidades, respostas não apropriadas ao objetivo da pesquisa, podem ser avaliados, possibilitando a adequação e modificação do questionário preliminar ou inicial. Além disso, o pré-teste também permite verificar aspectos estruturais como a quantidade de perguntas, a forma como são realizadas, a ordem em que estão dispostas, dentre outros (10).

Para codificar os dados obtidos na etapa de pré teste, é muito importante a análise de conteúdo que consiste em uma metodologia para ler e interpretar as respostas do entrevistado, a qual não escapa também da interpretação pessoal do entrevistador (11,12). Essa análise é constituída por três fases: a pré análise, categorização e tratamento dos resultados (13).

O objetivo desse estudo foi descrever o pré-teste de questionários de autoavaliação da pele e outro de análise sensorial, ambos focados em substanciação de claims cosméticos anti-ageing, a fim de indicar problemas e soluções encontrados durante o desenvolvimento dos mesmos, para garantir maior confiabilidade e clareza de instrumentos de coleta de dados em estudos na área cosmética.

Materiais e métodos

Desenho experimental

Dois questionários iniciais foram avaliados, um para auto avaliação da aparência da pele ([Materiais Suplementares](#) Apêndice A); outro para avaliação sensorial de cosméticos ([Materiais Suplementares](#) Apêndice B).

O pré-teste de cada questionário, foi realizado através de entrevista de uma amostra, não probabilística e por conveniência, de 15 participantes por questionário (n=30) (9). Todos os participantes assinaram um termo de consentimento informado. Foram selecionadas participantes mulheres consumidoras de cosméticos anti-ageing, de 30 a 60 anos.

Foi escolhido o processo de análise protocolar para a realização deste teste inicial, em que o entrevistado "pensa em voz alta" ao responder o questionário e comumente, as observações dos entrevistados são gravadas por áudio e analisadas, a fim de determinar as reações evocadas por partes diferentes do questionário (9). Toda a entrevista foi gravada em um aparelho

for further analysis. The interviews were partially transcribed, focusing on the moments when the interviewees showed difficulty or some change of mood.

One experienced and one non-experienced interviewer were used. Experienced interviewers quickly detect insecurity, confusion, and resistance from respondents when answering questions. The non-expert identifies problems related to the interviewer, ensuring that the test application is robust, since the result of the research needs to be independent of who is applying the test (9).

The study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Medical Sciences of UNICAMP (CAAE: 13367219.5.0000.5404).

Data collection instrument

Self-evaluation of skin appearance questionnaire

The initial structure of the questionnaire can be found in [Supplemental Materials](#) Appendix A. This questionnaire was developed with the aim of providing data regarding the appearance of the skin. The parameters evaluated by this questionnaire were hydration, firmness, elasticity, flaccidity, wrinkles and expression lines in the lips/eyes/forehead, luminosity/freshness, signs of tiredness, skin tone uniformity, intensity and number of spots, vitality, apparent pores, presence of dark circles, bags beneath the eyes and lifting effect. Questions were used to collect structured data, using different monodic interval scales to measure attributes, according to the standards of substance of cosmetic claims (14).

Sensory evaluation of cosmetics questionnaire

The initial structure of the questionnaire is found in [Supplemental Materials](#) Appendix B. This instrument addresses the sensory profile of a tested cosmetic topical formulation. To obtain the sensory profile of the formulation, the sensory attributes that refer to the product itself were selected during the application process: consistency/texture, perfume/fragrance, absorption time and spreadability. Skin attributes were also selected to be evaluated after the application: stickiness, oiliness and softness (6,15–17).

celular para análise posterior. As entrevistas foram transcritas parcialmente focando nos momentos em que os respondentes demonstravam dificuldade ou alguma mudança de humor.

Foram utilizados um entrevistador experiente e outro não-experiente. Entrevistadores experientes rapidamente detectam insegurança, confusão e resistência por parte dos entrevistados ao responder as perguntas. O não-experiente identifica problemas relacionados com o entrevistador, garantindo que a aplicação do questionário seja robusta, uma vez que o resultado da pesquisa precisar ser independente de quem está aplicando o questionário (9).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (CAAE: 13367219.5.0000.5404).

Instrumento de coleta de dados

Questionário de autoavaliação da aparência da pele

A estrutura inicial do questionário encontra-se no [Materiais Suplementares](#) Apêndice A. Este foi desenvolvido com o objetivo de fornecer dados a respeito da aparência da pele. Os parâmetros avaliados por esse questionário foram a hidratação, firmeza, elasticidade, flacidez, rugas e linhas de expressão nos lábios/olhos/testa, luminosidade/viço, sinais de cansaço, uniformidade do tom da pele, intensidade e quantidade de manchas, vitalidade, poros aparentes, presença de olheiras e bolsas sob os olhos e efeito lifting. Foram utilizadas perguntas para coleta de dados estruturadas, utilizando-se diferentes escalas intervalares monádicas para a mensuração dos atributos, de acordo com as normas de substanciamento de claims cosméticos (14).

Questionário de avaliação sensorial de cosméticos

A estrutura inicial do questionário encontra-se no [Materiais Suplementares](#) Apêndice B. Este instrumento abordava o perfil sensorial de uma formulação tópica cosmética testada. Com o objetivo de obter o perfil sensorial da formulação, foram selecionados os atributos sensoriais que se referem ao produto em si, durante o processo de aplicação: consistência/ textura, perfume/fragrância, tempo de absorção e espalhabilidade. Também foram selecionados os atributos referentes a pele, avaliados após a aplicação: pegajosidade, oleosidade e maciez (6,15–17).

Table 1 - Categorization of the difficulties encountered in the initial questionnaires ([Supplemental Materials](#), Appendices A and B).

Tabela 1- Categorização das dificuldades encontradas nos questionários iniciais ([Materiais Suplementares](#) Apêndice A e B).

Categorization / Categorização	Definition / Definição	Examples / Exemplos
Conceptual / Conceitual	Difficulty in understanding the basic concept of the evaluated attributes. / Dificuldade de compreender o conceito básico dos atributos avaliados.	Not knowing the concept of freshness/luminosity. / Não saber o conceito de viço/luminosidade.
Conditional / Condicional	Difficulty in comprehending what the reference condition is for evaluating the question. / Dificuldade em compreender qual é a condição referência para avaliação da pergunta.	Not knowing whether skin should be evaluated with or without the use of cosmetic. / Não saber se a pele deve ser avaliada com ou sem o uso de cosmético.
Clinical self-assessment / Autoavaliação clínica	Difficulty in identifying the clinical signs of the attribute, even knowing its basic concept. / Dificuldade da identificação dos sinais clínicos do atributo, mesmo conhecendo seu conceito básico.	The interviewee does not know if his clinical condition is classified as dermatitis, although he knows the signs (dry skin, flaking, etc.). / O entrevistado não sabe se sua condição clínica é classificada como dermatite, embora saiba os sinais (pele seca, descamação, etc).
Temporal / Temporal	Difficulty in understanding at what time or frequency the attribute evaluation refers. / Dificuldade em entender em qual tempo ou frequência a avaliação do atributo se refere	Not knowing which period of the day (morning, afternoon or night) the attribute is being evaluated. / Não saber qual período do dia (manhã, tarde ou noite) o atributo está sendo avaliado.
Scale / Escala	Difficulty in using the scale to assess the attribute. / Dificuldade em utilizar a escala para avaliação do atributo.	Difficulty in using the intensity scale to assess the attribute / Dificuldade em utilizar a escala de intensidade para avaliação do atributo.

Data analysis

The answers obtained with the pretest were coded and analyzed (9). For the analysis of the qualitative material obtained in the interviews, the simple method of thematic content analysis was used (18). In relation to the quantitative data analysis process, the following steps were followed: establishment of categories; coding and tabulation; statistical analysis of the data (frequency, arithmetic mean, percentages, standard deviation, with aid of sector charts and others) (10,18).

After identifying and analyzing the problems encountered during the pretest, the questionnaires were edited and corrected (9).

Results

From the qualitative evaluation of the content of the interviews, the difficulties and suggestions pointed out by the participants during the interview were categorized according to Table 1.

Análise de dados

As respostas obtidas com o pré-teste foram codificadas e analisadas (9). Para a análise do material qualitativo obtido nas entrevistas, foi utilizado o método de análise temática de conteúdo simples (18). Em relação ao processo de análise de dados quantitativos, foram seguidos os seguintes passos: estabelecimento de categorias; codificação e tabulação; análise estatística dos dados (frequência, média aritmética, porcentagens, desvio padrão, com auxílios de gráficos de setores e outros) (10,18).

Depois de identificados e analisados os problemas encontrados, durante o pré-teste, os questionários foram editados e corrigidos (9).

Resultados

A partir da avaliação qualitativa do conteúdo das entrevistas, as dificuldades e sugestões apontadas pelos participantes durante a entrevista foram categorizadas de acordo com a Tabela 1.

Table 2 - Frequency (n) of the sociodemographic characteristics of the pretest participants of each questionnaire.
Tabela 2 - Frequência (n) das características sociodemográficas das participantes do pré-teste de cada questionário.

Sociodemographic characteristics / Características Sociodemográficas		Participants frequency (n) / Frequência (n)	
		Sensory analysis questionnaire / Questionário análise sensorial	Self assessment questionnaire Questionário autoavaliação
Age / Idade	30-39	6	7
	40-49	3	5
	50-60	6	3
Education Level / Grau de Escolaridade	Completed high school / Ensino Médio Completo	7	7
	Completed university / Ensino Superior Completo	5	3
	Post-graduate study / Pós-graduação	3	5
Skin color / Cor de pele	White / Branca	12	13
	Brown / Parda	3	2

The sociodemographic characteristics of the 15 women who pretested each questionnaire (sensory analysis and self-assessment) are described in Table 2.

No pré-teste de cada questionário foram incluídas 15 mulheres para cada análise, cujas características sociodemográficas estão descritas na Tabela 2.

Self-evaluation of skin appearance questionnaire

The frequencies at which misunderstandings and difficulties occurred in each category during the application of the pretest of questionnaire 1 are shown in Table 3.

Questionário autoavaliação da aparência da pele

As frequências em que ocorreram incompreensões e dificuldades em cada categoria durante a aplicação do pré-teste do questionário 1 estão demonstradas na Tabela 3.

As indicated, regarding the conceptual difficulties of questionnaire ([Supplemental Materials](#) Appendix A), it is verified that, in the item Medical and General History, the participants presented doubt in the concept of “neoplasia” and in the concept “psoriasis”. For this reason, a simple explanation of the health conditions was added to the question itself: “Neoplasms (tumor)” and “Psoriasis (chronic autoimmune skin disease, characterized by reddish spots covered by whitish scales)”.

Conforme indicado, no que concerne às dificuldades conceituais do questionário ([Materiais Suplementares](#) Apêndice A), verifica-se que, no item Histórico Médico e Geral, a participantes apresentaram dúvida no conceito de “neoplasia” e no conceito de “psoríase”. Por isso na própria questão foi adicionado uma simples explicação das condições de saúde: “Neoplasias (tumor)” e “Psoríase (doença de pele autoimune crônica, caracterizada por manchas avermelhadas recobertas por escamas esbranquiçadas)”.

Regarding the parameters evaluated by the intensity scale, there was some difficulty in understanding the words “lushness” and “luminosity” (Question 20), since the participants erroneously relate the terms to skin oiliness and sweat. Thus, he chose to remove this question from the questionnaire. In addition, some interviewees reported not knowing the definition of “elasticity” or could not distinguishing it from the meanings of “firmness” and “flaccidity”. Therefore, we removed the question regarding the flaccid attribute,

Com relação aos parâmetros avaliados pelas escalas de intensidade, houve bastante dificuldade na compreensão das palavras “viço” e “luminosidade” (Questão 20), uma vez que as participantes relacionavam erroneamente os termos com a oleosidade e suor da pele. Dessa forma, optou por retirar esta pergunta do questionário. Além disso, algumas entrevistadas relataram não conhecer a definição de “elasticidade” ou não conseguiram distingui-la dos significados de “firmeza” e “flacidez”. Por isso, retiramos a questão a respeito do atributo

Table 3 - Frequency (n) of each variable categorized in the skin self-assessment questionnaire ([Supplemental Materials](#) Appendix A).

Tabela 3 - Frequência (n) de cada variável categorizada no questionário de autoavaliação da pele ([Materiais Suplementares](#) Apêndice A).

Difficulties Categorization / Categorização das Dificuldades	Question number / Número da Questão	Frequency (n) / Frequência (n)
CONCEPTUAL / CONCEITUAL		
Neoplasia / Neoplasia	5	3
Psoriasis / Psoríase	5	2
Hydration / Hidratação	16	2
Firmness / Firmeza	17	2
Elasticity / Elasticidade	18	5
Flaccidity / Flacidez	19	2
Lushness/Luminosity / Viço/luminosidade	20	7
Uniformity / Uniformidade	24	3
Signs of Tiredness / Sinais de Cansaço	27	5
Vitality / Vitalidade	28	4
Beneath / Sob	29	2
CONDITIONAL / CONDICIONAL		
	10	3
	16	1
	28	1
	32	2
	33	2
CLINICAL SELF-ASSESSMENT / AUTOAVALIAÇÃO CLÍNICA		
Acne / Acne	5	2
Dermatitis / Dermatites	5	1
Expression lines / Linhas de Expressão	22/23	2
Spots / Manchas	26	1
Bags beneath the eyes / Bolsas sob os olhos	29	1
TEMPORAL DIFFICULTY / DIFICULDADE TEMPORAL		
	5	5
	29	1
	30	2
SCALE / ESCALA		
Frequency scale / Escala de frequência	14, 15	2
Numerical series (7 points) / Série numérica (7 pontos)	13-25, 27-31	7

as it is the most confusing term, according to the respondents, and added the following descriptions to the respective questions: “Firmness is characterized by firm skin, with tonus, consistency, support, opposite of flaccidity” and “Elasticity is characterized by flexibility of the skin, undergoes deformation when subjected to traction, and partially or totally returns to its original shape”. Some participants did not understand the attribute “signs of tiredness” and “skin uniformity”. The questions were considered vague and confusing by the interviewees. In these cases, phrases explaining the meaning of each item were also added.

flacidez, por ser o termo mais confuso, de acordo com as respondentes, e adicionamos as seguintes descrições nas respectivas questões: “Firmeza é caracterizada por uma pele firme, com tônus, consistência, sustentação, oposto de flacidez” e “Elasticidade é caracterizada por flexibilidade da pele, sofre deformação, quando submetido à tração, e retorna parcial ou totalmente à forma original”. Algumas participantes não compreenderam o atributo “sinais de cansaço” e “uniformidade da pele”. As questões foram consideradas vagas e confusas pelas entrevistadas. Nesses casos, também foram adicionadas frases explicando o significado de cada item.

In the data collection instrument, conditional difficulties were also identified in six questions. In question 10, the elements “aesthetic procedures” and “rejuvenating cosmetics” are evaluated in the same question. However, since only the item “aesthetic procedures” is exemplified in the question, it is not clear whether the use of cosmetics should be described with reference to performing these procedures together or not. To avoid this difficulty, the two elements were evaluated and exemplified in different questions in the modified version of the questionnaire.

The non-specification of a reference period in questions 29 and 30 made it difficult to evaluate the attributes by the volunteers who questioned whether the answers should be given based on the moment the instrument was applied or whether previous times should also be considered. The participants reported that the presence of bags under the eyes and dark circles depends a lot on the time of day and on factors such as sleep and stress. For this reason, time indicators were placed in the questions, such as, “Regarding the bags under the eyes, would you say that in the morning (...)”.

The difficulty of interpretation on the Likert scale was also reported by the participants, especially during the self-assessment of clinical attributes by the numerical scale of 7 and 9 points. In questions 14 and 15, some interviewees questioned the difference in the levels present between these frequency scales. To overcome the difficulties presented, the numerical scales were complemented with the corresponding explanations and numbers at each level.

All changes made in the questionnaire ([Supplemental Materials Appendix A](#)) are described in the final version of the manuscript as shown in [Supplemental Materials Appendix C](#).

Sensory evaluation of cosmetics questionnaire

The difficulties identified in the pretest of the sensory assessment instrument ([Supplemental Materials Appendix B](#)) are summarized in Table 4.

During the evaluation, the participants identified difficulties in conceptualizing the terms consistency/texture, absorption time, stickiness, and oiliness. To enable a better understanding of the terms, the interviewees suggested the inclusion of the terms “viscous” and “fluid” for better characterization of the attributes “consistency” and “texture” and the inclusion of the expression “drying time” for a clearer description

No instrumento de coleta de dados, foram identificadas também dificuldades condicionais em seis questões. Na Questão 10, os elementos “procedimentos estéticos” e “cosméticos rejuvenescedores” são avaliados na mesma pergunta. Entretanto, visto que somente o item “procedimentos estéticos” é exemplificado na questão, não fica claro se o uso dos cosméticos deve ser descrito com referência à realização desses procedimentos em conjunto ou não. A fim de evitar essa dificuldade, os dois elementos foram avaliados e exemplificados em perguntas separadas, na versão modificada do questionário.

A não especificação de um período de referência nas Questões 29 e 30 dificultou a avaliação dos atributos pelas voluntárias que questionaram se as respostas deveriam ser dadas com base no momento em que o instrumento foi aplicado ou se épocas anteriores também deveriam ser consideradas. As participantes reportaram que a presença de bolsa sob os olhos e olheiras depende muito do período do dia e de fatores como sono e estresse. Por isso foram colocados indicadores de tempo nas questões, como por exemplo, “Em relação as bolsas embaixo dos olhos, você diria que no período da manhã (...)”.

A dificuldade de interpretação na escala do tipo Likert também foi relatada, principalmente durante a autoavaliação dos atributos clínicos pela escala numérica de 7 pontos. Nas questões 14 e 15, alguns entrevistados questionaram a diferença dos níveis presentes entre essas escalas de frequência. Para contornar as dificuldades apresentadas, as escalas numéricas foram complementadas com as explicações correspondentes a cada nível.

Todas as alterações realizadas no questionário do [Materiais Suplementares Apêndice A](#) estão descritas na versão final do mesmo indicado no [Materiais Suplementares Apêndice C](#).

Questionário de avaliação sensorial de cosméticos

As dificuldades identificadas no pré-teste do instrumento de avaliação sensorial ([Materiais Suplementares Apêndice B](#)) foram sumarizadas na Tabela 4.

Durante a avaliação, foram identificadas dificuldades em conceituar os termos: consistência/ textura, tempo de absorção, pegajosidade e oleosidade. Para possibilitar uma melhor compreensão dos termos, os entrevistados sugeriram a inclusão dos termos “viscoso” e “fluido” para melhor caracterização dos atributos “consistência e textura” e a inclusão da expressão “tempo de secagem”

Table 4 - Frequency (n) of each variable categorized in the sensory assessment questionnaire.
Tabela 4 - Frequência (n) de cada variável categorizada no questionário de avaliação sensorial.

Difficulties Categorization / Categorização das Dificuldades	Question number / Número da Questão	Frequency (n) / Frequência (n)
CONCEPTUAL / CONCEITUAL		
Consistency/Texture / Consistência/Textura	4	2
Perfume/Fragrance / Perfume/Fragrância	6	1
Absorption Time / Tempo de absorção	7, 8	2
Stickiness / Pegajosidade	11	1
Oiliness / Oleosidade	13	2
CONDITIONAL / CONDICIONAL		
Consistency/Texture / Consistência/ Textura	4	6
Absorption Time / Tempo de absorção	7	1
Stickiness / Pegajosidade	11, 12	1
Oiliness / Oleosidade	14	1
SCALE / ESCALA		
Hedonic scale (9 points) / Escala hedônica (9 pontos)	3, 13	2
Intensity scale (7 points) / Escalada de intensidade (7 pontos)	8, 17	3

of the attribute “absorption time”. In addition, all sensory parameters were defined in the question header.

Regarding the conceptual difficulties, in Question 6, one of the interviewees found that the alternative “neither weak nor strong” was defined as a negative attribute, when in fact the expression means only indecision on the part of the respondent. Thus, this item was replaced by “appropriate”, transmitting as well as a more impartial adjective.

As observed in [Supplemental Materials](#) Appendix B, from questions 3 to 16, the same attribute was evaluated from the interviewee’s opinion with a 9-point scale and from the sensory assessment of this attribute with intensity scales. However, some participants pointed out that they could not differentiate the conditions of references of these two forms of evaluation for the same attribute, indicating a difficulty of conditional character. This same category was identified in question 11. Nonetheless, the interviewee reported not understanding whether the question was a personal and hedonic opinion of the attribute or whether it should be evaluated as if there was an exact and more correct answer. To solve the conditional problems, the question header about the participant’s personal evaluation of the attribute was restructured.

para uma descrição mais clara do atributo “tempo de absorção”. Além disso, todos os parâmetros sensoriais foram definidos no cabeçalho da pergunta.

Ainda sobre as dificuldades conceituais, na Questão 6, uma das entrevistadas achou que a alternativa “nem fraco nem forte” era definida como um atributo negativo, quando na verdade a expressão significa apenas indecisão por parte do respondente. Sendo assim, este item foi substituído por “adequado”, transmitindo assim como um adjetivo mais imparcial.

Conforme é observado no [Materiais Suplementares](#) Apêndice B, da Questão 3 a 16, um mesmo atributo foi avaliado a partir da opinião pessoal do entrevistado com escalas de 9 pontos e a partir da avaliação sensorial acerca desse atributo com escalas de intensidade. Contudo, alguns participantes apontaram não conseguir diferenciar as condições de referências dessas duas formas de avaliação para o mesmo atributo, indicando uma dificuldade de caráter condicional. Essa mesma categoria foi identificada na Questão 11. Entretanto, a entrevistada relatou não entender se a pergunta se tratava de uma opinião pessoal e hedônica do atributo ou se esse deveria ser avaliado como se houvesse uma resposta exata e mais correta. Para resolução dos problemas condicionais, o cabeçalho das perguntas sobre a avaliação pessoal do participante acerca do atributo foi reestruturado.

Regarding scale misunderstandings, the participants reported difficulty in understanding both the 7-point and 9-point scale levels. It was observed that the interviewees were often marking only the extremes of the scale, not making use of intermediate levels. To work around this problem, explanations and numbers were added at each level to facilitate their general understanding.

All changes made in [Supplemental Materials](#) Appendix B are described in the final version of the version as shown in [Supplemental Materials](#) Appendix D.

Discussion

For the questionnaires to present consistent and reliable results, several factors must be considered during their development, such as the social, cultural, and psychological aspects of the target audience. In addition, they should be elaborated in a simple, easy-to-understand manner, avoiding ambiguous questions (19,20).

With the purpose of these requirements being met, the questionnaire should be pretested in a heterogeneous public (but within the target public), with people of different age groups and socio-educational profile in order to know what these characteristics influence in the understanding during the execution of the questionnaire (21). In this way, possible problems and inconsistencies in its completion can be detected, minimizing difficulties during the development of the study (22,23).

This work described five categories of problems that can be encountered during the elaboration of a questionnaire to substantiate cosmetic claims, as well as some options that can solve them.

The semantic validation is essential to ensure the correct understanding of all items by the interviewees, avoiding divergent interpretations of the intention expressed by the researcher. To this end, it is necessary that this step considers the relevance and coherence of all elements for the population to which the instrument is directed (24,25). In this study, it is noted that these semantic difficulties represent an unfamiliarity of technical level, making it impossible to differentiate the particularities of each term; thus, it is important that all attributes evaluated are defined and explained in each question.

Com relação às incompreensões de escala, as participantes relataram dificuldade em entender os níveis das escalas de 7 e 9 pontos. Foi observado que muitas vezes as entrevistadas estavam assinalando apenas os extremos da escala, não fazendo uso dos níveis intermediários. Para contornar esse problema, foram acrescentadas explicações e números em cada nível para facilitar o entendimento geral dos mesmos.

Todas as alterações realizadas no [Materiais Suplementares](#) Apêndice B estão descritas na versão final do mesmo indicado no [Materiais Suplementares](#) Apêndice D.

Discussão

Para que os questionários apresentem resultados consistentes e confiáveis, diversos fatores devem ser levados em consideração durante seu desenvolvimento como o perfil social, cultural e aspectos psicológicos do público-alvo. Além disso, devem ser elaborados de maneira simples, de fácil compreensão, evitando perguntas ambíguas (19,20). Com o propósito desses requisitos serem cumpridos, o questionário deve ser pré-testado em um público heterogêneo (mas dentro do público-alvo), com pessoas de variadas faixas etárias e perfil sócio educacional a fim de saber o que essas características influenciam no entendimento durante a execução do questionário (21). Desse modo, os possíveis problemas e inconsistências em seu preenchimento podem ser detectados, minimizando as dificuldades durante o desenvolvimento do estudo (22,23).

Este trabalho descreveu cinco categorias de problemas que podem ser encontrados durante a elaboração de um questionário para substantiação de claims cosméticos, bem como algumas opções que podem solucioná-los.

A validação semântica mostra-se essencial para garantir a compreensão correta de todos os itens pelos entrevistados, evitando interpretações divergentes da intenção expressa pelo pesquisador. Para tal, é necessário que essa etapa considere a relevância e coerência de todos os elementos para a população a qual o instrumento é direcionado (24,25). Nesse estudo, nota-se que essas dificuldades semânticas representam um desconhecimento de nível técnico que impossibilita a diferenciação das particularidades de cada termo, sendo, desse modo, importante que todos os atributos avaliados sejam definidos e explicados em cada questão.

Although the interviewee may know the technical definition of the attributes questioned, another difficulty identified was clinical self-assessment. For the questionnaire information to be provided more reliably, it is important that the interviewee has already received a previous diagnosis of the clinical condition evaluated. However, self-assessment can be used as an important tool for measuring the quality of life of participants (26,27).

Based on the analysis of the answers obtained, it was also observed that some participants did not understand the reference condition (conditional category) or the time and frequency (temporal category) at which the parameters should be evaluated. It is, therefore, necessary that the questions be drawn up in a clear, concrete, and precise way. The questions present in the instrument should also consider the reference system of the interviewee, his level of information, in addition to allowing a single interpretation and referring to one idea at time (18,28).

There are reports in the literature of the use of pretests in diverse areas, such as nutrition (22,29), social well-being (30,31), questionnaire adaptation in foreign languages (32,33), marketing and sales of the product (34), economy (35), and sociopolitical (36). There are similarities between this study and the pretest studies found in the literature, such as the need to explain technical terms or their exchange (29,32,35–37), clarify the use of scales and change them for a greater understanding (21,30,34). To assess the intensity of the attributes, numbers and verbal explanations were added to the intensity scales from 5 to 7 points (30). For the hedonic evaluation, the nine-point scale anchored with “Dislike extremely” and “like extremely” was maintained, because despite being more difficult to understand, when it comes to acceptance questions, the nine-point hedonic scale is considered the most reliable, valid and practical scale (4).

In addition, limitations were identified that can be harmful to the final result, such as the number of interviewees being lower than the number of people who will be interviewed with the final questionnaire (22). The importance of performing the pretest process was also scored within these articles, such as an easier understanding (27,33), as well as the fact that corrections prevent the results from being manipulated due to erroneously given answers (37).

Embora o entrevistado possa conhecer a definição técnica dos atributos questionados, outra dificuldade identificada foi a de autoavaliação clínica. Para que as informações do questionário sejam fornecidas de forma mais confiável, é importante que a entrevistada já tenha tido a confirmação de um diagnóstico prévio da condição clínica avaliada. Contudo, a autoavaliação pode ser utilizada como uma importante ferramenta para a mensuração da qualidade de vida dos participantes (26,27).

Com base na análise das respostas obtidas, observou-se ainda que alguns participantes não compreenderam a condição de referência (categoria condicional) ou o tempo e frequência (categoria temporal) os quais os parâmetros deveriam ser avaliados. Por conseguinte, é necessário que as perguntas sejam elaboradas de forma clara, concreta e precisa. As questões presentes no instrumento também devem considerar o sistema de referência do entrevistado, seu nível de informação, além de possibilitar uma única interpretação e referir-se a uma ideia de cada vez (18,28).

Há relatos na literatura do uso do pré-teste em diversificadas áreas como nutrição (22,29), bem-estar social (30,31), adaptação dos questionários em línguas estrangeiras (32,33), marketing e vendas do produto (34), economia (35) e sociopolítica (36). Existem semelhanças entre o estudo aqui feito e os estudos de pré-teste encontrados na literatura, como por exemplo a necessidade de explicar termos técnicos ou a troca dos mesmos (29,32,35–37), esclarecer o uso de escalas assim como alterá-las para um maior entendimento (21,30,34). Para a avaliação de intensidade dos atributos, nas escalas de intensidade de 5 a 7 pontos foram adicionados números e explicações verbais (30). Para a avaliação hedônica, foi mantida a escala de nove pontos ancoradas com “desgostei muitíssimo” e “gostei muitíssimo”, porque apesar de serem de mais difícil entendimento, quando trata-se de perguntas de aceitação, a escala hedônica de nove pontos é considerada a escala mais confiável, válida e de valor prático (4).

Além disso, foram identificadas limitações que podem ser prejudiciais ao resultado final como por exemplo o número de entrevistados ser um número menor do que o número de pessoas que serão entrevistadas com o questionário final (22). Foram pontuados também dentro destes artigos, a importância da realização do processo de pré-teste, como por exemplo a compreensão ficar mais facilitada (27,33), assim como o fato de que as correções evitam com que os resultados sejam manipulados devido respostas erroneamente dadas (37).

Conclusions

The analysis of the pretest is very important to identify any types of errors that prevent the interviewee from fully understanding the instrument, and its correction is important so that the moment of response to the questionnaire does not become an unpleasant moment for the participant. The survey of the difficulties encountered, as well as the changes made to the data collection instrument, lead to a greater understanding of the tool by the respondents, and to the development of a more effective and reliable tool for substantiation of cosmetic claims.

The methodology of how to carry out a pre-test, its applicability and its improvement was also described, which is of great applicability for the cosmiatry sector. The method used here can be used for other questionnaires and extended to the most diverse areas of studies involving humans.

Authors Contributions Statement

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

Funding

This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES No. 88887.489753/2020-00), and the São Paulo Research Foundation (FAPESP No. 2020/08516-0).

Acknowledgements

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the São Paulo Research Foundation (FAPESP), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their financial support.

Conflict of Interests

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

Conclusão

A análise do pré-teste é muito importante para identificar quaisquer tipos de erros que impeçam a total compreensão do instrumento pelo entrevistado, e sua correção é importante para que o momento de resposta ao questionário não se torne um momento desagradável para o participante. O levantamento das dificuldades encontradas, bem como as alterações realizadas no instrumento de coleta de dados, leva a uma maior compreensão da ferramenta pelos respondentes, e ao desenvolvimento de uma ferramenta de substanciação de claims cosméticos mais eficaz e confiável.

Também foi descrita a metodologia de como realizar um pré-teste, suas aplicabilidades e o seu aperfeiçoamento, sendo essa de grande aplicabilidade para o setor de cosmiatria. O método aqui usado pode ser utilizado para outros questionários e ampliado para as mais diversas áreas de estudos envolvendo humanos.

Declaração sobre as contribuições dos autores

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

Financiamento

Esse estudo foi financiado pelo Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES n. 88887.489753/2020-00) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP n. 2020/08516-0).

Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), 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

- Fibrich, B. D., & Lall, N. (2018). Fighting the Inevitable: Skin Aging and Plants. In *Medicinal Plants for Holistic Health and Well-Being* (pp. 77–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812475-8.00003-2>
- ABIHPEC. (2018). *Caderno de Tendências higiene pessoal, perfumaria e cosméticos 2019-2020*. <https://abihpec.org.br/publicacao/caderno-de-tendencias-2019-2020/>
- ABIHPEC. (2020). *The future of the beauty market: new habits brought about by the pandemic should remain high even after the crisis*. ABIHPEC - Brazilian Association of the Personal Hygiene, Perfumery and Cosmetics Industry. <https://abihpec.org.br/o-futuro-do-mercado-de-beleza-novos-habitos-trazidos-pela-pandemia-devem-continuar-em-alta-mesmo-depois-da-crise/>
- Guidelines for cosmetic product claim substantiation - Revising and expanding the Colipa Guidelines on Efficacy*. (2019). Cosmetics Europe - The Personal Care Association. <https://cosmetics europe.eu/library/>
- Galdorfini, B., de Almeida, M. G. J., Antonio, M., & Borges Isaac, V. L. (2012). Cosmetics' Quality Control. In *Latest Research into Quality Control*. InTech. <https://doi.org/10.5772/51846>
- Vergilio, M. M., de Freitas, A. C. P., & da Rocha-Filho, P. A. (2022). Comparative sensory and instrumental analyses and principal components of commercial sunscreens. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 21(2), 729–739. <https://doi.org/10.1111/jocd.14113>
- Estanqueiro, M., Amaral, M. H., & Sousa Lobo, J. M. (2016). Comparison between sensory and instrumental characterization of topical formulations: impact of thickening agents. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(4). <https://doi.org/10.1111/ics.12302>
- Lucian, R., & Dornelas, J. S. (2015). Mensuração de Atitude: Proposição de um Protocolo de Elaboração de Escalas. *Revista de Administração Contemporânea*, 19(spe2). <https://doi.org/10.1590/1982-7849rac20151559>
- Malhotra, N. (2012). *Pesquisa de marketing: uma orientação aplicada* (6ª edição). Bookman.
- Gil, A. C. (2002). *Como elaborar projetos de pesquisa* (4ª edição). Atlas.
- Campos, C. J. G. (2004). Content analysis: a qualitative data analysis tool in health care. *Revista Brasileira de Enfermagem*, 57(5), 611–614. <https://doi.org/10.1590/S0034-71672004000500019>
- Moraes, R. (1999). Análise de Conteúdo. *Revista Educação*, 22(37), 7–32.
- Domicio, I., Souza, S., Fuzio, T. S., & Takahashi, V. P. (2013). Estudo exploratório da percepção dos consumidores de cosméticos para os cuidados com a pele. *XXI Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos*, 1–13.
- ASTM. (2019). Standard Guide for Sensory Claim Substantiation. In A. International (Ed.), *Annual Book of ASTM Standards* (Vol. 00, Issue Reapproved, pp. 1–5). West Conshohocken. <https://doi.org/10.1520/G0161-00R06.2>
- Civille, G. V., Carr, B. T., & Meilgaard, M. C. (2016). *Sensory Evaluation Techniques* (5th ed). CRC Press.
- Mello, L. S. S., Almeida, E. L., & Melo, L. (2019). Discrimination of sensory attributes by trained assessors and consumers in semi-sweet hard dough biscuits and their drivers of liking and disliking. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.FOODRES.2019.01.031>
- Lim, J. (2011). Hedonic scaling: A review of methods and theory. *Food Quality and Preference*, 22(8), 733–747. <https://doi.org/10.1016/J.FOODQUAL.2011.05.008>
- Bardin, L. (2015). *Análise de Conteúdo* (70 Edições (Ed.); 1st ed.). Almedina Br.
- Segot-Chicq, E., Compañ-Zaouati, D., Wolkenstein, P., Consoli, S., Rodary, C., Delvigne, V., Guillou, V., & Poli, F. (2007). Development and validation of a questionnaire to evaluate how a cosmetic product for oily skin is able to improve well-being in women. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 0(0), 070807043105001-???. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2007.02193.x>
- Henkel, K. (2017). A categorização e a validação das respostas abertas em surveys políticos. *Opinio Publica*, 23(3), 786–808. <https://doi.org/10.1590/1807-01912017233786>
- Sardinha, A., Levitan, M. N., Lopes, F. L., Perna, G., Esquivel, G., Griez, E. J., & Nardi, A. E. (2010). Tradução e adaptação transcultural do Questionário de Atividade Física Habitual. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, 37(1), 16–22. <https://doi.org/10.1590/S0101-60832010000100004>
- Carvalho, F. S., Van Laer, N. M., Sachs, A., de Salvo, V. L. M. A., Coelho, L. de C., dos Santos, G. M. S., Akutsu, R. de C., & Asakura, L. (2010). Desenvolvimento e pré-teste de um questionário de frequência alimentar para graduandos. *Revista de Nutricao*, 23(5), 847–857. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000500015>
- Perneger, T. V., Courvoisier, D. S., Hudelson, P. M., & Gayet-Ageron, A. (2015). Sample size for pre-tests of questionnaires. *Quality of Life Research*, 24(1), 147–151. <https://doi.org/10.1007/s11136-014-0752-2>
- Fuzissaki, M. de A., Santos, C. B. dos, Almeida, A. M. de, Gozzo, T. O., & Clapis, M. J. (2016). Validação semântica de instrumento para identificação da prática de enfermeiros no manejo das radiodermatites. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, 18, e1142. <https://doi.org/10.5216/ree.v18.35164>
- Silva, L.M., Surniche, C.D., Sicsú, A.N., Mitano, F., Nogueira, J.D., Santos, C.B., Cunha, F.T., & Palha, P.F. (2015). Elaboração e validação semântica de um instrumento de avaliação da transferência do tratamento diretamente observado como política de controle da tuberculose. *Revista Panamericana De Salud Publica-pan American Journal of Public Health*, 38, 129-135.
- Grob, J.J., Auquier, P., Martin, S., Lançon, C., & Bonerandi, J.J. (1999). Development and Validation of a Quality of Life Measurement for Chronic Skin Disorders in French: VQ-Dermato. *Dermatology*, 199, 213 - 222.
- Lob-Corzilius, T., Böer, S., Scheewe, S., Wilke, K., Schon, M., Schulte im Walde, J., Diepgen, T.L., Gieler, U., Staab, D., Werfel, T., Schmid-Ott, G., Fartasch, M., Wittenmeier, M., Schnopp, C., Kupfer, J., v. Schlippe, A., Szczepanski, R., & Keins, P. (2004). The 'Skin Detective Questionnaire': A Survey Tool for Self-Assessment of Patients with Atopic Dermatitis. First Results of Its Application. *Dermatology and Psychosomatics / Dermatologie und Psychosomatik*, 5, 141 - 146.
- Jones, T. L., Baxter, M. A., & Khanduja, V. (2013). A quick guide to survey research. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 95(1), 5–7. <https://doi.org/10.1308/003588413X13511609956372>
- Oliveira, L., Poínhos, R., Sousa, F. & Silveira, M. G(2016) Construção e Validação de um Questionário para Avaliação da Percepção sobre Alimentos Funcionais. *Acta Portuguesa de Nutrição*. 7, 14-17. <https://doi.org/10.21011/apn.2016.0704>
- Hilton C. E. (2017) The importance of pretesting questionnaires: a field research example of cognitive pretesting the Exercise referral Quality of Life Scale (ER-QLS). *International Journal of Social Research Methodology* 20, 21–34. <https://doi.org/10.1080/13645579.2015.1091640>
- Del Castillo, L., Leporace, G., Cardinot, T., Levy, R.A., Oliveira, L.P. (2012) A importância dos questionários para avaliação da qualidade de vida. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ*, 11 (1), 12-17.
- Chor D, Alves M G de M, Giatti L et al. (2013) Questionario do ELSA-Brasil: desafios na elaboracao de instrumento multidimensional. *Revista Saude Publica* 47 (Suppl 2), 27–36. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047003835>.
- Marx, F. C., de Oliveira, L. M. Bellini, C.G., Ribeiro, M.C.C. (2006) Tradução e validação cultural do questionário algofuncional de Lequesne para osteoartrite de joelhos e quadris para a língua Portuguesa. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 46, 253–260.
- Vuolle, M., Tiainen, M., Kallio, T., Vainio, T., Kulju, M., & Wigelius, H. (2008). Developing a questionnaire for measuring mobile business service experience. *Mobile HCI*.
- Dikko, M. (2016). Establishing Construct Validity and Reliability: Pilot Testing of a Qualitative Interview for Research in Takaful (Islamic Insurance). *The Qualitative Report*, 21(3), 521-528. <https://doi.org/10.46743/2160-3715/2016.2243>
- Alhujran, O. Determinants of e-government services adoption in developing countries: a field survey and a case study, Doctor of Philosophy thesis, School of Information Systems and Technology, Faculty of Informatics, University of Wollongong, 2009. <https://ro.uow.edu.au/theses/1998>
- Moreira, R. S., Magalhães, L de C, Siqueira, C. M., Alves, C.R.L. (2019) Cross-cultural adaptation of the child development surveillance instrument "Survey of Wellbeing of Young Children (SWYC)" in the Brazilian context. *Journal of Human Growth and Development* 29, 28–38. <http://dx.doi.org/10.7322/jhgd.145001>

Evaluation of the influence of the application of a cosmetic formulation on the skin morphological characteristics by Reflectance Confocal Microscopy

Avaliação da influência da aplicação de uma formulação cosmética nas características morfológicas da pele por Microscopia Confocal de Reflectância

Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos* & Gabriela Maria D'Angelo Costa

School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Av do Café, s/nº, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil 14040-903

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

Abstract

Reflectance Confocal Microscopy (RCM) is a non-invasive imaging technique with near-histological resolution that allows evaluation of the morphological and structural characteristics of the skin. In this context, the aim of the study was to evaluate the influence of the application of a cosmetic formulation on the skin morphological characteristics by RCM. The study included six female subjects, aged 40 to 50 years. Measurements in terms of epidermis thickness, dermal papillae depth (DPD), interkeratinocytes brightness (IB), furrows morphology, skin surface homogeneity (SSH), honeycomb pattern, skin hyperpigmentation, dermal papillae and dermis morphology were performed using RCM before and after a 90-day period of formulation application on the face. The studied formulation showed a significance increase of DPD after the 90 day period, showing an improvement on the dermal-epidermal junction (DEJ). In addition, an increase of IB in the granular layer and an improvement of dermis morphology were observed after the treatment. In conclusion, the obtained results by RCM showed an improvement of morphological characteristics of the skin after application of the studied cosmetic formulation for 90 day period when compared to the initial baseline, as it improved epidermis and dermoepidermal junction morphology.

Keywords: Clinical efficacy, Reflectance Confocal Microscopy, cosmetic formulation

Resumo

A Microscopia Confocal de Reflectância (MCR) é uma técnica de imagem não invasiva com resolução próxima da histológica que permite avaliar as características morfológicas e estruturais da pele. Neste contexto, o objectivo do estudo foi avaliar a influência da aplicação de uma formulação cosmética nas características morfológicas da pele por MCR. O estudo incluiu seis mulheres, idade 40 a 50 anos. Medições em termos de espessura da epiderme, profundidade das papilas dérmicas (PPD), brilho interqueratinócitos (BI), morfologia dos sulcos, homogeneidade da superfície da pele (HSP), padrão de favo de mel, hiperpigmentação da pele, papilas dérmicas e morfologia da derme foram realizadas antes e após 90 dias de aplicação da formulação na face por MCR. A formulação estudada mostrou um aumento significativo da PPD e melhoria na morfologia da junção dérmico-epidérmica (JDE), após 90 dias de tratamento. Além disso, houve um aumento do BI na camada granular e melhoria da morfologia da derme. Em conclusão, os resultados obtidos por MCR mostraram melhoria das características morfológicas da pele após a aplicação da formulação cosmética estudada durante o período de 90 dias, em comparação com o basal – tempo inicial, uma vez que melhorou a morfologia das epiderme, papilas dérmicas e junção dermoepidérmica.

Palavras-chave: Eficácia clínica, Microscopia Confocal Reflectância, formulação cosmética

Introduction

The search for active ingredients to improve the characteristics of skin aging is important for innovation in the cosmetic area. Thus, clinical efficacy studies are necessary to prove the effectiveness of cosmetic formulations containing these active ingredients (1,2,3).

Skin aging is a process induced by intrinsic and extrinsic factors (4). The changes of intrinsic aging are the presence of a thinner epidermis, decreased depth of the dermoepidermal junctions that compromise skin nutrition, and decrease basal cell proliferation (5,6). Solar radiation significantly contributes to accelerated skin aging by promoting photoaging, which results in skin changes such as an increased of collagen degradation, presence of solar elastosis and hyperpigmentations regardless of chronological age or sex (7,8).

There are active ingredients that can improve aged skin conditions. Peptides have been used in cosmetics since they have presented potential for the skin care (9). In addition, di- and tripeptides extracted from rice (*Oryza sativa*) are compatible with the skin and present potential for application in cosmetic formulation for the treatment of aging skin (10).

A previous study of our research group (Maia Campos et al., 2019) showed that a cosmetic formulation with di- e tripeptides from rice was effective in the improvement of skin elasticity and dermis density for women aged 40 to 50 years (10). Another study from our research group, Shirata et al (2021), showed that cosmetic formulations containing rice di- and tripeptides were effective for the improvement of skin hydration and the prevention of skin photodamage in young age groups (11). Thus, the evaluation of skin morphological and structural characteristics is very important to elucidate the efficacy of cosmetics in dermis epidermal junction, dermal papillae and collagen morphology in the papillary dermis.

Clinical studies using instrumental measurements such as non-invasive imaging techniques are very important to evaluate the efficacy of cosmetic products in real conditions of use (3,7,10,12). Reflectance Confocal Microscopy (RCM) is a non-invasive advanced imaging technique with near to histological resolution

Introdução

A procura de ingredientes activos para melhorar as características do envelhecimento cutâneo é importante para a inovação na área cosmética. Assim, são necessários estudos de eficácia clínica para provar a eficácia de formulações cosméticas adicionadas destes princípios activos (1,2,3).

O envelhecimento cutâneo é um processo induzido por factores intrínsecos e extrínsecos (4). As alterações do envelhecimento intrínseco são a presença de uma epiderme mais fina, a diminuição da profundidade das junções dermoepidérmicas que comprometem a nutrição da pele e diminuem a proliferação das células basais (5,6). A radiação solar contribui significativamente para acelerar o envelhecimento cutâneo ao promover o fotoenvelhecimento, o que resulta em alterações cutâneas tais como um aumento da degradação do colagénio, presença de elastose solar e hiperpigmentações, independentemente da idade cronológica ou sexo (7,8).

Existem ingredientes activos que podem melhorar as condições da pele fotoenvelhecida. Os peptídeos têm sido utilizados em cosméticos desde que apresentam potencial para os cuidados da pele. (9). Além disso, di- e tripeptídeos extraídos do arroz (*Oryza sativa*) são compatíveis com a pele e vem mostrando eficácia na melhora das condições da pele envelhecida (10).

Um estudo anterior do nosso grupo de investigação (Maia Campos et al., 2019) mostrou que uma formulação cosmética contendo di- e tripeptídeos do arroz foi eficaz na melhora da elasticidade da pele e da densidade da derme de mulheres com idades entre os 40 e 50 anos (10). Outro estudo do nosso grupo de investigação, Shirata et al (2021), mostrou que formulações cosméticas com di e tripeptídeos do arroz foram eficazes na melhora da hidratação da pele e na prevenção do fotodano cutâneo em grupos etários jovens (11). Assim, a avaliação das características morfológicas e estruturais da pele é muito importante para elucidar a eficácia de cosméticos na junção dermo epidérmica, da derme papilar, papilas dérmicas e morfologia do colágeno na derme papilar.

Os estudos clínicos que utilizam medições instrumentais, tais como técnicas de imagem não invasivas, são muito importantes para avaliar a eficácia dos produtos dermocosméticos em condições reais de utilização (3,7,10,12). A Microscopia Confocal Reflectância (MCR) é uma técnica de imagem avançada não invasiva com uma resolução próxima da histológica que permite avaliar as características morfológicas e estruturais

that allows evaluation of morphological and structural skin characteristics in real time. It is a technique widely used in dermatology and can be applied in the cosmetic area to characterize different types of skin and evaluate the effectiveness of cosmetics without the need for biopsies (12, 13).

In this context, the application of RCM to evaluate the clinical efficacy of cosmetic formulations can bring an important contribution to elucidate the benefits of application of these formulations in the treatment of photoaged skin.

Thus, the aim of the study was to evaluate the influence of the application of a cosmetic formulation containing di- and tripeptides of hydrolyzed rice protein on the skin morphological characteristics by Reflectance Confocal Microscopy.

Materials and methods

Study Design

After approval by Ethics Committee of Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo (CEP/FCFRP nº339), six female subjects, aged 40-55 years (mean age $48 \pm$ SD: 4.95 years), skin Fitzpatrick Phototypes II and III, Caucasian descent were enrolled. (mean age: $48.09 \pm$ SD: 4.85 years)

A cosmetic formulation based on hydroxyethylcellulose (1.8%), methylphenyl polysiloxane (2.0%), cyclomethicone (1.5%), cyclomethicone and crosspolymer dimethicone (1.5%), hydrosoluble filter UVA/UVB (7.5%), propylene glycol (2.5%), glycerin, 2-Phenoxyethanol (And) Methylisothiazolinone (0.8%), (And) Aqua/Water was added to 4% of the di- and tripeptides of hydrolyzed rice protein and applied on the face twice a day by subjects for a 90 day period. Instrumental measurements by RCM were performed before (baseline) and after 90 days of the application of studied formulation in the periorbital region of the face. The subjects were required to remain in the laboratory [located in the School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil ($21^{\circ}100$ S, $47^{\circ}480$ W)] with controlled climatic conditions of $21.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and $50 \pm 5\%$ of relative humidity for 20 minutes before the beginning of the measurements.

da pele em tempo real. É uma técnica amplamente utilizada em dermatologia e pode ser aplicada na área cosmética para caracterizar diferentes tipos de pele e avaliar a eficácia dos cosméticos sem a necessidade de biópsias (12, 13).

Neste contexto, a aplicação de MCR para avaliar a eficácia clínica de formulações cosméticas traz uma importante contribuição para elucidar os reais benefícios da aplicação dessas formulações para o tratamento da pele fotoenvelhecida.

Assim, o objectivo deste estudo foi avaliar a influência da aplicação de uma formulação cosmética contendo di- e tripeptídeos de proteína de arroz hidrolisado nas características morfológicas da pele por Microscopia Confocal de Reflectância.

Material e métodos

Desenho do estudo

Após aprovação pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (CEP/FCFRP nº339), seis participantes de pesquisa do sexo feminino, com idades entre os 40-55 anos (média $48 \pm$ DP: 4.95 anos), pele com fototipo de Fitzpatrick II e III, caucasiano descendente foram recrutados. Uma formulação dermocosmética à base de hydroxyethylcellulose (1,8%), methylphenyl polysiloxane (2,0%), cyclomethicone (1,5%), cyclomethicone and crosspolymer dimethicone (1,5%), hydrosoluble filter UVA/UVB (7,5%), propylene glycol (2,5%), glycerin (2,5%), 2-Phenoxyethanol (e) Methylisothiazolinone (0,8%) (e) Aqua/Water foi adicionada de 4% do di- e tripeptídeos de proteína de arroz hidrolisado e aplicada no rosto duas vezes por dia por indivíduos durante um período de 90 dias. Foram realizadas medições instrumentais MCR antes (basal) e após 90 dias da aplicação da formulação estudada na região periorbital do rosto. As participantes de pesquisa tiveram de permanecer no laboratório [localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil ($21^{\circ}100$ S, $47^{\circ}480$ W)] com condições climáticas controladas de $21,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $50 \pm 5\%$ de humidade relativa durante 20 minutos antes do início das medições.

**Table 1 - Reflectance Confocal Microscopy parameters to assess the epidermis thickness. /
 Tabela 1 - Parâmetros Microscopia Confocal de Reflectância para avaliar a espessura da epiderme.**

RCM parameters / Parâmetros MCR	Description / Descrição
Stratum Corneum Thickness / Espessura do estrato córneo	Distance between the beginning of the stratum corneum and the beginning of the stratum granulosum / Distância entre o início do estrato córneo e o início da camada granulosa
Granular Layer Thickness / Espessura da camada granular	Distance between the beginning of the stratum granulosum and the beginning of the stratum spinosum / Distância entre o início da camada granulosa e o início da camada espinhosa
Dermal Papillae Depth / Profundidade da papilla dérmica	Beginning to the end of the dermal papillae / Distância do início e o fim da papilla dérmica
Minimum Epidermis Thickness / Espessura mínima da epiderme	Distance between the end of the stratum corneum and the beginning of the dermal papillae / Distância entre o fim estrato córneo e o início das papilas dérmicas
Maximum Epidermis Thickness / Espessura máxima da epiderme	Distance between the end of the stratum corneum and the end of the dermal papillae / Distância entre o fim do estrato córneo e o fim das papilas dérmicas
Mean Epidermis Thickness / Espessura média da epiderme	Sum of minimum and maximum thickness divided by 2 / Soma da espessura mínima e máxima dividida por 2
Total Epidermis Thickness / Espessura total da epiderme	Distance between the beginning of the stratum corneum and the end of the dermal papillae / Distância entre o início do estrato córneo e o fim das papilas dérmicas

Skin imaging technique - RCM

Reflectance Confocal Microscopy (VivaScope® 1500, Lucid, New York, USA) emits a low-powered laser (22 mW) with a wavelength close to the infrared (830 nm). This equipment obtains several microscopic images captured as horizontal sections with a field of view of 500 x 500 µm and a high-resolution of 1000 x 1000 pixels. The VivaStack® program allows the capture of images in depth from the stratum corneum to the papillary dermis. The depth of the layers, dermal papillae depth and epidermis thickness is calculated with the “z-depth” (Table 1). Analyzes of interkeratinocyte brightness, furrows morphology and skin surface homogeneity were performed using a standardized score in our NEATEC (Center of Advanced Studies in Cosmetic Technology) research group (14).

In addition, other scores adapted from Longo et al. (2013) were assessed as honeycomb pattern, skin hyperpigmentation, dermal papillae morphology, dermis morphology (15). The score definitions are shown in Table 2.

Statistical analysis

The normal distribution of the data was evaluated by the Shapiro-Wilk test in the OriginPro® 8 software. After defining whether the data were parametric or non-parametric, the paired Student's t or Wilcoxon tests were performed, respectively. GraphPad Prism® 5 software was used to perform the statistical analyses. The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Técnica de imagem da pele - MCR

Microscopia Confocal Reflectância (VivaScope® 1500, Lucid, New York, USA) emite um laser de baixa potência (22 mW) com um comprimento de onda próximo do infravermelho (830 nm). Este equipamento obtém várias imagens microscópicas captadas como secções horizontais com um campo de visão de 500 x 500 µm e uma alta resolução de 1000 x 1000 pixels. O programa VivaStack® permite captar imagens em profundidade desde o estrato córneo até à derme papilar. A profundidade das camadas, profundidade das papilas dérmicas e espessura da epiderme é calculada com a "profundidade z" (Tabela 1). A análise do brilho dos interqueratinócitos, da morfologia dos sulcos e da homogeneidade da superfície da pele foi realizada utilizando um escore padronizado no nosso grupo de investigação NEATEC (Núcleo de Estudos Avançados em Tecnologia de Cosméticos)(14).

Além disso, outros escores adaptados de Longo et al. (2013) foram avaliadas como padrão favo de mel, hiperpigmentação da pele, morfologia das papilas dérmicas, morfologia da derme (15). As definições das pontuações foram demonstradas na Tabela 2.

Análise estatística

A distribuição normal dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk no software OriginPro® 8. Após definir se os dados são paramétricos ou não paramétricos, foram realizados os testes t de Student pareado ou Wilcoxon, respectivamente. O software GraphPad Prism® 5 foi utilizado para realizar as análises estatísticas. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Table 2 - Reflectance Confocal Microscopy Scores to assess the photoaged skin. /
Tabela 2 - Escores da Microscopia Confocal de Reflectância para avaliar a pele fotoenvelhecida.

RCM Scores / Escore da MCR	Description / Descrição
Skin Surface Homogeneity / Homogeneidade da superfície da pele	Score from 0 to 3, being regular (Score 0) and irregular skin surface (Score 3) / Escore de 0 a 3, sendo regular (Escore 0) e irregular na superfície da pele (Escore 3).
Furrows Morphology / Morfologia dos sulcos	Score from 0 to 3, being regular (Score 0) and irregular furrows morphology (Score 3) / Escore de 0 a 3, sendo a morfologia de sulcos regular (Escore 0) e irregulares (Escore 3).
Interkeratinocyte Brightness / Brilho dos interqueratinócitos	Score from 0 to 3, being low (Score 0) and high interkeratinocyte brightness (Score 3) / Escore de 0 a 3, sendo o brilho dos interqueratinócitos baixo (Escore 0) e alta (Escore 3).
Honeycomb Pattern / Padrão do favo de mel	Score from 0 to 3, being well defined (Score 0) and undefined honeycomb pattern (Score 3) / Escore de 0 a 3, sendo o padrão favo de mel bem definido (Escore 0) e indefinido (Escore 3).
Skin Hyperpigmentation / Hiperpigmentação da pele	Score from 0 to 3, being low (Score 0) and high skin hyperpigmentation (Score 3) / Escore de 0 a 3, sendo a hiperpigmentação da pele baixa (Escore 0) e alta (Escore 3).
Dermal Papillae Morphology / Morfologia das papilas dérmicas	Score from 1 to 5, being round and well-outlined rings contours (Score 1), round and partially outlined rings contours (Score 2), well-outlined contours of polycyclic papillae (Score 3), partially outlined contours of polycyclic papillae (Score 4) and dermal papillae effacement (Score 5) / Escore de 1 a 5, sendo os contornos das papilas dérmicas redondas e bem delineados (Escore 1), contornos das papilas dérmicas redondas e parcialmente delineadas (Escore 2), contornos bem delineados de papilas policíclicas (Escore 3), contornos parcialmente delineados de papilas policíclicas (Escore 4) e achatamento de papilas dérmicas (Escore 5).
Dermis Morphology / Morfologia da derme	Score from 1 to 5, being presence of thin collagen (Score 1), thin and coarse collagens (Score 2), coarse collagen (Score 3), coarse and huddled collagens (Score 4) and huddled collagen (Score 5) / Escore de 1 a 5, sendo presença de colágeno fino (Escore 1), colágeno fino e grosso (Escore 2), colágeno grosso (Escore 3), colágeno grosso e amontoado (Escore 4) e colágeno amontoado (Escore 5).

Results

The results showed a significant increase ($p=0.0328$) of dermal papillae depth after the use of studied formulation for 90 days. In addition, an increase in the total epidermis thickness was observed after the 90 day period, which is according to improvement of dermal papillae depth (Table 3).

The results of RCM score analyses are shown in Figures 1 to 7.

The skin surface homogeneity score analysis showed an improvement of skin regularity of stratum corneum since the participants with Score 1 increased after 90 days of treatment (Figure 1A). This improvement can be seen in representative RCM images (Figure 1B).

The furrows morphology score improved after the 90 day formulation application period as the Score 0 (regular) increased (Figure 2A). Representative RCM images showed an improvement in the furrow morphology noted as straighter edges of the furrows relative to the baseline (Figure 2B).

Resultados

Os resultados mostraram um aumento significativo ($p=0,0328$) da profundidade das papilas dérmicas após a utilização durante 90 dias da formulação estudada. Além disso, observou-se um aumento da espessura total da epiderme após o período de 90 dias, o que está de acordo com a melhora da profundidade das papilas dérmicas (Tabela 3).

Os resultados da análise por escore das imagens do MCR estão apresentados nas Figuras 1 a 7.

A análise por escore de homogeneidade da superfície da pele mostrou uma melhora da regularidade da pele do estrato córneo, uma vez que a Escore 1 aumentou após 90 dias de tratamento (Figura 1A). Esta melhora pode ser vista nas imagens representativas da MCR na Figura 1B.

O escore da morfologia dos sulcos melhorou, uma vez que a Escore 0 (regular) aumentou após a utilização durante 90 dias da formulação (Figura 2A). As imagens representativas da MCR mostraram uma melhora na morfologia dos sulcos uma vez que as bordas dos sulcos são mais retas do que no tempo inicial (Figura 2B).

Table 3 - Reflectance Confocal Microscopy parameters of epidermis thickness. /
Tabela 3 - Parâmetros Microscopia Confocal de Reflectância da espessura da epiderme.

(μm)	T0	T90	P value/ Valor de P
Stratum Corneum Thickness / Espessura do estrato córneo	11.806 \pm 4.183	11.472 \pm 1.916	0.8438
Granular Layer Thickness / Espessura da camada granular	12.361 \pm 4.606	10.778 \pm 1.569	0.4712
Dermal Papillae Depth / Profundidade da papilla dérmica	12.917 \pm 3.231	16.694 \pm 4.385	0.0328*
Minimum Epidermis Thickness / Espessura mínima da epiderme	15.528 \pm 4.970	17.972 \pm 3.248	0.4533
Maximum Epidermis Thickness / Espessura máxima da epiderme	28.444 \pm 6.695	34.667 \pm 6.571	0.1519
Mean Epidermis Thickness / Espessura média da epiderme	21.986 \pm 5.670	26.319 \pm 4.696	0.2641
Total Epidermis Thickness / Espessura total da epiderme	40.250 \pm 6.487	46.139 \pm 7.177	0.2281

Legend: RCM results were demonstrated as mean \pm standard deviation. *: significant difference between times /
Legenda: Os resultados da MCR foram demonstrados como média \pm desvio padrão. *: diferença significativa entre os tempos.

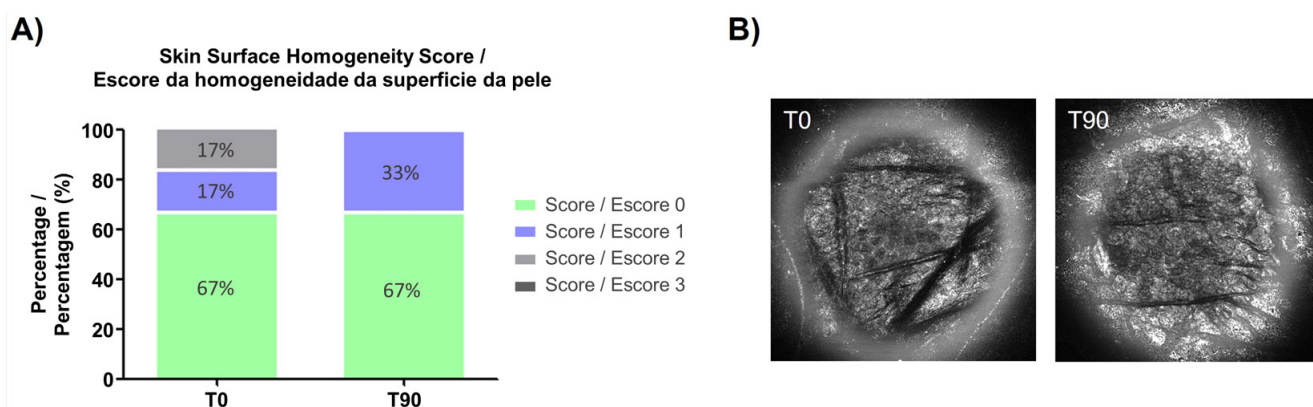


Figure 1 - Skin surface homogeneity score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of stratum corneum of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with skin surface irregularity and after treatment (T90) with regular skin surface homogeneity. (Scale: 500 x 500 μm)

Figura 1 - Escore da homogeneidade da superfície da pele (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR do estrato córneo da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes do tratamento (T0) com irregularidade da superfície da pele e após o tratamento (T90) com homogeneidade regular da superfície da pele. (Escala: 500 x 500 μm)

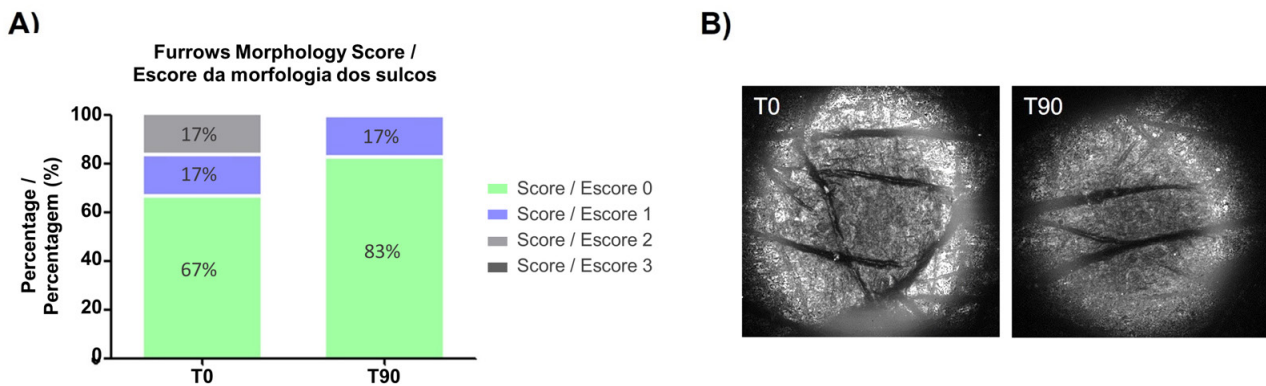


Figure 2 - Furrows morphology score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of stratum corneum of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with an irregularity furrows morphology and after treatment (T90) with regular furrows morphology. (Scale: 500 x 500 μ m)

Figura 2 - Escore da morfologia dos sulcos (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR do estrato córneo da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes do tratamento (T0) com uma morfologia de sulcos de irregularidade e depois do tratamento (T90) com morfologia de sulcos regulares. (Escala: 500 x 500 μ m)

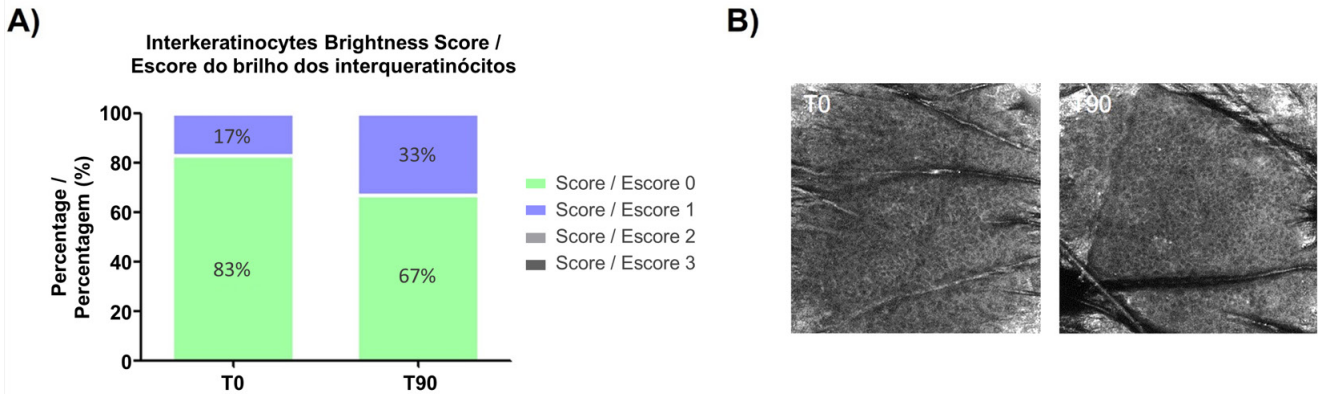


Figure 3 - Interkeratinocyte brightness score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of granular layer of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with the presence of low interkeratinocyte brightness and after treatment (T90) with an interkeratinocyte brightness. (Scale: 500 x 500 μ m) /

Figura 3 - Escore do brilho dos interqueratinócitos (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR da camada granular da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes do tratamento (T0) com a presença de baixo brilho interqueratinócito e após tratamento (T90) com um brilho interqueratinócito. (Escala: 500 x 500 μ m)

The interkeratinocyte brightness score analysis showed an increase after 90 days of treatment with the studied formulation. The score represents the low interkeratinocyte brightness (Figure 3A). An increase of interkeratinocyte brightness in the granular layer is demonstrated in representative RCM images after 90 days of treatment (Figure 3B).

The score analysis of the honeycomb pattern showed better homogeneity of keratinocytes with a more defined honeycomb pattern, as a Score 1 was found in 100% of the subjects after 90 days of treatment with the formulation (Figure 4A). The improvement in the honeycomb pattern is observed in representative RCM images (Figure 4B) in which the keratinocytes are homogeneous in size and shape and with defined cell borders after the treatment period.

The score analysis of the skin hyperpigmentation showed a reduction after the use of the formulation under study for 90 days, with an increase in participants with Score 1 (Figure 5A). The basal layer observed in the representative RCM images (Figure 5B) shows a reduction of basal layer brightness after 90 days of treatment.

The score analysis of the dermal papillae morphology showed an improvement after the use of the formulation as Score 2 was observed in 100% of participants after

A análise por escore do brilho dos interqueratinócitos mostrou um aumento após 90 dias de tratamento com a formulação em estudo. Além disso, o Escore 0 representa a baixa reflectância interqueratinócitos (Figura 3A). A camada granulosa com um aumento do brilho dos interqueratinócitos está demonstrada em imagens representativas da MCR após 90 dias de tratamento (Figura 3B).

A análise por escore do padrão do favo de mel mostrou melhora da homogeneidade dos queratinócitos e padrão favo de mel mais definido, uma vez que 100% do Escore 1 foi encontrada nas participantes de pesquisa após 90 dias de tratamento com a formulação (Figura 4A). A melhora do padrão do favo de mel foi observada em imagens representativas da MCR (Figura 4B) em que os queratinócitos estão homogêneos em tamanho e forma e com limites celulares definidos após o período de tratamento.

A análise por escore de hiperpigmentação da pele mostrou uma redução após a utilização durante 90 dias da formulação em estudo, uma vez que o Escore 1 aumentou após 90 dias de tratamento (Figura 5A). As imagens representativas da MCR (Figura 5B) mostram uma redução do brilho da camada basal após 90 dias de tratamento.

A análise por escore da morfologia das papilas dérmicas mostrou uma melhora após a utilização durante 90 dias da formulação, uma vez que o Escore 2 foi observada

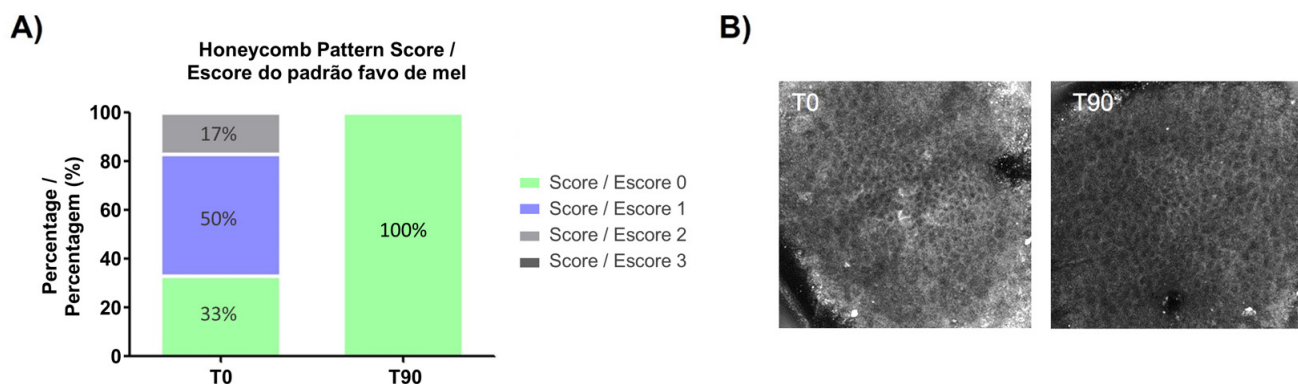


Figure 4 - Honeycomb pattern score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of granular layer of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with the presence of irregular honeycomb pattern and after treatment (T90) with more defined honeycomb pattern. (Scale: 500 x 500 µm)/

Figura 4 - Escore do padrão do favo de mel (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR da camada granular da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes do tratamento (T0) com a presença de padrão de favo de mel irregular e depois tratamento (T90) com padrão favo de mel mais definido. (Escala: 500 x 500 µm)

90 days of treatment (Figure 6A). Representative RCM images showed an improvement in the dermal papillae morphology after 90 days of treatment, in which the dermal papillae were rounded and partially outlined rings contours instead of polycyclic papillae (Figure 6B).

The score analysis of the dermis morphology showed an improvement of collagen after the use of the studied formulation for 90 days. The presence of coarse collagen

em 100% das participantes de pesquisa após 90 dias de tratamento (Figura 6A). Imagens representativas da MCR mostraram uma melhora na morfologia das papilas dérmicas após 90 dias de tratamento, uma vez que as papilas dérmicas estão arredondadas e parcialmente delineadas em anéis em vez de papilas policíclicas (Figura 6B).

O escore da análise da morfologia da derme mostrou melhora na morfologia do colágeno após a aplicação

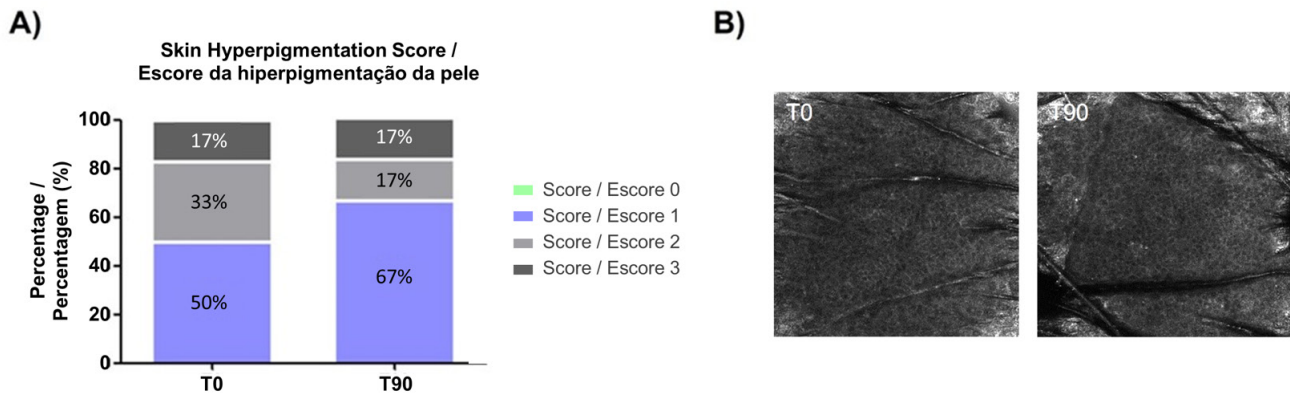


Figure 5 - Skin hyperpigmentation score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of basal layer of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with the presence of basal layer brightness and after treatment (T90) with the basal layer brightness reduction. (Scale: 500 x 500 µm) /

Figura 5 - Escore da hiperpigmentação da pele (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR da camada basal da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes do tratamento (T0) com a presença de brilho da camada basal e depois tratamento (T90) com a redução do brilho da camada basal. (Escala: 500 x 500 µm).

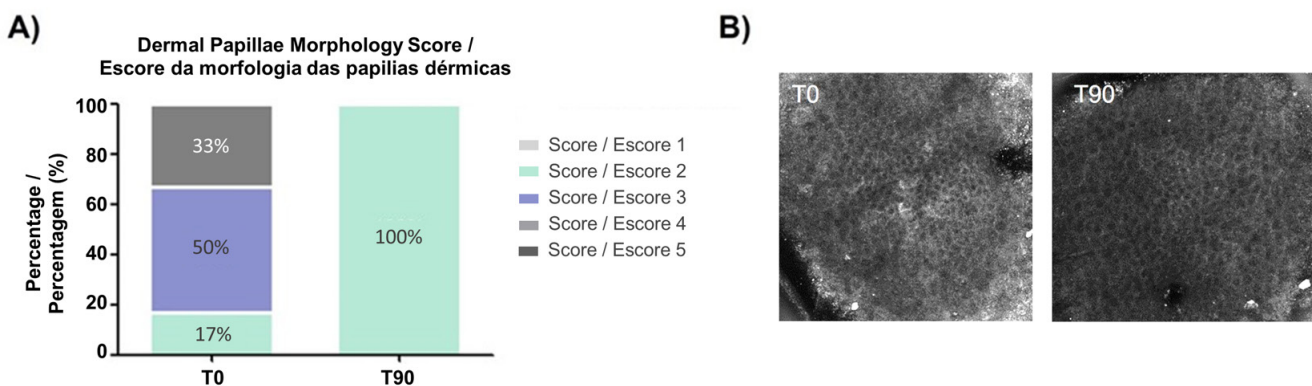


Figure 6 - Dermal papillae morphology score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of dermal epidermal junction of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with the presence of poorly-defined polycyclic papillae and after treatment (T90) with the presence of round and poorly-defined papillae. (Scale: 500 x 500 µm) /

Figura 6 - Escore da morfologia das papilas dérmicas (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR da junção epidérmica dérmica da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes do tratamento (T0) com a presença de papilas policíclicas mal definidas e após tratamento (T90) com a presença de papilas redondas e mal definidas. (Escala: 500 x 500 µm)

(Score 3) was presented in 50% of participants after 90 days of treatment (Figure 7A). The dermis morphology was represented as coarse and huddled collagen at the initial time and was observed as coarse collagen after the treatment period (Figure 7B).

Discussion

In order to prove the effectiveness of the topical peptides, clinical study is important for the development of effective and innovative cosmetic formulations (16). For that, the RCM imaging analysis is essential to evaluate the effects of the active ingredients in skin depth as it evaluates the morphological and structural characteristics of the epidermis in real time and in a non-invasive way (12).

According to the results obtained, improvements of regularity of stratum corneum, furrow morphology and increase of interkeratinocyte brightness were observed after the use of the formulation under study for 90 days. These findings corroborated with the study of Manfredini et al. (2013) that suggested an increase of skin hydration due to a decrease in the irregularity of the skin surface, an improvement in the morphology of furrows and an increase in the interkeratinocytes brightness after application of the cosmetic formulations (17). In addition, Shirata and Maia Campos (2021)

durante 90 dias da formulação estudada. A presença de colágeno grosso (Escore 3) foi apresentada em 50% dos indivíduos após 90 dias de tratamento (Figura 7A). A morfologia da derme foi representada como colágeno grosso e amontoadado no momento inicial e foi observado como colágeno grosso após o período de tratamento (Figura 7B).

Discussão

A fim de provar a eficácia dos peptídeos tópicos, o estudo clínico é importante para o desenvolvimento de formulações cosméticas eficazes e inovadoras (16). Para isso, a análise de imagem da MCR é essencial para avaliar os efeitos dos ingredientes ativos na profundidade da pele, uma vez que avalia as características morfológicas e estruturais da epiderme em tempo real e de uma forma não invasiva (12).

De acordo com os resultados obtidos, foram observadas melhorias da regularidade do estrato córneo, da morfologia do sulco e do aumento do brilho dos interqueratinócitos após a utilização durante 90 dias da formulação em estudo. Estes resultados corroboraram com o estudo de Manfredini et al. (2013) que sugeriu um aumento da hidratação da pele devido a uma diminuição da irregularidade da superfície da pele, uma melhora da morfologia dos sulcos e um aumento do brilho dos

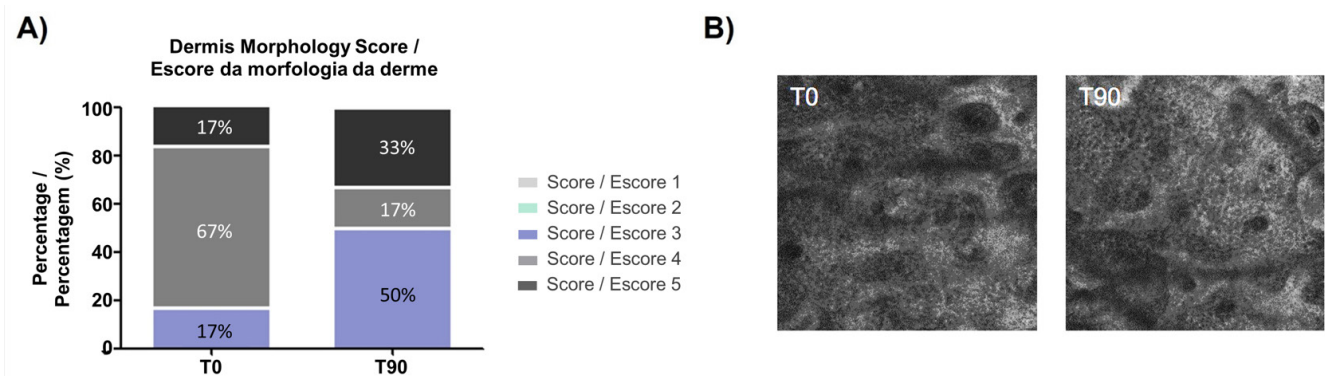


Figure 7 - Dermis morphology score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of dermis of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with the presence of coarse and huddled collagen and after treatment (T90) with the presence of coarse collagen. (Scale: 500 x 500 μ m) /

Figura 7 - Escore da morfologia da derme (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR da derme da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes tratamento (T0) com a presença de colágeno grosso e amontoadado e após tratamento (T90) com a presença de colágeno grosso. (Escala: 500 x 500 μ m)

showed a significant increase in the granular layer thickness in photoaged skin after a 90 day application period of a formulation containing di- and tri peptides, which suggest an increase of skin hydration (11).

Moreover, the improvement in the honeycomb pattern suggests an improvement in the skin conditions, since the irregularity of the honeycomb pattern is present in skin photoaging (7,18).

A significant increase of dermal papillae depth and the improvement of dermal papillae morphology after 90 days of treatment with the formulation under study suggests that the formulation was effective for the treatment of alterations in the aged skin since the improvement in the dermo-epidermal junction can increase the skin nutrition and basal cell proliferation that are compromised with skin aging (5).

Another finding that suggests the efficacy of the studied formulation on aged skin was the improvement of the collagen morphology, since there was a decrease of huddled collagen and increase of coarse collagen after the use of the proposed formulation for 90 days (15).

These findings are very important since the aging process cause changes in the layers of dermis, superficial papillary layer and deeper reticular layer, which have distinct collagen fibrils and fibroblast properties (19). However, the papillary layer shows more remarkable changes with aging than the reticular layer (20).

In addition, there was a reduction of skin hyperpigmentation after the use of the proposed formulation for 90 days, which can suggest that there was an improvement in the photoaged skin, since hyperpigmentation is present on skin exposed to higher incidence of UV radiation (18). This result corroborate with the findings reported by Shirata e Maia Campos (2021), who observed a significant hyperpigmentation reduction after a 90 day period of use of the cosmetic formulations based on rice peptides in combination with ascorbyl tetraisopalmitate (11).

In addition, the oral and topical use of peptides is commonly used in dermatology for skin care (21). Oral collagen supplements are known to increase skin elasticity, hydration and dermal collagen density (22, 23). In addition, previous studies by our research

interqueratinócitos após a aplicação das formulações cosméticas (17). Além disso, Shirata e Maia Campos (2021) mostraram um aumento significativo na espessura da camada granular após um período de 90 dias de aplicação de uma formulação adicionada a di e tri peptídeos na pele fotoenvelhecida, o que sugere um aumento da hidratação da pele (11).

Além disso, a melhora do padrão do favo de mel sugere uma melhora das condições cutâneas, uma vez que a irregularidade do padrão do favo de mel está presente no fotoenvelhecimento cutâneo (7,18).

Um aumento significativo da profundidade das papilas dérmicas e a melhora da morfologia das papilas dérmicas após 90 dias de tratamento com a formulação em estudo sugere que a formulação foi eficaz para o tratamento de alterações na pele envelhecida, uma vez que a melhora da junção dermo-epidérmica pode aumentar a nutrição da pele e a proliferação de células basais que estão comprometidas com o envelhecimento da pele (5).

Outra descoberta que sugere a eficácia da formulação estudada na pele envelhecida foi a melhora da morfologia do colágeno, uma vez que houve uma diminuição do colágeno amontoado e um aumento do colágeno grosso após a utilização durante 90 dias da formulação proposta. (15).

Estas descobertas são muito importantes uma vez que o processo de envelhecimento provoca alterações nas camadas da derme, camada papilar superficial e camada reticular mais profunda, que têm fibras de colágeno e propriedades fibroblásticas distintas (19). No entanto, a camada papilar mostra alterações mais notáveis com o envelhecimento do que a camada reticular (20).

Além disso, houve uma redução da hiperpigmentação da pele após a utilização durante 90 dias da formulação proposta, o que pode sugerir que houve uma melhora na pele fotoenvelhecida, uma vez que a hiperpigmentação está presente na pele exposta a maior incidência de radiação UV (18). Este resultado corrobora com os resultados relatados por Shirata e Maia Campos (2021), que observou uma redução significativa da hiperpigmentação após um período de 90 dias de utilização das formulações cosméticas baseadas em peptídeos de arroz em combinação com o ascorbil tetraisopalmitato (11).

Além disso, a utilização oral e tópica de peptídeos é comumente utilizada em dermatologia para os

group have shown a significant increase in dermis echogenicity, hydration and viscoelastic properties of the skin after using formulations containing di- and tripeptides extracted from rice for 90 days of topical or oral treatment (10).

In summary, the present study complements the previous study of our research group since it showed that the proposed cosmetic formulation was effective in the improvement of honeycomb pattern of epidermis, dermoepidermal junction and dermis morphology due to an improvement of collagen morphology after a 90 day period of application.

Finally, the study has as limitations the lack of a control group and the small number of participants in the clinical study.

Conclusion

The results obtained in RCM imaging analyses showed an improvement of morphological characteristics of the skin after 90 days of twice-daily application of the studied cosmetic formulation containing di- and tripeptides extracted from rice when compared to baseline - initial time, before the formulation application, as it improved epidermis and dermoepidermal junction (DEJ) morphology.

Reflectance Confocal Microscopy can be suggested as a valuable tool for evaluating the effectiveness of cosmetic formulations on the skin, in an objective and non-invasive way under the real conditions of use.

cuidados da pele (21). Sabe-se que os suplementos orais de colágeno aumentam a elasticidade da pele, a hidratação e a densidade de colagénio dérmico (22, 23). Além disso, estudos anteriores do nosso grupo de investigação demonstraram um aumento significativo da ecogenicidade da derme, hidratação e propriedades viscoelásticas da pele após a utilização de formulações adicionadas com di- e tripeptídeos extraídos do arroz durante 90 dias de tratamento tópico ou oral (10).

Em síntese, o presente estudo complementa o estudo anterior do nosso grupo de investigação, uma vez que mostrou a formulação cosmética proposta foi eficaz na melhoria da homogeneidade dos queratinócitos - padrão do favo de mel da epiderme, da morfologia da junção dermoepidérmica e da derme devido a uma melhora da morfologia do colágeno após um período de 90 dias de aplicação.

Por fim, o estudo apresenta como limitação a falta de um grupo controle e um número pequeno de participantes do estudo clínico.

Conclusão

Os resultados obtidos nas análises de imagem obtidas do MCR mostraram uma melhoria das características morfológicas da pele após 90 dias de aplicação duas vezes por dia da formulação cosmética estudada contendo di- e tripeptídeos extraídos do arroz em comparação com o basal - tempo inicial - antes da aplicar a formulação, uma vez que melhorou a morfologia das epiderme, papilas dérmicas e junção dermoepidérmica (JDE).

A Microscopia Confocal Reflectância pode ser sugerida como uma ferramenta valiosa para avaliar a eficácia de formulação cosméticas na pele, de forma objectiva e não invasiva sob as condições reais de utilização.

Acknowledgement

The authors would like to express their thanks for the financial support of the Fundação de Amparo à do Estado de Sao Paulo - Brasil – FAPESP (grant number 2017/19278-0) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Authors Contributions

The contributions of Patricia M. B. G. Maia Campos were conceptualization of the study, writing, revision, and editing. The contributions of Gabriela M. D'Angelo Costa were data and image analysis, statistical analysis and writing.

Conflicts of Interest

The Editor involved in the authorship of this manuscript 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.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Brasil - FAPESP (subvenção número 2017/19278-0) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

Declaração sobre as contribuições do autor

As contribuições de Patricia M. B. G. Maia Campos foram conceptualização do estudo, redacção, revisão e edição. As contribuições de Gabriela M. D'Angelo Costa foram análise de dados e imagem, análise estatística e escrita.

Conflito de Interesses

A Editora presente na autoria deste manuscrito não participou nos processos de pessoais revisão e/ou decisão. As autoras declararam não possuir quaisquer relações financeiras ou que possam configurar um potencial conflitos de interesse.

References / Referências

1. Lee C. M. (2016). Fifty years of research and development of cosmeceuticals: a contemporary review. *Journal of cosmetic dermatology*, 15(4), 527–539. <https://doi.org/10.1111/jocd.12261>
2. Verschoore, M., & Nielson, M. (2017). The Rationale of Anti-Aging Cosmetic Ingredients. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, 16(6), s94–s97.
3. Campos, P. M., Gianeti, M. D., Mercurio, D. G., & Gaspar, L. R. (2014). Synergistic effects of green tea and ginkgo biloba extracts on the improvement of skin barrier function and elasticity. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, 13(9), 1092–1097.
4. Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2008). Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International journal of cosmetic science*, 30(2), 87–95. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2007.00415.x>
5. Zhang, S., & Duan, E. (2018). Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell transplantation*, 27(5), 729–738. <https://doi.org/10.1177/0963689717725755>
6. Khavkin, J., & Ellis, D. A. (2011). Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial plastic surgery clinics of North America*, 19(2), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2011.04.003>
7. Mercurio, D. G., Jdid, R., Morizot, F., Masson, P., & Maia Campos, P. M. (2016). Morphological, structural and biophysical properties of French and Brazilian photoaged skin. *The British journal of dermatology*, 174(3), 553–561. <https://doi.org/10.1111/bjd.14280>
8. Infante, V. H. P., Bagatin, E., & Maia Campos, P. M. B. G. (2021). Skin photoaging in young men: A clinical study by skin imaging techniques. *International journal of cosmetic science*, 43(3), 341–351. <https://doi.org/10.1111/ics.12701>
9. Zhang, L., & Falla, T. J. (2009). Cosmeceuticals and peptides. *Clinics in dermatology*, 27(5), 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.05.013>
10. Maia Campos, P. M. B. G., Melo, M. O., & Siqueira César, F. C. (2019). Topical application and oral supplementation of peptides in the improvement of skin viscoelasticity and density. *Journal of cosmetic dermatology*, 18(6), 1693–1699. <https://doi.org/10.1111/jocd.12893>
11. Fossa Shirata, M. M., & Maia Campos, P. M. B. G. (2021). Sunscreens and Cosmetic Formulations Containing Ascorbyl Tetraisopalmitate and Rice Peptides for the Improvement of Skin Photoaging: A Double-blind, Randomized Placebo-controlled Clinical Study. *Photochemistry and photobiology*, 97(4), 805–815. <https://doi.org/10.1111/php.13390>
12. Maia Campos, P.M.B.G., Melo, M.O. & Mercurio, D.G. (2016). Assessment of skin photoaging with reflectance confocal microscopy. In M.C.A Issa & B. Tamura (Eds.), *Daily Routine in Cosmetic Dermatology, Clinical Approaches and Procedures in Cosmetic Dermatology* (pp. 1-10). Springer International Publishing AG, Cham.
13. Calzavara-Pinton, P., Longo, C., Venturini, M., Sala, R., & Pellacani, G. (2008). Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging. *Photochemistry and photobiology*, 84(6), 1421–1430. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00443.x>
14. Maia Campos, P.M.B.G. & Melo, M.O. (2018). Application of Reflectance Confocal Microscopy in the evaluation of skin hydration. *ISBS World Congress 2018*, San Diego, USA.
15. Longo, C., Casari, A., De Pace, B., Simonazzi, S., Mazzaglia, G., & Pellacani, G. (2013). Proposal for an in vivo histopathologic scoring system for skin aging by means of confocal microscopy. *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)*, 19(1), e167–e173. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2012.00623.x>
16. Espinosa-Leal, C. A., & Garcia-Lara, S. (2019). Current Methods for the Discovery of New Active Ingredients from Natural Products for Cosmeceutical Applications. *Planta medica*, 85(7), 535–551. <https://doi.org/10.1055/a-0857-6633>
17. Manfredini, M., Mazzaglia, G., Ciardo, S., Simonazzi, S., Farnetani, F., Longo, C., & Pellacani, G. (2013). Does skin hydration influence keratinocyte biology? In vivo evaluation of microscopic skin changes induced by moisturizers by means of reflectance confocal microscopy. *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)*, 19(3), 299–307. <https://doi.org/10.1111/srt.12042>
18. Wurm, E. M., Longo, C., Curchin, C., Soyer, H. P., Prow, T. W., & Pellacani, G. (2012). In vivo assessment of chronological ageing and photoageing in forearm skin using reflectance confocal microscopy. *The British journal of dermatology*, 167(2), 270–279. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10943.x>
19. Korosec, A., Frech, S., Gesslbauer, B., Vierhapper, M., Radtke, C., Petzelbauer, P., & Lichtenberger, B. M. (2019). Lineage Identity and Location within the Dermis Determine the Function of Papillary and Reticular Fibroblasts in Human Skin. *The Journal of investigative dermatology*, 139(2), 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.07.033>
20. Mine, S., Fortunel, N. O., Pigeon, H., & Asselineau, D. (2008). Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS one*, 3(12), e4066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004066>
21. Gorouhi, F., & Maibach, H. I. (2009). Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *International journal of cosmetic science*, 31(5), 327–345. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00490.x>
22. Choi, F. D., Sung, C. T., Juhasz, M. L., & Mesinkovsk, N. A. (2019). Oral Collagen Supplementation: A Systematic Review of Dermatological Applications. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, 18(1), 9–16.
23. Maia Campos, P. M. B. G., Franco, R. S. B., Kakuda, L., Cadioli, G. F., Costa, G. M. D., & Bouvret, E. (2021). Oral Supplementation with Hydrolyzed Fish Cartilage Improves the Morphological and Structural Characteristics of the Skin: A Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Study. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(16), 4880. <https://doi.org/10.3390/molecules26164880>

BIOMEDICAL AND BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH

JORNAL DE INVESTIGAÇÃO
BIOMÉDICA E BIOFARMACÊUTICA

Contents / Conteúdos

- 264** **Editorial: A new development cycle to begin**
Um novo ciclo de desenvolvimento a começar
L. Monteiro Rodrigues
- 265** **Adherence to the Mediterranean food pattern and sociodemographic factors in students of the 3rd cycle of basic education on Terceira Island, Azores, Portugal**
Adesão ao padrão alimentar mediterrânico e fatores sociodemográficos em estudantes do 3.º ciclo do ensino básico da ilha Terceira, Açores, Portugal
Leandro Oliveira, Francisco Sousa & Maria Graça Silveira
- 278** **Supplementation with *Moringa oleifera* leaves flour prevents fructose-based metabolic disorders in young rats**
Suplementação de farinha de folhas de Moringa oleifera previne distúrbios metabólicos induzidos pela frutose em ratos jovens
Izabel Carolina Bousfield Terranova, Izabelle Coelho Souza, Isadora Simas Ribeiro, Milena Fronza Broering, Aline De Faveri, Marina Jagielski Goss, Ana Mara de Oliveira Silva, Rivaldo Niero, Eduardo Augusto Steffens, Larissa Benvenuti, Luciano Vitali, Samantha Gonçalves, Isabel Daufenback Machado, Nara Lins Meira Quintão, José Roberto Santin
- 299** **Pilot study of unconventional food plant (UFP): adherence to nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) in the diet and monitoring of biometric and clinical indicators**
*Estudo piloto de planta alimentícia não convencional (PANC): adesão da capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) na dieta e monitorização de indicadores biométricos e clínicos*
Sérgio Faloni de Andrade, Maria da Graça Lopes Serrador, Alda Pereira da Silva, Rejane Giacomelli Tavares, Luis Monteiro Rodrigues, Maria do Céu Costa
- 314** **Grape Pomace Flour: from winemaking by-product to sustainable alternative for health benefits**
Farinha de Bagaço de Uva: de subproduto da vinificação a alternativa sustentável para benefícios à saúde
Raphaella Cassol Piccoli, Paula Pereira, Marisa Nicolai, Maria Lídia Palma, Francieli Moro Stefanello, Rejane Tavares Giacomelli
- 337** **Ablation of Kex2 activity enhances proIAPP proteotoxicity in yeast**
Ablação da atividade da Kex2 aumenta a proteotoxicidade induzida pelo proIAPP na levedura
Sofia Ferreira, Ana F. Raimundo, Inês Farrim, Regina Menezes
- 355** **Antiphospholipid Syndrome (Clinical case)**
Síndrome Anticorpos Antifosfolípeidos (Caso clínico)
Bruno Sousa
- 361** **Evaluation of the protective and moisturizing effects of cosmetic formulations for the skin containing extracts with film-forming properties**
Avaliação dos efeitos protetor e hidratante de formulações cosméticas para a pele contendo extratos com propriedades filmógenas
Bruna Penachin, Letícia Kakuda, Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos
- 379** **Oral intake of Bioactive Collagen Peptides in the improvement of skin and hair: clinical studies by instrumental measurements**
Ingestão oral de Peptídeos Bioativos de Colágeno na Melhoria da Pele e Cabelo: Estudos Clínicos por Medidas Instrumentais
Patrícia M. B. G. Maia Campos, Máisa Oliveira de Melo, Marina Mendes Fossa Shirata, Marcella Gabarra Leite
- 397** **Pretest questionnaire for anti-ageing cosmetic claims substantiation: a description of validation of efficacy and sensory perception questionnaires**
Pré-teste de questionário para substanciação de claims cosméticos anti-ageing: uma descrição de validação de questionários de percepção de eficácia e sensorial
Mariane Massufero Vergilio, Laura Moretti Aiello, Tamiris Anselmo, Gislaïne Ricci Leonardi
- 410** **Evaluation of the influence of the application of a cosmetic formulation on the skin morphological characteristics by Reflectance Confocal Microscopy**
Avaliação da influência da aplicação de uma formulação cosmética nas características morfológicas da pele por Microscopia Confocal de Reflectância
Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos & Gabriela Maria D'Angelo Costa

Supplements | Suplementos

- InnovDel** **Abstract Book - InnovDelivery '22 - I Lusophone Meeting on Innovative Delivery Systems**
Livro de Resumos - InnovDelivery '22 - I Lusophone Meeting on Innovative Delivery Systems
- FeSBS** **Abstract Book - FeSBS 2022 - XXXVI Annual Meeting of Federation of Societies of Experimental Biology (FeSBE)**
Livro de Resumos - FeSBS 2022 - XXXVI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)
- SCCBIOS** **Abstract Book - 2022 CBIOS Scientific Sessions**
Livro de Resumos - Sessões Científicas CBIOS 2022
- ACNP** **Abstract Book - 1st African Conference on Natural Products & Related Fields 2022**
Livro de Resumos - 1ª Conferência Africana sobre Produtos Naturais e Áreas Relacionadas 2022